

ISSN 2433-5819

研 究 年 報

平成 30 年度

第 2 号

ANNUAL REPORT
OF
OSAKA INSTITUTE OF PUBLIC HEALTH

No.2
(2018)

目 次

報 文

大阪府におけるエンテロウイルス感染症の流行状況と分子疫学的解析（2017年度） 中田恵子，弓指孝博・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	1
大阪府における食中毒事例から検出されたノロウイルスの流行状況と分子疫学的解析（2017年度） 高田利香，左近直美，中田恵子，本村和嗣，弓指孝博・・・・・・・・	10
下水におけるエンテロウイルスの多様性に関する検討 高田利香，中田恵子，弓指孝博・・・・・・・・・・・・・・・・	18
大阪府内における2017/2018シーズンのインフルエンザ流行状況 森川佐依子，廣井 聡，弓指孝博・・・・・・・・・・・・・・・・	26
大阪府における蚊媒介ウイルス感染症に対するサーベイランス調査（2017年度） 青山幾子，尾之内佐和，山口敬治，弓指孝博・・・・・・・・	36
2017年に大阪市内の食中毒原因調査で検出された下痢原性微生物 中村寛海，後藤 薫，梅田 薫，山本香織，入谷展弘，阿部仁一郎， 久保英幸，改田 厚，山元誠司，馬場 孝，平井有紀，長谷 篤， 平山照雄，秋吉充子，山崎一夫，小笠原準・・・・・・・・	44
畜水産物中の動物用医薬品の一斉分析法の妥当性評価 山口瑞香，吉田優子，永吉晴奈，柿本健作，白川育子，北川陽子， 梶村計志・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	53
ジャガイモによる食中毒疑い事例について 山口瑞香，栗津 薫，徳永佑亮，柿本 葉，野村千枝，藤原拓也， 梶村計志・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	60
大阪府で発生したクワズイモによる食中毒事例について 村上太郎，昌山 敦，大島 詔，仲谷 正，山口之彦・・・・・・・・	63
リアルタイムPCR法によるクワズイモの同定 野村千枝，昌山 敦，村上太郎，梶村計志・・・・・・・・	68
水質検査における外部精度管理（2016年度）—フェノール類— 吉田 仁，小泉義彦・・・・・・・・・・・・・・・・	74

水質検査における外部精度管理（2016年度）—亜硝酸態窒素および塩化物イオン— 安達史恵, 高木総吉	83
水質検査における外部精度管理（2017年度）—大阪府建築物飲料水水質検査業— 中島孝江, 安達史恵, 小泉義彦	91
大阪府における環境および食品中放射能調査（平成29年度報告） 大山正幸, 肥塚利江, 木村明生	100

抄 録

ヒラメに寄生した <i>Kudoa septempunctata</i> 胞子を検出するためのイムノクロマトグラフィ ー法に応用可能な新規モノクローナル抗体の作出 (英文) 陳内理生, 河合高生, 原田哲也, 西山泰孝, 横山 博, 白樫 正, 佐藤 宏, 坂田淳子, 久米田裕子, 福田 穰, 緒方喜久代, 川津健太郎	109
食品由来および臨床由来リステリア・モノサイトゲネス株におけるリステリオリシン O およ びホスホリパーゼ PlcA と PlcB 活性と初期細胞内増殖能の比較 (英文) 神吉政史, 成世久代, 川津健太郎	109
ベトナムで市販されたコショウの腸内細菌科菌群汚染実態と分離株の薬剤感受性 (英文) 原田哲也, 山根諒子, Dang Van Chinh, Nguyen Do Phuc, Nguyen Thi Anh Dao, 陳内理生, 余野木伸哉, 河原隆二, 神吉政史, 河合高生, 川津健太郎, 久米田裕子, 伊勢川裕二, 山本容正	110
水産食品における病原性腸炎ビブリオ汚染の迅速検査法の開発 (英文) 坂田淳子, 米北太郎, 川津健太郎	110
大阪府の学生寮における G 群溶血性レンサ球菌咽頭炎食中毒について (英文) 山口貴弘, 河原隆二, 勝川千尋, 神吉政史, 原田哲也, 余野木伸哉, 岩崎聡美, 上原大和, 岡島沙織, 西村公志, 本村和嗣, 宮園将哉, 久米田裕子, 川津健太郎	111
ブドウ球菌エンテロトキシン遺伝子を保有する <i>Staphylococcus argenteus</i> によるブドウ 球菌食中毒事例 (英文) 若林友騎, 梅田 薫, 余野木伸哉, 中村寛海, 山本香織, 久米田裕子, 川津健太郎	111
ロタウイルスワクチン RotaRix 由来の二次感染による急性胃腸炎症例 (英文)	

左近直美, 宮本良平, 駒野淳	112
2016/17 シーズン、大阪における小児間で流行した高伝播性ノロウイルス(英文)	
左近直美, 駒野 淳, Heidi L. Tessmer, 大森亮平	112
2014 年から 2016 年におけるノロウイルス GII.17 Kawasaki 308 株の世界的な広まり (英文)	
Martin C. W. Chan, Yunwen Hu, Haili Chen, Alexander T. Podkolzin, Ekaterina V. Zaytseva, 駒野 淳, 左近直美, Yong Poovorawan, Sompong Vongpunsawad, Thanundorn Thanusuwannasak, Joanne Hewitt, Dawn Croucher, Nikail Collins, Jan Vinjé, Xiaoli L. Pang, Bonita E. Lee, Miranda de Graaf, Janko van Beek, Harry Vennema, Marion P. G. Koopmans, Sandra Niendorf, Mateja Poljsak-Prijatelj, Andrej Steyer, Peter A. White, Jennifer H. Lun, Janet Mans, Tin-Nok Hung, Kirsty Kwok, Kelton Cheung, Nelson Lee, Paul K.S. Chan	113
2004 年から 2015 年にかけて日本で検出されたノロウイルス GII.2 の RdRp と VP1 の 分子進化解析(英文)	
水越文徳, 長澤耕男, Y. H. DOAN, 芳賀 慧, 吉澄志磨, 植木 洋, 篠原美千代, 石川真理子, 左近直美, 重本直樹, 岡本玲子, 越智晶絵, 村上光一, 梁 明秀, 鈴木善幸, 片山和彦, 木村博一	113
核酸精製を必要としない one-step リアルタイム PCR によるノロウイルス検査の有用性	
左近直美	114
2016-17 冬季に日本において検出された GII.P16-GII.2 の分子系統解析と抗原反 応(英文)	
長澤耕男, 松島勇紀, 本谷 匠, 水越文徳, 植木 洋, 左近直美, 村上光一, 清水智美, 岡部信彦, 永田紀子, 調 恒明, 四ノ宮博人, 鈴木 渉, 黒田 誠, 関塚剛史, 梁 明秀, 藤田清貴, 大石和徳, 片山和彦, 木村博一	114
2016-17 冬季に日本において検出されたヒトノロウイルスの分子系統解析(英文)	
長澤耕男, 松島勇紀, 本谷 匠, 水越文徳, 植木 洋, 左近直美, 村上光一, 清水智美, 岡部信彦, 永田紀子, 調 恒明, 四ノ宮博人, 鈴木 渉, 黒田 誠, 関塚剛史, 鈴木善幸, 梁 明秀, 藤田清貴, 大石和徳, 片山和彦, 木村博一	115
「アストロウイルス科」	
左近直美, 藤井理津志, 大瀬戸光明	115
手足口病の原因となるエンテロウイルス 71 型に対する β グルコシダーゼ 1 の抗ウイル ス活性(英文)	

中田恵子, 武田 哲, 田中 敦, Jimmy Kwang, 駒野 淳	116
海外での感染が疑われた患者からの EV-D68 家族内感染事例	
中田恵子, 上林大起, 森川佐依子, 大塚真紀	116
大阪府における小児の呼吸器アデノウイルス感染症サーベイランス(英文)	
廣井 聡, 森川佐依子, 中田恵子, 加瀬哲男	117
関西国際空港の麻疹事例の検査結果から得られた知見	
倉田貴子, 本村和嗣	117
成人における風疹 IgM 抗体価の診断的価値について	
倉田貴子, 内野清子, 堀田千恵美, 小倉 惇, 三好龍也, 田中智之, 小川知子, 弓指孝博, 上林大起, 駒野 淳	118
大阪市における手足口病の流行に Coxsackievirus A6 が与えた影響(英文)	
上林大起, 改田 厚, 山元誠司, 平井有紀, 久保英幸, 藤森良子, 伯井紀隆, 廣川秀徹, 入谷展弘	118
風疹ウイルスの新規中和抗体価測定系の確立(英文)	
上林大起, 倉田貴子, 高橋和郎, 加瀬哲男, 駒野 淳	119
2012 年から 2013 年の風疹流行時に検出された風疹ウイルス株の分子疫学解析(英文)	
森 嘉生, 三好正浩, 菊地正幸, 関根雅夫, 梅澤昌弘, 七種美和子, 松島勇紀, 板持雅恵, 安井善宏, 上林大起, 三好龍也, 秋吉京子, 辰己智香, 財津修一, 門口真由美, 大槻紀之, 岡本貴世子, 坂田真史, 駒瀬勝啓, 竹田 誠	119
ミトコンドリア損傷は、TCDD 誘導性ポリ(ADP-リボース)ポリメラーゼ媒介抗ウイルス応答を誘発する(英文)	
児崎達哉, 駒野 淳, 上林大起, 高濱充寛, 三澤拓馬, 佐藤 莊, 竹内 理, 河合太郎, 清水重臣, 松浦善治, 審良静男, 齊藤達哉	120
What's your diagnosis? 見て! 日本のパンケーキだよ!	
西澤 徹, 谷浦武仁, 山田瑞穂, 青山幾子, 弓指孝博	120

日本でのアジア条虫症の輸入症例(英文)	
並川浩巳, 竹本恭彦, 島崎郁司, 幕内安弥子, 小林正宣, 衣畑茂紀, 山田康一, 藤本浩毅, 豊田宏光, 鎌田紀子, 栩野吉弘, 寺本 勲, 阿部仁一郎, 森村美奈, 掛屋 弘, 首藤太一	121
輸入 Queensland tick typhus (クイーンズランドマダニチフス) の一例	
森村 歩, 白野倫徳, 小西啓司, 笠松 悠, 後藤哲志, 阿部仁一郎, 安藤秀二	121
アニサキス感作ラットにおいてアニサキスヘモグロビンは免疫反応の増強と助長を誘導 するアニサキス主要抗原の一つである(英文)	
阿部仁一郎, 寺本 勲	122
管楽器におけるカビ汚染の現状	
濱田信夫, 阿部仁一郎	122
岐阜県産ホンシュウジカとイノシシより検出されたアナプラズマの遺伝子解析(英文)	
松尾加代子, 森部絢嗣, 阿部仁一郎	123
春季日本海におけるマイワシとカタクチイワシの同時同所採集物を用いた食性比較	
馬場 孝, 森本晴之, 後藤常夫, 南條暢聡, 尾田昌紀, 上野陽一郎	123
国内初のコリネバクテリウム・ウルセランス感染による死亡例(英文)	
尾辻 健, 福田和正, 遠藤武尊, 清水智子, 原山信也, 小川みどり, 山本明彦, 梅田 薫, 馬田敏幸, 関 洋之, 岩城正昭, 蒲池正幸, 齋藤光正	124
従来型エンテロトキシン非産生の黄色ブドウ球菌による食中毒事例と、分離株の解析 (英文)	
梅田 薫, 中村寛海, 山本香織, 仁科展子, 安福 潔, 平井有紀, 平山照雄, 後藤 薫, 長谷 篤, 小笠原準	124
白色の植物のシュート、ワックス生産昆虫、他の節足動物の白色構造: 擬態複合体 か?(英文)	
山崎一夫	125
気候温暖化によるダンダラテントウの夏季採集記録の消失(英文)	
河上康子, 山崎一夫	125

大阪市における 2010、2013、2015 年の異なる遺伝グループのエンテロウイルス D68 型検出(英文)	改田 厚, 入谷展弘, 山元誠司, 上林大起, 平井有紀, 外川正生, 天羽清子, 罔府寺美, 西垣敏紀, 塩見正司, 浅井定三郎, 影山 努, 久保英幸	126
大阪市における 2007~2016 年の麻疹ウイルスサーベイランス(英文)	改田 厚, 入谷展弘, 上林大起, 山元誠司, 平井有紀, 伯井紀隆, 藤森良子, 森 宏美, 廣川秀徹, 小笠原準, 久保英幸	126
GC-MS を用いた残留農薬一斉分析におけるポリエチレングリコール共注入法の問題点および対策:タイプ II ピレスロイドの不安定化現象および新規アナライトプロテクタントによる当該現象の抑制に関する検討(英文)	阿久津和彦, 北川陽子, 吉光真人, 高取 聡, 福井直樹, 小坂田正和, 内田耕太郎, 東恵美子, 梶村計志	127
北海道に生息するタンチョウヅル中の残留性有機汚染物質(英文)	柿本健作, 阿久津和彦, 永吉晴奈, 小西良昌, 梶村計志, 机 直美, 吉野智生, 松本文雄, 中野 武, 唐 寧, 早川和一, 鳥羽 陽	127
ヒトチトクローム P450 におけるフラボン及びフラバノンの酸化代謝挙動(英文)	柿本健作, 村山典恵, 竹中重雄, 永吉晴奈, Young Ran Lim, Vitchan Kim, Donghak Kim, 山崎浩史, 小森雅之, F. Peter Guengerich, 島田 力	128
食中毒を引き起こす有毒キノコの種特異的プライマーによるスクリーニング法の開発	野村千枝, 昌山 敦, 山口瑞香, 佐久間大輔, 梶村計志	128
5,6-ジヒドロチミジンを指標とした牛ミンチおよびエビの迅速かつ信頼性のある放射線照射履歴検知法の開発(英文)	福井直樹, 高取 聡, 北川陽子, 藤原拓也, 石川悦子, 藤山貴友, 梶村計志, 古田雅一, 尾花浩孝	129
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, 六鹿元雄, 阿部智之, 阿部 裕, 天野保希, 石原絹代, 大坂郁恵, 大野春香, 大野雄一郎, 尾崎麻子, 柿原芳輝, 小林 尚, 櫻木大志, 柴田 博, 城野克広, 関戸晴子, 高坂典子, 竹中 佑, 但馬吉保, 田中 葵, 田中秀幸, 外岡大幸, 中西 徹, 野村千枝, 羽石奈穂子, 早川雅人, 三浦俊彦, 山口未来, 渡辺一成, 佐藤恭子	129
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, 六鹿元雄, 阿部智之, 阿部 裕, 天野保希, 石原絹代, 大坂郁恵, 大野春香, 大野雄一郎, 尾崎麻子, 柿原芳輝, 小林 尚, 櫻木大志, 柴田 博, 城野克広, 関戸晴子, 高坂典子, 竹中 佑, 但馬吉保, 田中 葵, 田中秀幸, 中西 徹, 野村千枝, 羽石奈穂子, 早川雅人, 三浦俊彦, 山口未来, 山田恭平, 渡辺一成, 佐藤恭子	130
カカオ加工品中の小麦グルテン分析におけるポリビニルピロリドンの共存条件の最適化(英文)	
村上太郎, 工藤鮎子, 昌山 敦, 紀 正美, 山野哲夫	130
日本の市場に流通するサバ中のダイオキシン類(PCDDs, PCDFs および coplanar PCBs)について(英文)	
仲谷 正, 山野哲夫	131
トマトアレルギー Sola 11 の検出と加熱およびパパイン酵素処理後におけるその反応性評価(英文)	
清田恭平, 吉光真人, 村上太郎, 阿久津和彦, 梶村計志, 山野哲夫	131
クミルカルボキサミド型合成カンナビノイド薬物のカンナビノイド受容体に対する受容体機能評価(英文)	
浅田安紀子, 土井崇広, 田上貴臣, 武田章弘, 梶月由香, 川口正美, 中村暁彦, 沢辺善之	132
カルボキサミド型合成カンナビノイドの CB1/CB2 受容体活性化能: エナンチオマーによる活性の違いについて(英文)	
土井崇広, 田上貴臣, 武田章弘, 浅田安紀子, 沢辺善之	132
一般住民における尿中ピレスロイド代謝物のガスクロマトグラフィー/質量分析による定量(英文)	
吉田俊明	133
フタル酸エステル類の曝露指標としての尿中代謝物のガスクロマトグラフィー/質量分析による定量(英文)	
吉田俊明	133
液体クロマトグラフィータンデム質量分析による水道水中の臭素酸イオン分析条件の検討と妥当性評価	
小林憲弘, 小坂浩司, 浅見真理, 中川慎也, 木下輝昭, 高木総吉, 中島孝江, 古川浩司, 中村弘揮, 工藤清惣, 粕谷智浩, 土屋かおり, 寺中郁夫, 若月紀代子, 加登優樹, 小関栄一郎, 井上智, 村上真一, 金田 智, 関 桂子, 北本靖子, 堀池秀樹, 米久保淳, 清水尚登, 高原玲華, 齊藤香織, 五十嵐良明	134

浴槽水試料を対象としたレジオネラ属菌精度管理の試み

枝川亜希子, 城 美紀, 木村明生 134

ポータブル・マイクロ流路システムを用いた冷却塔水中の *Legionella pneumophila* の
迅速 on-site モニタリング (英文)

山口進康, 徳永佑亮, 後藤聡子, 藤井雄大, 阪野文哉, 枝川亜希子 135

ANNUAL REPORT OF OSAKA INSTITUTE OF PUBLIC HEALTH

CONTENTS

Original Articles

Epidemic and molecular epidemiological analysis of enterovirus infection in Osaka Prefecture (Fiscal 2017 Report) (in Japanese)	
K. NAKATA and T. YUMISASHI · · · · ·	1
Epidemic and molecular epidemiological analysis of norovirus outbreaks in case of food poisoning in Osaka Prefecture (Fiscal 2017 Report) (in Japanese)	
R. TAKADA, N. SAKON, K. NAKATA, K. MOTOMURA and T. YUMISASHI · · · · ·	10
Diversity of enteroviruses in sewage (in Japanese)	
R. TAKADA, K. NAKATA and T. YUMISASHI · · · · ·	18
Influenza activity during the 2017/2018 season in Osaka Prefecture (in Japanese)	
S. MORIKAWA, S. HIROI and T. YUMISASHI · · · · ·	26
Mosquito-borne virus surveillance in Osaka Prefecture (Fiscal 2017 Report) (in Japanese)	
I. AOYAMA, S.ONOUCHI, K. YAMAGUCHI and T. YUMISASHI · · · ·	36
Enteric pathogens detected during investigation of food poisoning outbreaks in Osaka City in 2017 (in Japanese)	
H. NAKAMURA, K. GOTO, K. UMEDA, K. YAMAMOTO, N. IRITANI, N. ABE, H. KUBO, A. KAIDA, S. YAMAMOTO, T. BABA, Y. HIRAI, A. HASE, T. HIRAYAMA, A. AKIYOSHI, K. YAMAZAKI and J. OGASAWARA · · · · ·	44
Validation study for analytical method of veterinary drugs in livestock products and seafood (in Japanese)	
M. YAMAGUCHI, Y. YOSHIDA, H. NAGAYOSHI, K. KAKIMOTO, I. SHIRAKAWA, Y. Kitagawa and K. KAJIMURA · · · · ·	53
Food-poisoning outbreak caused by potato (in Japanese)	
M. YAMAGUCHI, K. AWAZU, Y. TOKUNAGA, Y. KAKIMOTO, C. NOMURA and K. KAJIMURA · · · · ·	60

Case report of food poisoning caused by <i>Alocasia</i> in Osaka City (in Japanese)	
T. MURAKAMI, A. MASAYAMA, A. OSHIMA, T. NAKATANI and Y. YAMAGUCHI · · · · ·	63
Identification of <i>Alocasia odora</i> (Kuwazuimo in Japanese) using real-time PCR (in Japanese)	
C. NOMURA, A. MASAYAMA, T. MURAKAMI and K. KAJIMURA · · ·	68
Results of external quality control on the analytical measures for phenols in tap water, performed in 2016 in Osaka Prefecture (in Japanese)	
J. YOSHIDA and Y. KOIZUMI · · · · ·	74
Results of external quality control on the analytical measures for nitrite nitrogen and chloride ion in tap water, performed in 2016 in Osaka Prefecture (in Japanese)	
F. ADACHI and S. TAKAGI · · · · ·	83
Results of external quality control on the analytical measures for lead and organic substances (total organic carbon) in drinking water, performed in 2017 in Osaka Prefecture (in Japanese)	
T. NAKAJIMA, F. ADACHI and Y. KOIZUMI · · · · ·	91
Survey of environmental and food radioactivity in Osaka Prefecture (Fiscal 2017 Report) (in Japanese)	
M. OHYAMA, T. HIZUKA and A. KIMURA · · · · ·	100
Abstracts	
Production of a novel monoclonal antibody applicable for an immunochromatographic assay for <i>Kudoa septempunctata</i> spores contaminating the raw olive flounder (<i>Paralichthys olivaceus</i>)	
M. JINNAI, T. KAWAI, T. HARADA, Y. NISHIYAMA, H. YOKOYAMA, S. SHIRAKASHI, H. SATO, J. SAKATA, Y. KUMEDA, Y. FUKUDA, K. OGATA and K. KAWATSU · · · · ·	109
Comparison of listeriolysin O and phospholipases PlcA and PlcB activities, and initial intracellular growth capability among food and clinical strains of <i>Listeria monocytogenes</i>	
M. KANKI, H. NARUSE and K. KAWATSU · · · · ·	109
Prevalence and antimicrobial susceptibility of <i>Enterobacteriaceae</i> isolated from retail peppers in Vietnam	
T. HARADA, R. YAMANE, V. C. DANG, D. P. NGUYEN, T. A. D. NGUYEN, M. JINNAI, S. YONOGI, R. KAWAHARA, M. KANKI, T. KAWAI, K. KAWATSU, Y. KUMEDA, Y. ISEGAWA and Y. YAMAMOTO	110

Development of a rapid immunochromatographic assay to detect contamination of raw oysters with enteropathogenic <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	J. SAKATA, T. YONEKITA and K. KAWATSU	110
Food-borne outbreak of group G streptococcal pharyngitis in a school dormitory in Osaka, Japan	T. YAMAGUCHI, R. KAWAHARA, C. KATSUKAWA, M. KANKI, T. HARADA, S. YONOJI, S. IWASAKI, H. UEHARA, S. OKAJIMA, H. NISHIMURA, K. MOTOMURA, M. MIYAZONO, Y. KUMEDA and K. KAWATSU	111
Staphylococcal food poisoning caused by <i>Staphylococcus argenteus</i> harboring staphylococcal enterotoxin genes	Y. WAKABAYASHI, K. UMEDA, S. YONOJI, H. NAKAMURA, K. YAMAMOTO, Y. KUMEDA and K. KAWATSU	111
An infant with acute gastroenteritis caused by a secondary infection with a Rotarix-derived strain	N. SAKON, R. MIYAMOTO and J. KOMANO	112
High transmissibility of norovirus among infants and school children during the 2016/17 season in Osaka, Japan	N. SAKON, J. KOMANO, H.L. TESSMER and R. OMORI	112
Global spread of norovirus GII.17 Kawasaki 308, 2014–2016	M.C.W. CHAN, Y. HU, H. CHEN, A.T. PODKOLZIN, E.V. ZAYTSEVA, J. KOMANO, N. SAKON, Y. POOVORAWAN, S. VONGPUNSAWAD, T. THANUSUWANNASAK, J. HEWITT, D. CROUCHER, N. COLLINS, J. VINJÉ, X.L. PANG, B.E. Lee, M. de GRAAF, J. van BEEK, H. VENNEMA, M.P.G. KOOPMANS, S. NIENDORF, M. POLJSK-PRIJATELJ, A. STEYER, P.A. WHITE, J.H. LUN, J. MANS, T.N. HUNG, K. KWOK, K. CHEUNG, N. LEE and P.K.S. CHAN	113
Molecular evolution of the RNA-dependent RNA polymerase and capsid genes of human norovirus genotype GII.2 in Japan during 2004-2015	F. MIZUKOSHI, K. NAGASAWA, Y.H. DOAN, K. HAGA, S. YOSHIKUMI, Y. UEKI, M. SHINOHARA, M. ISHIKAWA, N. SAKON, N. SHIGEMOTO, R.O. NAKAGAWA, A. OCHI, K. MURAKAMI, A. RYO, Y. SUZUKI, K. KATAYAMA and H. KIMMURA	113
Evaluation of nucleic acid purification-free one-step real-time PCR kit for norovirus infection (in Japanese)	N. SAKON	114
Phylogeny and immunoreactivity of norovirus GII.P16-GII.2, Japan, winter 2016-17		

K. NAGASAWA, Y.MATSUSHIMA, T. MOTOYA, F. MIZUKOSHI, Y. UEKI, N. SAKON, K. MURAKAMI, T. SHIMIZU, N.OKABE, N. NAGATA, K. SHIRABE, H. SHINOMIYA, W. SUZUKI, M. KURODA, T. SEKIZUKA, A. RYO, K. FUJITA, K. OISHI, K. KATAYAMA and H. KIMURA	114
Genetic analysis of human norovirus strains in Japan in 2016-17	
K. NAGASAWA, Y.MATSUSHIMA, T. MOTOYA, F. MIZUKOSHI, Y. UEKI, N. SAKON, K. MURAKAMI, T. SHIMIZU, N.OKABE, N. NAGATA, K. SHIRABE, H. SHINOMIYA, W. SUZUKI, M. KURODA, T. SEKIZUKA, Y. SUZUKI, A. RYO, K. FUJITA, K. OISHI, K. KATAYAMA and H. KIMURA	115
Family <i>Astroviridae</i> (in Japanese)	
N. SAKON, R. FUJII and M. OSETO	115
Antiviral activity of acid beta-glucosidase 1 on enterovirus 71, a causative agent of hand, foot and mouth disease	
K. NAKATA, S. TAKEDA, A. TANAKA, J. KWANG and J. KOMANO	116
A family cases report of suspected import infection of EV-D68 (in Japanese)	
K. NAKATA, D. KANBAYASHI, S. MORIKAWA and M. OTSUKA.	116
Surveillance of adenovirus respiratory infections in children from Osaka, Japan	
S. HIROI, S. MORIKAWA, K. NAKATA and T. KASE	117
Laboratory findings from the measles outbreak at Kansai International Airport, 2016 (in Japanese)	
T. KURATA and K. MOTOMURA	117
Diagnostic value of rubella IgM antibody testing in adults (in Japanese)	
T. KURATA, K UCHINO, C. HOTTA, A. OGURA, T. MIYOSHI, T. OGAWA, T. TANAKA, T. YUMISASHI, D. KANBAYASHI and J. KOMANO	118
Impact of coxsackievirus A6 emergence on hand, foot, and mouth disease epidemic in Osaka City, Japan	
D. KANBAYASHI, A. KAIDA, SP. YAMAMOTO, Y. HIRAI, H. KUBO, R. FUJIMORI, N. HAKUI, H. HIROKAWA and N. IRITANI	118
A novel cell-based high throughput assay to determine neutralizing antibody titers against circulating strains of rubella virus	
D. KANBAYASHI, T. KURATA, K. TAKAHASHI, T. KASE and J. KOMANO	119

Molecular epidemiology of rubella virus strains detected around the time of the 2012-2013 epidemic in Japan	Y. MORI, M. MIYOSHI, M. KIKUCHI, M. SEKINE, M. UMEZAWA, M. SAIKUSA, Y. MATSUSHIMA, M. ITAMOCHI, Y. YASUI, D. KANBAYASHI, T. MIYOSHI, K. AKIYOSHI, C. TATSUMI, S. ZAITSU, M. KADOGUCHI, N. OTSUKI, K. OKAMOTO, M. SAKATA, K. KOMASE and M. TAKEDA	119
Mitochondrial damage elicits a TCDD-inducible poly (ADP-ribose) polymerase-mediated antiviral response	T. KOZAKI, J. KOMANO, D. KANBAYASHI, T. MISAWA, T. SATOH, O. TAKEUCHI, T. KAWAI, S. SHIMIZU, Y. MASTUURA, S. AKIRA and T. SAITOH	120
What's your diagnosis? Mite! Japanese pancake! (in Japanese)	T. NISHIZAWA, T. TANIURA, M. YAMADA, I. AOYAMA and T. YUMISASHI	120
A case of imported <i>Taenia asiatica</i> infection in Japan	H. NAMIKAWA, Y. TAKEMOTO, I. SHIMAZAKI, A. MAKUUCHI, M. KOBAYASHI, S. KINUHATA, K. YAMADA, H. FUJIMOTO, H. TOYODA, N. KAMATA, Y. TOCHINO, I. TERAMOTO, N. ABE, M. MORIMURA, H. KAKEYA and T. SHUTO	121
An imported case of Queensland tick typhus, 2016 (in Japanese)	A. MORIMURA, N. SHIRANO, K. KONISHI, Y. KASAMATSU, T. GOTO, N. ABE and S. ANDO	121
Anisakis haemoglobin is a main antigen inducing strong and prolonged immunoreactions in rats	N. ABE and I. TERAMOTO	122
Fungal contamination in wind instruments (in Japanese)	N. HAMADA and N. ABE	122
Molecular detection and characterization of <i>Anaplasma</i> species in wild deer and boars in Gifu Prefecture, Japan	K. MATSUO, J. MORIBE and N. ABE	123
Comparison of stomach contents between Japanese sardine <i>Sardinops melanostictus</i> and anchovy <i>Engraulis japonicus</i> using commercial fisheries together with the two species in the Japan Sea during spring (in Japanese)	T. BABA, H. MORIMOTO, T. GOTO, N. NANJO, M. ODA and Y. UENO	123

The first fatal case of <i>Corynebacterium ulcerans</i> infection in Japan	
K. OTSUJI, K. FUKUDA, T. ENDO, S. SHIMIZU, N. HARAYAMA, M. OGAWA, A. YAMAMOTO, K. UMEDA, T. UMATA, H. SEKI, M. IWAKI, M. KAMOCHI and M. SAITO · · · · ·	124
Molecular and epidemiological characterization of staphylococcal foodborne outbreak of <i>Staphylococcus aureus</i> harboring <i>seg</i> , <i>sei</i> , <i>sem</i> , <i>sen</i> , <i>seo</i> , and <i>selu</i> genes without production of classical enterotoxins	
K. UMEDA, H. NAKAMURA, K. YAMAMOTO, N. NISHINA, K. YASUFUKU, Y. HIRAI, T. HIRAYAMA, K. GOTO, A. HASE, J. OGASAWARA · · · · ·	124
White plant shoots, wax-producing insects and other white structures made by arthropods: a mimicry complex?	
K. YAMAZAKI · · · · ·	125
Disappearance of summer collection records in <i>Menochilus sexmaculatus</i> (Coleoptera: Coccinellidae) during climate warming	
Y. KAWAKAMI and K. YAMAZAKI · · · · ·	125
Distinct genetic clades of enterovirus D68 detected in 2010, 2013, and 2015 in Osaka City, Japan	
A. KAIDA, N. IRITANI, S.P. YAMAMOTO, D. KANBAYASHI, Y. HIRAI, M. TOGAWA, K. AMO, U. KOHDERA, T. NISHIGAKI, M. SHIOMI, S. ASAI, T. KAGEYAMA and H. KUBO · · · · ·	126
Ten-year surveillance of measles virus from 2007–2016 in Osaka City, Japan	
A. KAIDA, N. IRITANI, D. KANBAYASHI, S.P. YAMAMOTO, Y. HIRAI, N. HAKUI, R. FUJIMORI, H. MORI, H. HIROKAWA, J. OGASAWARA and H. KUBO · · · · ·	126
Problems and solutions of polyethylene glycol co-injection method in multiresidue pesticide analysis by gas chromatography-mass spectrometry: Evaluation of instability phenomenon in type II pyrethroids and its suppression by novel analyte protectants	
K. AKUTSU, Y. KITAGAWA, M. YOSHIMITSU, S. TAKATORI, N. FUKUI, M. OSAKADA, K. UCHIDA, E. AZUMA and K. KAJIMURA · · · · ·	127
Persistent organic pollutants in red-crowned cranes (<i>Grus japonensis</i>) from Hokkaido, Japan	
K. KAKIMOTO, K. AKUTSU, H. NAGAYOSHI, Y. KONISHI, K. KAJIMURA, N. TSUKUE, T. YOSHINO, F. MATSUMOTO, T. NAKANO, N. TANG, K. HAYAKAWA and A. TORIBA · · · · ·	127

Cytochrome P450 2A6 and other human P450 enzymes in the oxidation of flavone and flavanone	
K. KAKIMOTO, N. MURAYAMA, S. TAKENAKA, H. NAGAYOSHI, Y. R. LIM, V. KIM, D. KIM, H. YAMAZAKI, M. KOMORI, F. P. GUENGERICH and T. SHIMADA	128
PCR-based method for the detection of toxic mushrooms causing food-poisoning incidents (in Japanese)	
C. NOMURA, A. MASAYAMA, M. YAMAGUCHI, D. SAKUMA and K. KAJIMURA	128
Rapid and reliable method for determining irradiation histories of ground beef and prawns by measuring 5,6-dihydrothymidine	
N. FUKUI, S. TAKATORI, Y. KITAGAWA, T. FUJIWARA, E. ISHIKAWA, T. FUJIYAMA, K. KAJIMURA, M. FURUTA and H. OBANA	129
Interlaboratory study on evaporation residue test for food contact products (Report 1) (in Japanese)	
H. OHNO, M. MUTSUGA, T. ABE, Y. ABE, H. AMANO, K. ISHIHARA, I. OHSAKA, H. OHNO, Y. OHNO, A. OZAKI, Y. KAKIHARA, H. KOBAYASHI, H. SAKURAGI, H. SHIBATA, K. SHIRONO, H. SEKIDO, N. TAKASAKA, Y. TAKENAKA, Y. TAJIMA, A. TANAKA, H. TANAKA, H. TONOOKA, T. NAKANISHI, C. NOMURA, N. HANEISHI, M. HAYAKAWA, T. MIURA, M. YAMAGUCHI, K. WATANABE and K. SATO	129
Interlaboratory study on evaporation residue test for food contact products (Report 2) (in Japanese)	
H. OHNO, M. MUTSUGA, T. ABE, Y. ABE, H. AMANO, K. ISHIHARA, I. OHSAKA, H. OHNO, Y. OHNO, A. OZAKI, Y. KAKIHARA, H. KOBAYASHI, H. SAKURAGI, H. SHIBATA, K. SHIRONO, H. SEKIDO, N. TAKASAKA, Y. TAKENAKA, Y. TAJIMA, A. TANAKA, H. TANAKA, T. NAKANISHI, C. NOMURA, N. HANEISHI, M. HAYAKAWA, T. MIURA, M. YAMAGUCHI, K. YAMADA, K. WATANABE and K. SATO	130
An optimized extraction method for gluten analysis in cacao-containing products using an extraction buffer with polyvinylpyrrolidone	
T. SATSUKI-MURAKAMI, A. KUDO, A. MASAYAMA, M. KI and T. YAMANO	130
Polychlorinated dibenzo-p-dioxins, polychlorinated dibenzofurans and dioxin-like coplanar polychlorinated biphenyls in mackerel obtained from the Japanese market, 1999–2003	
T. NAKATANI and T. YAMANO	131
Detection of the tomato allergen Sola 1 1 and evaluation of its reactivity after heat and papain treatment	

K. KIYOTA, M. YOSHIMITSU, T. SATSUKI-MURAKAMI, K. AKUTSU, K. KAJIMURA and T. YAMANO	131
Cannabimimetic activities of cumyl carboxamide-type synthetic cannabinoids	
A. ASADA, T. DOI, T. TAGAMI, A. TAKEDA, Y. SATSUKI, M. KAWAGUCHI, A. NAKAMURA and Y. SAWABE	132
Evaluation of carboxamide-type synthetic cannabinoids as CB1/CB2 receptor agonists: difference between the enantiomers	
T. DOI, T. TAGAMI, A. TAKEDA, A. ASADA and Y. SAWABE	132
Analytical method for pyrethroid metabolites in urine of the non-occupationally exposed population by gas chromatography/mass spectrometry	
T. YOSHIDA	133
Analytical method for urinary metabolites as biomarkers for monitoring exposure to phthalates by gas chromatography/mass spectrometry	
T. YOSHIDA	133
Development and validation of an analytical method for bromate by liquid chromatography/tandem mass spectrometry (LC/MS/MS) (in Japanese)	
N. KOBAYASHI, K. KOSAKA, M. ASAMI, S. NAKAGAWA, T. KINOSHITA, S. TAKAGI, T. NAKAJIMA, K. FURUKAWA, H. NAKAMURA, K. KUDO, T. KASUYA, K. TSUCHIYA, I. TERANAKA, K. WAKATSUKI, Y. KADO, E. KOSEKI, S. INOUE, S. MURAKAMI, S. KANETA, K. SEKI, Y. KITAMOTO, H. HORIIKE, J. YONEKUBO, N. SHIMIZU, R. TAKAHARA, K. SAITIO and Y. IAKARASHI	134
External quality control for <i>Legionella</i> by culture method (in Japanese)	
A. EDAGAWA, M. JOH and A. KIMURA	134
Rapid on-site monitoring of <i>Legionella pneumophila</i> in cooling tower water using a portable microfluidic system	
N. YAMAGUCHI, Y. TOKUNAGA, S. GOTO, Y. FUJII, F. BANNO and A. EDAGAWA	135

大阪府におけるエンテロウイルス感染症の流行状況と分子疫学的解析 (2017年度)

中田恵子, 弓指孝博

2017年度に搬入された無菌性髄膜炎、手足口病またはヘルパンギーナ患者検体から検出された主要なウイルス遺伝子型はそれぞれ Enterovirus A71 (EV-A71) ;23%、Coxsackievirus A6 (CV-A6) ;62%、CV-A10; 33%であった。各ウイルス遺伝子型について Viral Protein 1 領域を用いて系統樹解析を行った結果、EV-A71 は全て遺伝子型グループ C に分類された。CV-A6 は2つのクラスターに分かれたが、うち1つは2011年に当課で分離された株と同じく2010年台湾株から構成されるクラスターから分岐していた。CV-A10は解析した5株のうち4株は一つのクラスターを形成したが、残りの1株は過去の中国株と近縁な株であった。各疾患の主要な原因ウイルスの遺伝子型および系統樹解析から得られた各ウイルス株の遺伝子情報の傾向が毎年異なるため、今後も引き続き動向を調査する必要があると考えられた。

キーワード：無菌性髄膜炎、手足口病、ヘルパンギーナ

毎年夏季に小児の患者数が増加するエンテロウイルス (Enterovirus; EV) 感染症の中で、無菌性髄膜炎、手足口病およびヘルパンギーナは「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律」において5類感染症の定点把握疾患に指定されている。各疾患で原因となるウイルス遺伝子型は年毎に変動があり、かつ疾患ごとに特徴がある¹⁾。また、特定のウイルス遺伝子型が中枢神経症状を引き起こしやすい等、遺伝子型と重症化との関連が疑われる²⁾ことや、流行するウイルス遺伝子型が一定の周期で繰り返す傾向が認められるため³⁾、予後や今後の流行を予測する観点から毎年の流行解析は重要である。そこで、2017年4月1日から2018年3月31日の間に無菌性髄膜炎、手足口病またはヘルパンギーナと診断された患者検体から検出されたウイルスと患者の疫学情報を集約し、EVの流行状況とウイルスの分子疫学的解析を実施したので報告する。

調 査 方 法

1. 検体・情報収集および統計解析

2017年4月1日から2018年3月31日の期間に、大阪府内(大阪市および堺市を除く)の定点医療機関から当課に搬入された無菌性髄膜炎、手足口病またはヘルパンギーナと診断された154名の患者から採取された217検体を対象とした。検体種別の内訳は髄液が46検体、咽頭拭い液および鼻汁等の呼吸器由来検体が130検体、消化器由来検体(糞便、腸内容物等)が30検体、尿が2検体、水疱擦過物が1検体、血液が8検体であった。患者の疫学情報(患者の年齢、性別、診断名、体温、発症日)は感染症法に基づく感染症発生動向調査事業によって得られた調査票より収集した。

大阪健康安全基盤研究所微生物部ウイルス課

2. 培養細胞によるウイルス分離

培養細胞によるウイルス分離には48ウェルプレートに播種したRD-A、VeroE6、FL、Caco-2細胞を用いた。咽頭拭い液（綿棒で咽頭等の病巣を擦過後、検体輸送用培地に浸漬した溶液）等の呼吸器由来検体や髄液は無処理でそれぞれ100 µlずつを各細胞に接種した。糞便は、緩衝液で10%懸濁液（糞便乳剤）を作製し、15,000 rpmで5分間遠心分離後、その上清を10倍希釈し、0.45 µm シリンジフィルターでろ過した溶液から100 µlを各細胞に接種した。各細胞へ検体接種後、37°CのCO₂インキュベーターで1週間培養し、細胞変性効果（CPE; cytopathic effect）を観察した。CPEが出現した場合に培養上清を回収した。なお、3代盲継代を繰り返し、CPEが出現しなかった場合を陰性と判定した。

3. 検体および培養上清からのウイルス遺伝子検出および系統樹解析

全ての検体（糞便は乳剤の遠心上清）から200 µlを採取し、RNA抽出用検体とした。RNA抽出は、Magtration®-MagaZorb RNA Common Kit（PSS社）を用いて、全自動核酸抽出装置 Magtration® System 6GCまたは12GC（PSS社）で行った。EVのViral Protein（VP）4-2領域に対するseminested RT-PCR⁴⁾を実施後、増幅産物のダイレクトシーケンスを実施し、BLAST 相同性検索にて遺伝子型を決定した。

また、培養細胞によるウイルス分離の結果、CPEが認められた場合は、培養上清から200 µlを採取し、上述の方法でRNAを抽出した。培養上清から抽出したRNAを用いてEVのVP1領域に対するRT-PCR⁵⁾を実施した。得られた増幅産物に対し、ダイレクトシーケンスを行ない、BLAST解析により遺伝子型別をするとともに、ClustalWを用いて系統樹解析を実施した。

4. 本研究は、地方独立行政法人大阪健康安全基盤研究所倫理審査委員会の承認を得て（承認番号1310-05-2）、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」を遵守して実施したものである。

1. 患者情報およびウイルスの検出状況

検体が採取された患者のうち、無菌性髄膜炎と診断されたのは41名で、年齢の中央値は1歳2か月（範囲：21日-47歳3か月）、性別は男性24名（59%）、女性17名（41%）であった。手足口病と診断された患者は84名で、年齢の中央値が1歳9か月（1か月-28歳）、性別は男性52名（62%）、女性32名（38%）であった。ヘルパンギーナと診断された患者は29名で、年齢の中央値は2歳（1か月-14歳10か月）、性別は男性13名（45%）、女性16名（55%）であった。無菌性髄膜炎、手足口病あるいはヘルパンギーナと診断された合計154名中、109名（71%）の患者から各種ウイルスが検出された。検出法別では遺伝子検査で陽性となった検体の割合が高く、217検体中126検体（58%）であった。一方で培養細胞による分離で陽性であったのは、39検体（18%）であった（表1-3）。

2. 疾患別ウイルス検出割合および検出ウイルス遺伝子型

無菌性髄膜炎患者の29%（12/41名）からEV、ライノウイルス（Rhinovirus；RV）、パレコウイルスA（Parecho virus A；Par-A）またはムンプスウイルス（Mumps virus；MuV）が検出された。検出割合が多い順に、EV-A71が23%（3/12名；1名は重複検出のため割合計算は3/13）、次いでエコーウイルス6型（Echovirus 6；Echo6）、Par-A3、MuV-Bがそれぞれ15%（各2/12名、割合計算は2/13）を占めた（図1）。EV-A71については呼吸器由来検体と髄液からは遺伝子が検出されたのみで、ウイルス分離はされなかったが、消化器由来検体からは2株分離された（表1）。

手足口病患者の90%（76/84名）からEV、RVまたはPar-Aが検出された。CV-A6が62%（50/76名、重複検出のため割合計算は50/80）と最も多く、次いでEV-A71が24%（19/76名、割合計算は19/80）を占めた（図2）。CV-A6では分離割合が非常に低いのに対し、EV-A71では遺伝子検出とウイルス分離の割合に大きな差はなかった（表2）。

ヘルパンギーナ患者の72%（21/29名）からEV、RVまたは単純ヘルペスウイルス1型（Herpes

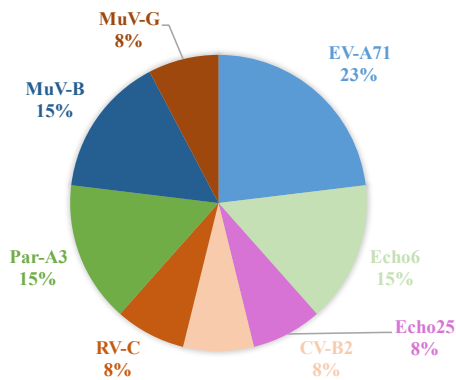


図1 無菌性髄膜炎患者から検出されたウイルス遺伝子型 (N=12; 重複検出があるため計算の分母は13として計算)

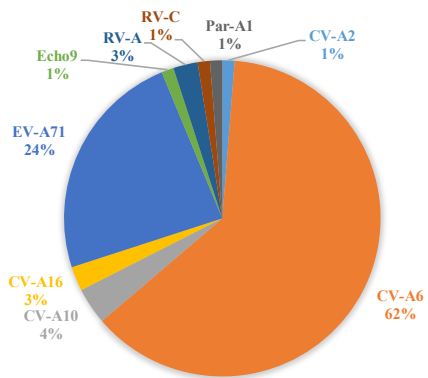


図2 手足口病患者から検出されたウイルス遺伝子型 (N=76 重複検出があるため計算の分母は80として計算)

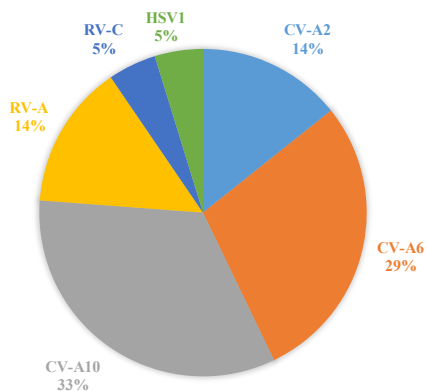


図3 ヘルパンギーナ患者から検出されたウイルス遺伝子型 (N=21)

simplex virus 1; HSV1) が検出された。検出が最も多かったのは CV-A10 で、33% (7/21 名)、次いで CV-A6 が 29% (6/21 名) を占めた (図3)。CV-A6 と CV-A10 を比較して、CV-A10 のウイルス分離の割合が高かった (表3)。EV 感染症3疾患の中でヘルパンギーナ患者の呼吸器由来検体からのウイルス分離の割合が最も高かった (表1-3)。

3. 疾患別月別の検出 EV の遺伝子型

無菌性髄膜炎患者由来検体からの EV の検出は非常に少なく、6月から12月に検出された EV はそれぞれ1株ずつであった。最も多く検出された EV-A71 は7月から10月まで毎月検出された (図4)。手足口病患者由来検体からは4月から9月まで CV-A6 が主に検出され、検出のピークは7月であった。EV-A71 は5月より11月に検出され、CV-A6 の検出のピークであった7月には検出されなかった (図5)。ヘルパンギーナ患者由来検体から検出された CV-A6 についても手足口病患者由来検体からの検出傾向と同様で、7月の検出が最も多かった。一方、CV-A10 の検出は8月以降で、11月に最も多く検出された (図6)。

4. EV-A71、CV-A6 および CV-A10 の系統樹解析

今回分離した EV-A71 の13株 (548nt)、CV-A6 の6株 (655nt) および CV-A10 の5株 (617nt) に過去に当課で分離したそれぞれの株を加えて遺伝子型ごとに系統樹解析を実施した。ウイルス抗原決定領域である VP1 領域の遺伝子解析が実施可能であった EV-A71 の13株は全て遺伝子型 C で12株は2016年度の当課分離株や2015年のドイツ株、2016年のポーランド株、アメリカ株と同じクラスターを形成したが、1株のみ2013年度当課分離株とクラスターを形成した (図7)。

CV-A6 の6株は4株と2株がそれぞれ異なるクラスターに分類された (それぞれクラスター1と2、図8)。クラスター1は、2015年のタイ株と近縁で、2015年度に当課で分離された株や2013年中国株、マレーシア株、2014年のタイ株とも近縁であった。クラスター2は2011年度の当課分離株および2010年の台湾株と近縁であった (図8)。CV-A10 の5株のうち4株は一つの

表 1 無菌性髄膜炎患者由来検体におけるウイルス検出結果

	呼吸器由来検体 (咽頭ぬぐい液、鼻汁、うがい液) n=19		消化器由来検体 (糞便、直腸ぬぐい液) n=21		髄液 n=43		血液 n=6		尿 n=2	
	遺伝子検査	分離培養	遺伝子検査	分離培養	遺伝子検査	分離培養	遺伝子検査	分離培養	遺伝子検査	分離培養
EV-A71	2	0	3	2	1	0	0	0	0	0
Echo6	0	0	1	1	1	2	0	0	0	0
Echo25	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
CV-B2	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0
RV-A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RV-C	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Par-A3	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0
MuV-B	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0
MuV-G	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
合計(%)	6(32)	0(0)	7(33)	4(19)	6(14)	2(5)	1(17)	1(17)	0(0)	0(0)

一人の患者より複数の検体の提出あり
 一種類の検体より複数のウイルスの検出あり

表 2 手足口病患者由来検体におけるウイルス検出結果

	呼吸器由来検体 (咽頭ぬぐい液、鼻汁、うがい液) n=84		消化器由来検体 (糞便、直腸ぬぐい液) n=7		髄液 n=3		血液 n=2		水疱内容 n=1	
	遺伝子検査	分離培養	遺伝子検査	分離培養	遺伝子検査	分離培養	遺伝子検査	分離培養	遺伝子検査	分離培養
CV-A2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
CV-A6	50	4	6	0	0	0	1	0	1	0
CV-A10	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0
CV-A16	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0
EV-A71	17	12	0	0	0	0	0	0	0	0
Echo9	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
RV-A	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RV-C	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Par-A1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
合計(%)	78(93)	21(25)	6(86)	0(0)	0(0)	0(0)	1(50)	0(0)	1(100)	0(0)

一人の患者より複数の検体の提出あり
 一種類の検体より複数のウイルスの検出あり

表 3 ヘルパンギーナ患者由来検体におけるウイルス検出結果

	呼吸器由来検体 (咽頭ぬぐい液、鼻汁、うがい液) n=27		消化器由来検体 (糞便、直腸ぬぐい液) n=2	
	遺伝子検査	分離培養	遺伝子検査	分離培養
CV-A2	3	1	0	0
CV-A6	5	2	1	0
CV-A10	7	6	0	0
RV-A	3	1	0	0
RV-C	1	0	0	0
HSV1	0	1	0	0
合計(%)	19(70)	11(41)	1(50)	0(0)

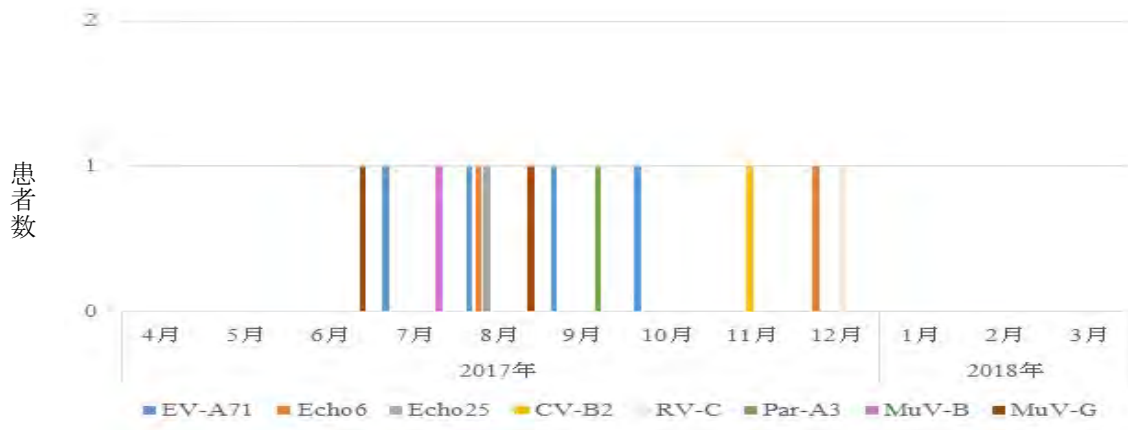


図4 無菌性髄膜炎患者から検出された月別検出ウイルス遺伝子型

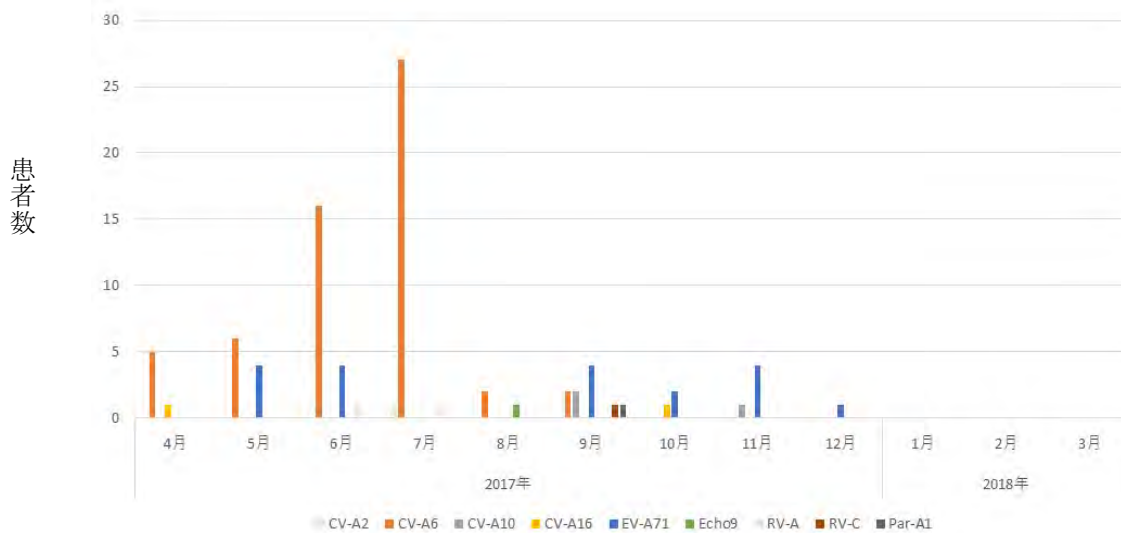


図5 手足口病患者から検出された月別検出ウイルス遺伝子型

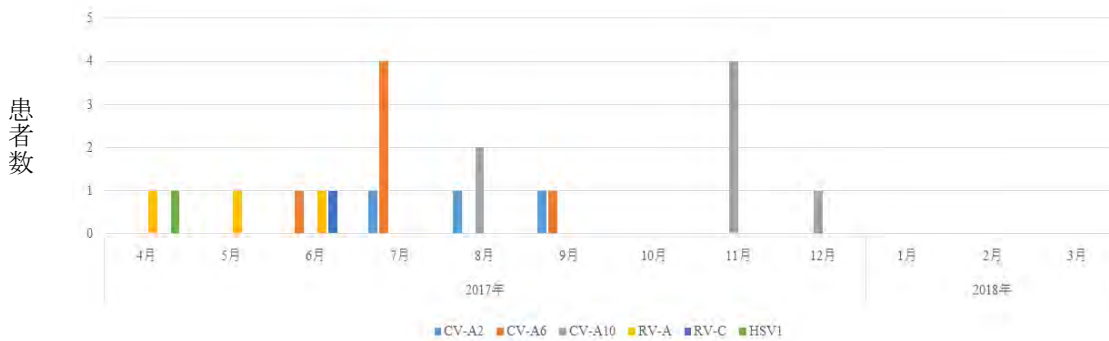


図6 ヘルパンギーナ患者から検出された月別検出ウイルス遺伝子型

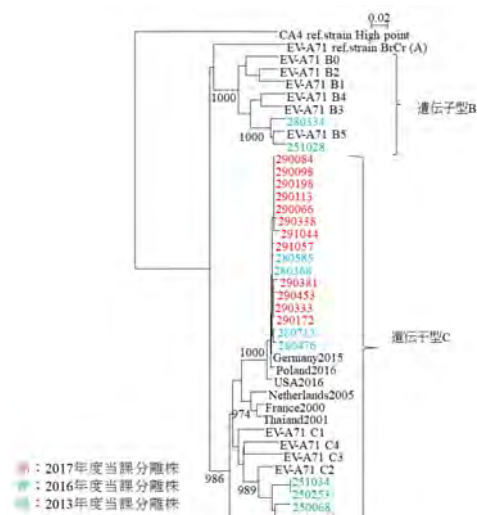


図7 EV-A71 の系統樹 (548nt)

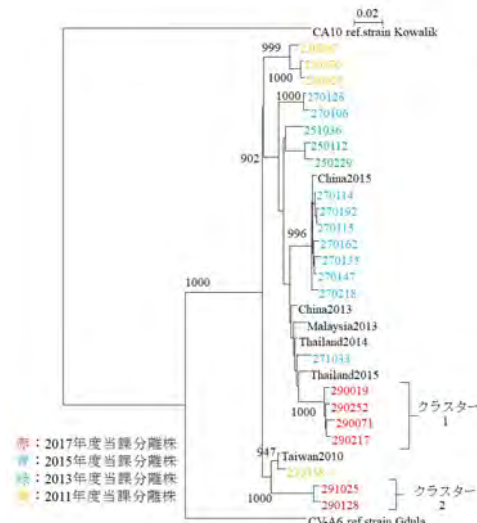


図8 CV-A6 の系統樹解析 (655nt)

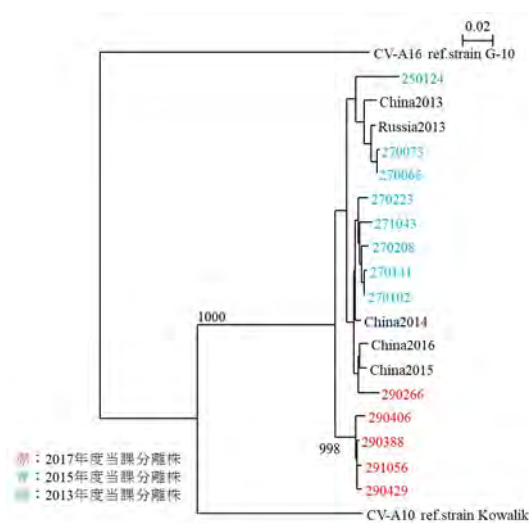


図9 CV-A10 の系統樹解析 (617nt)

クラスターを形成したが、1株は2014、2015、2016年の中国株と2015年度の当課分離株を含むクラスターに分類された(図9)。

考察

2017年度は手足口病の流行が2011年度に次いで大きかった(大阪府感染症情報センターホームページ:HP)そのため、EV感染症の3疾患のうち手足口病患者由来の検体数が最も多く、患者からのウイルスの検出割合も90%と非常に高かった。手足口病のウイルス検出割合が高かったのは、手足口病の流行が大きい年では、症状が特徴的である患者が多く、他の原因による発疹症患者と区別しやすいため、他疾患の患者由来検体が混在する割合が低かったのが要因であると考えられた。検出されたウイルス遺伝子型で主要であったCV-A6は7月に検出のピークを示し、10月以降は検出されなくなった(図5)。これは夏季を流行のピークとしている手足口病の典型的な流行パターンに合致していた。一方、次いで高い割合で検出されたEV-A71は、5月から11月までの期間に、8月以外の毎月、数株程度持続して検出された(図5)。これらの結果から、2017年度は2つの遺伝子型のウイルスが混合で流行したことで流行規模が拡大したと考えられた。

無菌性髄膜炎は近年大きな流行はなく(HP)、2017年度は患者からのウイルスの検出割合は29%と低かった。無菌性髄膜炎のウイルス検出割合が低かったのは、手足口病やヘルパンギーナとは異なり、症候群である無菌性髄膜炎ではEV以外のウイルスや感染症以外が原因である患者由来の検体が混在している割合が他のEV感染症疾患と比較して高いことが要因であると考えられた。月別の検出では毎月種々のウイルス遺伝子型が1株ずつ検出されており、その中でEV-A71は7月から10月まで連続して検出された(図4)。手足口病の主要な原因がEV-A71のシーズンでは無菌性髄膜炎の合併症が増加することが報告されている⁶⁾。EV-A71感染症では急性脳炎・脳症や死亡事例などの報告⁷⁾があることから手足口病の原因ウイルス遺伝子型と無菌性髄膜炎の患者から検出されるウイルス遺伝子型は注視する必要がある。2017年度は手足口

病の主要な原因が EV-A71 のシーズンではなかったため、無菌性髄膜炎患者の顕著な増加がなかったと考えられた。

2017 年度はヘルパンギーナの流行も低調であった (HP)。患者から最も多く検出されたウイルス遺伝子型は CV-A10 (33%) であったが、次いで多かったのは CV-A6 (29%) であった (図 3)。CV-A6 は手足口病の患者から最も多く検出されたが、ヘルパンギーナ患者でも手足口病患者からと同様に検出のピークは 7 月であった (図 6)。

2011 年度の CV-A6 を原因とする手足口病の大流行以前は、CV-A6 はヘルパンギーナの原因として広く知られていた⁷⁾。2011 年度以降は 2013 年度および 2015 年度に CV-A6 による手足口病の流行が認められたが⁸⁻¹⁰⁾、それぞれの年においてヘルパンギーナの患者からも CV-A6 が検出されていた。そのため、2011 年度以降、CV-A6 は手足口病とヘルパンギーナ両方の症状を引き起こす病原体として認識されている⁷⁾。従って、2017 年度も両疾患からの CV-A6 の検出状況から同様の傾向であったと考えられた。

検査方法ではウイルス分離よりも、遺伝子検査での陽性割合がいずれの疾患でも高かったが、特に CV-A6 についてはウイルス分離の成績が悪かった (表 1、2、3)。しかし、異なるウイルス遺伝子型が重複感染している際には遺伝子検査だけでなくウイルス分離など原理の異なる複数の検査法を用いることで検出可能性が高くなると考えられる。また、感染を証明するためには、ウイルス分離が必須であることを考慮してもウイルス分離を実施する意義は高い。なお、ウイルス分離を実施する際、株化細胞による分離効率の低い CV-A6 のようなウイルスに対しては必要に応じて、哺乳マウスによるウイルス分離を実施する必要があると考えられた。

CV-A6 の系統樹解析の結果、2017 年度の 6 株のうち 4 株がクラスター 1 に 2 株がクラスター 2 に分類された (図 8)。クラスター 1 は 2017 年度の分離株に加えて 2015 年度の当課分離株と 2013 年から 2015 年までの近隣諸外国株で形成された。また、クラスター 1 は 2011 年度、2013 年度、2015 年度の当課分離株のクラスターから順に分岐して形成されていることから、流行ごとに変異を繰り返して、今シーズンの流行株が形成されたと考えられた。一方、クラスター 2 は 2011

年度当課分離株と 2010 年の台湾株から構成されるクラスターから分岐した。このことから、クラスター 2 の流行株は、クラスター 1 とは異なる変異をした株であると考えられる。2017 年度に CV-A6 が検出された手足口病やヘルパンギーナの患者数が多かったのは、シーズン中に異なる 2 つの系統の株が流行に寄与したことが原因の 1 つだと考えられた。CV-A10 の解析結果もまた 2017 年度流行株は 2 つのクラスターに分かれた (図 9)。5 株のうち 1 株は 2015 年度当課分離株や 2014 から 2016 年までの中国株とクラスターを形成し、残りの 4 株は 2017 年度流行株のみでクラスターを形成した。CV-A6 は 2011 年度流行株から順に流行ごとに変異を繰り返したと考えられる解析結果であったが、CV-A10 は 2015 年度分離株も 2 つのクラスターに分かれ、そのうち 1 つのクラスターに 2017 年度株が分類されていた。この流行株の傾向は CV-A6 とは異なっていた (図 8、9)。2017 年度の EV-A71、13 株のうち 12 株は 2015 年から 2016 年までのドイツ、ポーランド、アメリカ株および 2016 年度当課分離株と同じクラスターを形成したが、1 株は 2013 年度当課分離株と同じサブグループ (C2) に分類された (図 7)。2013 年度や 2016 年度の流行株には遺伝子型グループ C と B の 2 系統が認められ、2017 年度分離株は全て C に分類されたものの、異なるサブクラスターに分類された株が認められた。これらの結果から EV-A71 は流行の規模に関わらず、一つのシーズン中に多様な系統の株が循環すると考えられた。EV-A71、CV-A6 および CV-A10 の解析結果のいずれにおいても 2017 年度流行株のクラスターに諸外国の株が分類されていた (図 7、8、9)。これは、国内の EV 感染症の流行に海外からの輸入株が寄与していることを示唆している。従って、今後は国内の流行解析に加えて世界的な EV 感染症の動向を注視する必要があると考えられた。

今年度の結果からも EV 感染症は疾患ごとや年によって主なウイルス遺伝子型や系統樹解析から得られる遺伝子情報の傾向が異なることが明らかとなった。EV 感染症は、流行する遺伝子型によって症状や疫学的動向も異なり、さらに、遺伝子型によっては特定の検出法を検討する必要があることから、引き続き複数の検査方法を用いて検査を継続することが重要である。また、

流行状況に合わせた検査情報を発信し、流行予測および流行拡大の防止のための啓発に役立つ必要があると考えられた。

謝 辞

感染症発生動向調査事業に基づき、患者検体を提出していただいた医療機関の先生方に深謝いたします。

利 益 相 反

開示すべき利益相反はない。

文 献

- 1) Heinz Z and Hans-Peter G. Clinical virology manual Fourth edition-Enteroviruses. American society for microbiology, Wasington, D. C; 2000; 252-69.
- 2) Jones E, Pillay TD, Liu F, Luo L, Bazo-Alvarez JC, Yuan C, Zhao S, Chen Q, Li Y, Liao Q, Yu H, Rogier van Doorn H, Sabanathan S. Outcomes following severe hand foot and mouth disease: A systematic review and meta-analysis. *Eur J Paediatr Neurol* doi: 10.1016/j.ejpn.2018.
- 3) Abedi GR, Watson JT, Nix WA, Oberste MS, Gerber SI. Enterovirus and Parechovirus Surveillance - United States, 2014-2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2018; **67**(18): 515-518.
- 4) 石古博昭, 島田康司, 輿那覇麻理, 栄賢司. 遺伝子系統解析によるエンテロウイルスの同定. *臨床とウイルス* 1999; **27**(4): 283-293.
- 5) Oberste MS, Maher K, Kilpatrick DR, Pallansch MA. Molecular evolution of the human enteroviruses: correlation of serotype with VP1 sequence and application to picornavirus classification. *J Virol* 1999; **73**(3): 1941-1948.
- 6) 清水博之. 東アジアにおけるエンテロウイルス 71 型感染症の流行. *病原微生物検出情報月報 (IASR)* 2009; **30**: 9-10.
- 7) Ogi M, Yano Y, Chikahira M, Takai D, Oshibe T, Arashiro T, Hanaoka N, Fujimoto T, Hayashi Y. Characterization of genome sequences and

clinical features of coxsackievirus A6 strains collected in Hyogo, Japan in 1999-2013. *J Med Virol* 2017; **89**(8): 1395-1403.

- 8) 中田恵子, 山崎謙治, 左近直美, 加瀬哲男. 大阪府におけるエンテロウイルス検出状況と分子疫学的解析 (2011 年度). *大阪府立公衆衛生研究所所報 (平成 24 年度)* 2012; 8-13.
- 9) 中田恵子, 山崎謙治, 左近直美, 駒野淳, 加瀬哲男. 大阪府におけるエンテロウイルス感染症の流行状況と分子疫学的解析 (2013 年度). *大阪府立公衆衛生研究所所報 (平成 26 年度)* 2014; 7-14.
- 10) 中田恵子, 左近直美, 弓指孝博, 加瀬哲男. 大阪府におけるエンテロウイルスの検出状況と分子疫学的解析 (2015 年度). *大阪府立公衆衛生研究所所報 (平成 28 年度)* 2016; 9-16. 「WEB サイトの内容は 2018 年 5 月 28 日に確認した」

**Epidemic and molecular epidemiological analysis of enterovirus infection in Osaka Prefecture
(Fiscal 2017 Report)**

Keiko NAKATA ^a and Takahiro YUMISASHI ^a

During April 2017 to March 2018, the most frequent viral types detected from patient specimens for aseptic meningitis, Hand, foot and mouth disease and herpangina were Enterovirus A71(EV-A71) ; 23%, Coxsackievirus A6 (CV-A6) ; 62% and CV-A10; 33%, respectively. The phylogenetic trees constructed on the partial VP1 region indicated that the all EV-A71 strains of 2017 were classified into genotype C. CV-A6 strains were divided into two clusters , one of which was diverged from those detected in the Osaka in 2011 and Taiwan in 2010. The most epidemic strains of CV-A10 in 2017 formed one cluster, but a strain was closely related to CV-A 10 previously identified in China. The main cause viruses of aseptic meningitis, Hand, foot and mouth disease and herpangina are rich in diversity on every year. As the changes of the dynamics of the epidemic viruses can be elucidated by analyzing viral genomes, it is necessary to continue this pathogen surveillance.

Key words : Aseptic meningitis, Hand, foot and mouth disease, Herpangina

a Osaka Institute of Public Health

大阪府における食中毒事例から検出されたノロウイルスの流行状況と 分子疫学的解析 (2017 年度)

高田利香, 左近直美, 中田恵子, 本村和嗣, 弓指孝博

2017 年度、食中毒事例（疑い、有症苦情、他府県依頼分を含む）62 事例中 25 事例（40.3%）からノロウイルスを検出した。ノロウイルス陽性事例について、ORF2 キャプシドタンパク質 N/S 領域（282 塩基）の遺伝子型別を実施し、分子疫学的解析を行なった。最も多く検出された遺伝子型は GII.4 Sydney_2012 亜型（16 事例、64.0%）、次いで GII.17（4 事例、16.0%）、GII.2（2 事例、8.0%）と続いた。上位 2 つの遺伝子型であった GII.4 Sydney_2012 亜型および GII.17 は、RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ（RdRp）領域（805 塩基）に基づいて RdRp 型を決定および VP1 全領域（1623 塩基）の解析を行った。RdRp 領域を組み合わせた遺伝子型は、GII.4 Sydney_2012 亜型は GII.Pe-GII.4 Sydney_2012 亜型 14 事例、GII.P16-GII.4 Sydney_2012 亜型 2 事例で、GII.17 はすべて GII.P17-GII.17 であった。系統樹解析の結果、VP1 領域について、GII.4 Sydney_2012 亜株および GII.17 株はそれぞれ同じクラスターに分類され、GII.4 Sydney_2012 亜株は *Norovirus* GII/Hu/AU/2012/GII.4/Sydney/NSW0514 に、GII.17 株は *Norovirus* Hu/GII/JP/2015/GII.P17-GII.17/Kawasaki308 に近縁な株であった。

キーワード：ノロウイルス、食中毒、遺伝子型

ノロウイルスは秋冬季を中心に嘔吐・下痢などの症状を起こす感染性胃腸炎の起因ウイルスである¹⁾。ヒトへの感染経路は主に経口感染であり、ノロウイルスに汚染された二枚貝や、食品従事者の汚染された手指によって調理された食材の喫食による場合や、患者の便や嘔吐物からヒトの手指を介して二次感染する場合などがある。ノロウイルスは食中毒の病因物質として最も多く報告されており²⁾、流行状況を把握することは食中毒防止対策など食品衛生管理において重要である。

ノロウイルスはカリシウイルス科に分類されるプラス一本鎖 RNA ウイルスで、粒子は直径 38 nm の正二十面体である。塩基配列の違いにより、GI から GVII³⁾までの遺伝子群があり、このうち人に感染するのは主に GI および GII で、遺伝学的に多様であるため同グループ内においても後

述の VP1 の完全長塩基配列をもとに GI は 9、GII は 22 の遺伝子型に分類される^{1,4)}。同ゲノムは約 7500 塩基であり、3 つの蛋白質翻訳領域（ORF : Open Reading Frame）で構成されている。ORF1 は、ウイルスの複製に関与する非構造蛋白質を、ORF2 および ORF3 はそれぞれウイルス粒子を構成するキャプシドタンパク質 VP1、VP2 をコードしている。VP1 は抗原性に関わっている部位であり^{1,5)}、この部位のアミノ酸置換により抗原性を変化させ免疫機構から逃れる抗原連続変異を起こす。また ORF1 と ORF2 のジャンクション領域を基点とするゲノムの組換え（リコンビネーション）が起こりやすく、病原性が変化した新たな性質を持ったノロウイルスが発生すると考えられているため^{6,7)}、ORF2 の VP1 領域だけでなく、ORF1 の 3' 側に位置する RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ（RdRp）領域を含めた遺伝子

大阪健康安全基盤研究所微生物部ウイルス課

解析を行うことが推奨されている⁸⁾。そこで、2017年度の食中毒事例において検出されされたノロウイルスについて、VP1領域とRdRp領域を組み合わせた遺伝子解析および分子疫学的解析の結果と流行状況の特徴について報告する。

調査方法

1. 検査材料

2017年4月から2018年3月までの間に当課に搬入された食中毒事例（疑い、有症苦情、他府県依頼分を含む）62事例334検体のうち、厚生労働省通知の検査法⁹⁾に準拠したリアルタイムPCR法によりノロウイルス遺伝子が検出された25事例を対象とした。

2. ノロウイルスの遺伝子解析

各ノロウイルス陽性事例から数検体を選択し、遺伝子解析を行った。ORF2のキャプシドN/S領域に対し、ノロウイルスGIはG1-SKF/G1-SKR、ノロウイルスGIIはG2-SKF/G2-SKRのプライマーを用いた¹⁰⁾。

ノロウイルスGII陽性検体の一部は、さらにORF1のRdRp領域についてYURI22F/G2-SKR、ORF2のVP1領域についてG2-SKF/TX30SXNのプライマーを用いて解析を行った^{11,12)}。（図1）

各プライマーを用いてPCRを実施し、電気泳動で目的とするPCR増幅産物を確認した後ゲルを切り出した。BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied biosystems) を用いたダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定し、Norovirus Typing Tool Version 2 (<http://www.rivm.nl/mpf/typingtool/norovirus/>)により遺伝子型を決定した。

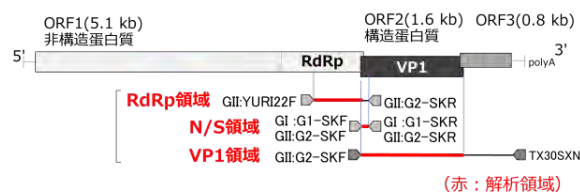


図1 ノロウイルスゲノム構造と解析領域

3. 系統樹解析

GII.4 Sydney_2012 亜型および GII.17 のノロウイルス陽性事例から1検体を選択し、RdRp領域（805塩基）およびVP1領域（1623塩基）について系統樹解析を行った。解析についてはMEGA7 (<http://www.megasoftware.net/index.php>)を用い、最尤法（Maximum-Likelihood法）で系統樹解析を行った。

4. 統計データ

ノロウイルス食中毒事件数および患者数のデータは、厚生労働省の食中毒統計データ²⁾を基にし、年度別（4月から翌3月まで）に集計を行った。

5. 本研究は、地方独立行政法人大阪健康安全基盤研究所倫理審査委員会の承認を得て（承認番号1710-03-2）、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」を遵守して実施したものである。

結果

1. ノロウイルスの検出状況

検出された遺伝子型は5種類あり、GII.4 Sydney_2012 亜型が16事例（64.0%）、GII.17が4事例（16.0%）、GII.2が2事例（8.0%）、GI.7およびGI.3がそれぞれ1事例（4.0%）、混合事例（GI.7/GII.17）が1事例であった。

2018年1月に最も事例数が多く、2017年12月から2018年3月までに事例の76%が発生した。（図2）

検出された遺伝子型を月別にみると、2017年4月から12月まではGII.4 Sydney_2012 亜型のみが検出され、2018年1月以降、GII.4 Sydney_2012 亜型に加えて他の遺伝子型が検出された。

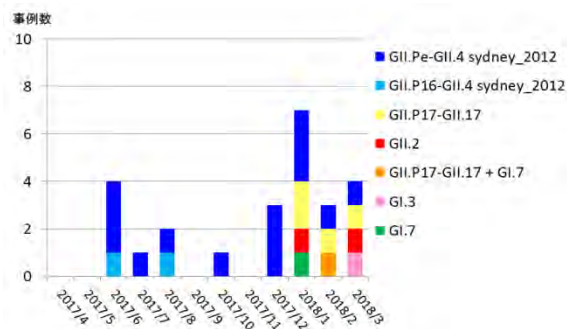


図2 月別ノロウイルス遺伝子型検出状況

2. RdRp 領域とキャプシド N/S 領域を組み合わせた遺伝子型別

上位 2 つの遺伝子型である GII.4 Sydney_2012 亜型および GII.17 について、RdRp 領域を組み合わせた型別を行なった。

GII.4 Sydney_2012 亜型は 2 つに分かれ、GII.Pe-GII.4 Sydney_2012 亜型が 14 株、GII.16-GII.4 Sydney_2012 亜型が 2 株であった。GII.16-GII.4 Sydney_2012 亜型は、2017 年 6 月と 8 月に検出された株であった。GII.17 は、5 株すべて GII.P17-GII.17 であった。(図 2)

3. 系統樹解析

GII.4 Sydney_2012 亜型および GII.17 について塩基配列に基づき系統樹解析を行った。(●は当該検出株)

RdRp 領域において、GII.4 Sydney_2012 亜株 (n=16) は、GII.Pe (n=14) と GII.P16 (n=2) の

クラスターに分かれた。GII.Pe は Norovirus GII/Hu/AU/2012/GII.4/Sydney/NSW0514

(JX459908) に近縁 (塩基配列相同性 97.5~98.6%) で、GII.P16 は Norovirus GII/Hu/JP/2016/GII.P16-GII.4 Sydney_2012/OH16002 (LC153121) に近縁 (塩基配列相同性は 97.7~98.0%) であった。GII.17 株 (n=5) はすべて GII.P17 のクラスターに分類され、Norovirus Hu/GII/JP/2015/GII.P17-GII.17/Kawasaki308 (LC037415) に近縁 (塩基配列相同性は 99.6%) であった。(図 3)

一方、VP1 領域において GII.4 Sydney_2012 亜株 (n=15) は、すべて同じクラスターに分類され Norovirus GII/Hu/AU/2012/GII.4/Sydney/NSW0514 (JX459908) に近縁 (塩基配列相同性 96.6~97.9%) であった。GII.17 株 (n=5) は、Norovirus Hu/GII/JP/2015/GII.P17-GII.17/Kawasaki308 (LC037415) に近縁 (塩基配列相同性 99.3~99.6%) であった。(図 4)

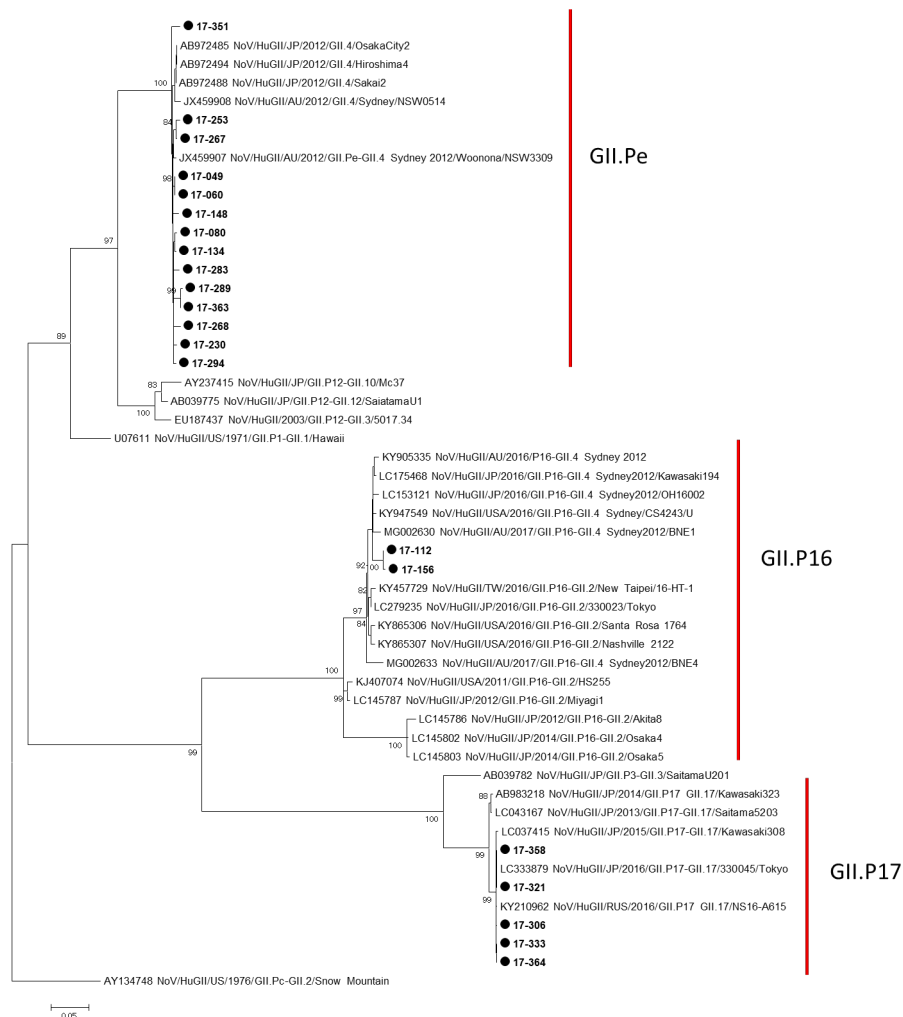


図 3 GII.4 Sydney_2012 亜型および GII.17 の系統樹 (RdRp 領域 805 塩基)

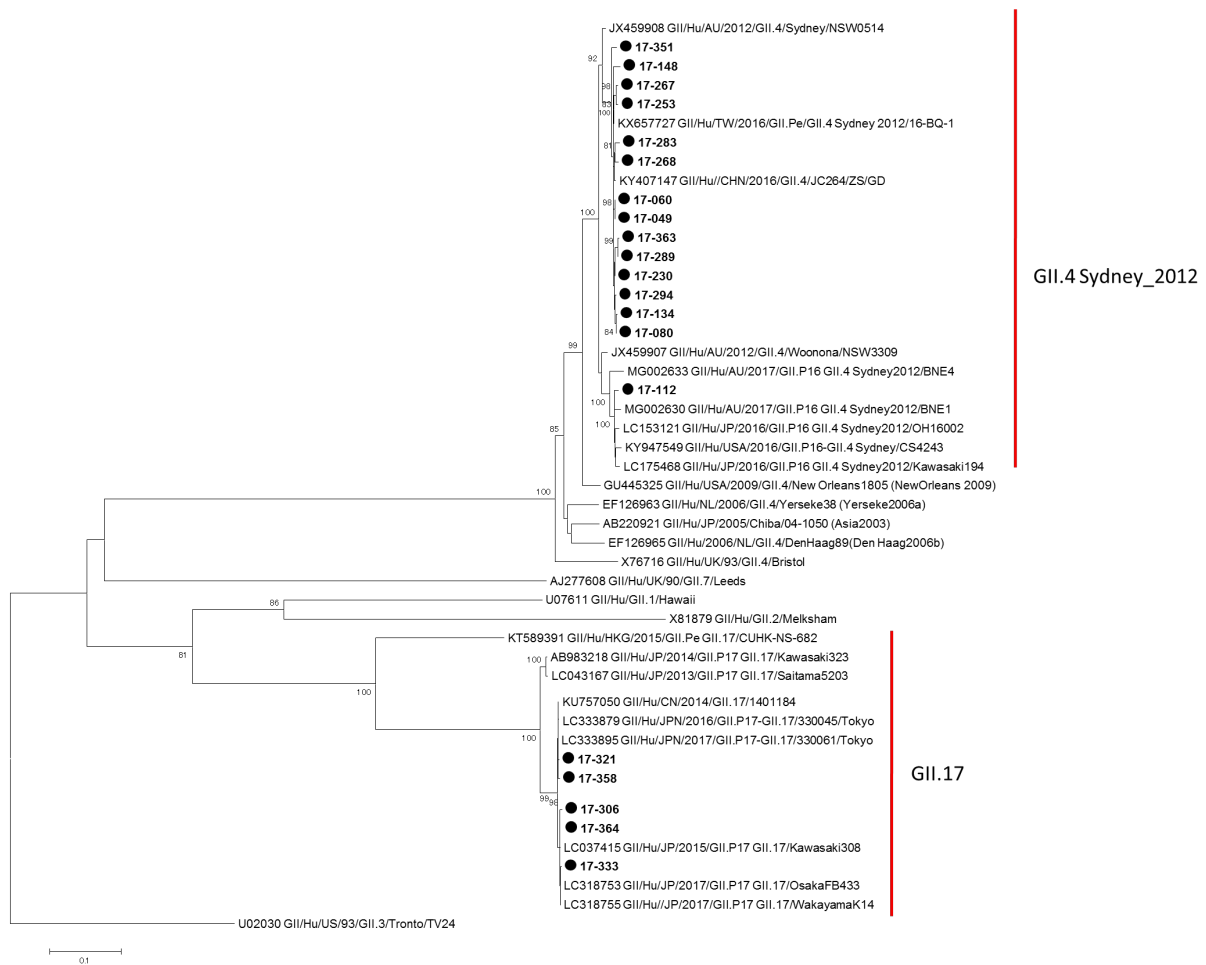


図4 GII.4 Sydney_2012 亜型および GII.17 の系統樹 (VP1 領域 1623 塩基)

4. 大阪府全域および全国におけるノロウイルス食中毒事件数およびその患者数の推移

2006年度から2017年度までの大阪府全域および全国におけるノロウイルス食中毒事件数およびその患者数の推移と、ノロウイルスの変異株が出現した時期を示した。(図5)

2017年度は2016年度と比較して、ノロウイルス食中毒事件数およびノロウイルス食中毒患者数とも減少した。また食中毒事件数および患者数は、ともに2006年度以降で最も少なかった。

考 察

2017年度は GII.4 Sydney_2012 亜型が事例の半数以上で検出され、GII.16-GII.2 キメラウイルス株が流行した2016年度とは異なる傾向が見られた¹³⁾。

系統樹解析の結果、 GII.4 Sydney_2012 亜型は

GII.Pe および GII.P16 の RdRp 型別に伴って2つのクラスターに分かれた。 GII.Pe-GII.4 Sydney_2012 亜型は、2012年に新たな変異株として出現し世界中で流行して以降、毎シーズン検出されている^{14,15)}。一方、 GII.P16-GII.4 Sydney_2012 亜型は2016年に GII.4 Sydney_2012 亜型のキメラウイルスとして報告されており^{16,17)}、2016年後半以降、ヨーロッパやアメリカ、オーストラリアなどでは GII.P16-GII.4 Sydney_2012 亜型の流行が報告されている¹⁸⁻²¹⁾。

当課においては、2016年度は GII.P16-GII.4 Sydney_2012 亜型の検出はなく¹³⁾、2017年度は6月および8月に1事例ずつ検出されたが冬季には検出されず、この遺伝子型の流行は見られなかった。しかし国外で流行している遺伝子型が我が国でも流行する可能性は十分に考えられるため、今後も動向に注視する必要があると考える。

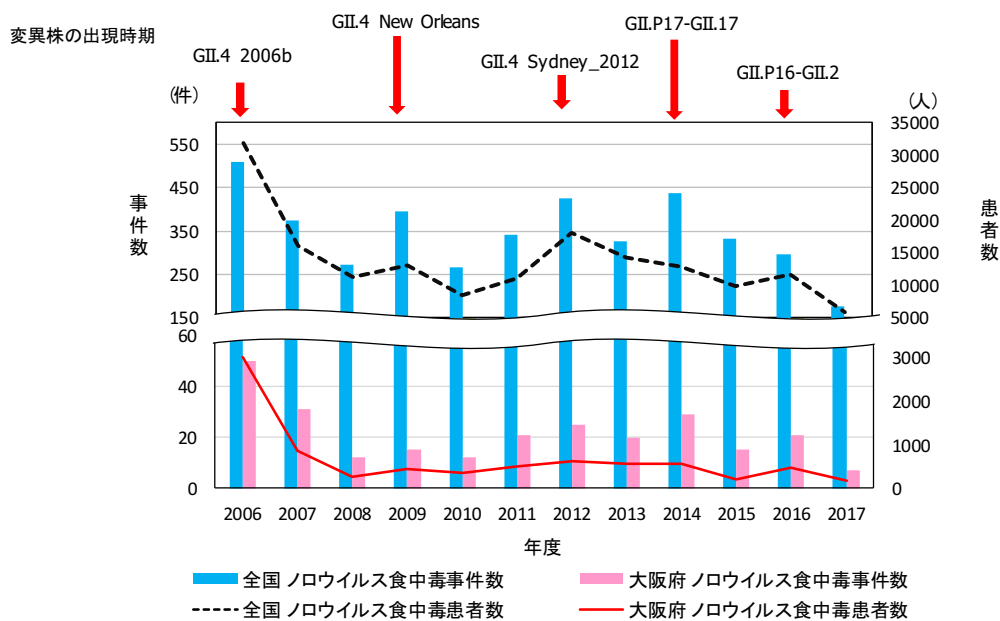


図5 大阪府全域および全国におけるノロウイルス食中毒事件数および患者数の推移 (2006～2017年度)

これまで GII.4 sydney_2012 亜型 や GII.P17-GII.17²²⁾ など新たな変異株が出現した年は、ノロウイルスによる食中毒事件数や患者数が増加する傾向が見られる。(図5)

2017年度のノロウイルスによる食中毒事件数および患者数は過去12年で最も少なく、このことから GII.4 Sydney_2012 亜型 および GII.P17-GII.17 の出現から数年が経過し、これらの免疫を持った成人層が多く存在していることが推測される。遺伝子型特異的な免疫持続期間は数年と考えられることから²³⁾、今後新たな変異株が出現しない場合は流行規模あるいは流行遺伝子型がどのように変化するのか、あるいは新たな変異株の出現により、再び大規模な流行が起こるのか、継続的な情報集積が必要である。

GII.4 はこれまで数年ごとに抗原性を変化させた変異株が出現し、大規模な流行を繰り返してきた²⁴⁻²⁶⁾。GII.4 Sydney_2012 亜型の出現からすでに6年が経過していることから、新たな GII.4 亜型の出現が危惧される。また、ノロウイルスはゲノム組換えにより流行を持続させていることが考えられており²⁷⁾、今後の分子疫学解析には RdRp および VP1 の両領域の遺伝子解析を実施していく必要があると考える。

利益相反

開示すべき利益相反はない。

文献

- 1) Green KY. (eds. Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B and Straus SE). *Caliciviridae: The Noroviruses*. *Fields Virology*, 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins; 2007. 949-979.
- 2) 厚生労働省 4. 食中毒統計資料 http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/shokuhin/syokuchu/04.html
- 3) Vinjé J. Advances in laboratory methods for detection and typing of norovirus. *J Clin Microbiol* 2015; **53**(2): 373-381.
- 4) 国立感染症研究所 ノーウォークウイルス(ノロウイルス)の遺伝子型(2015年改訂版). *病原微生物検出情報(IASR)* 2015年9月8日 <http://www.niid.go.jp/niid/ja/norovirus-m/norovirus-iasrs/5913-pr4274.html>
- 5) Jiang X, Wang M, Graham DY, Estes MK.

- Expression, self-assembly, and antigenicity of the Norwalk virus capsid protein. *J Virol* 1992; **66**(11): 6527-6532.
- 6) Sharp TM, Guix S, Katayama K, Crawford SE, Estes MK. Inhibition of cellular protein secretion by norwalk virus nonstructural protein p22 requires a mimic of an endoplasmic reticulum export signal. *PLoS One* 2010; **5**(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013130>
 - 7) Eden JS, Sharpe LJ, White PA, Brown AJ. Norovirus RNA-dependent RNA polymerase is phosphorylated by an important survival kinase, Akt. *J Virol* 2011; **85**(20): 10894-10898.
 - 8) Kroneman A, Vega E, Vennema H, Vinjé J, White PA, Hansman G, Green K, Martella V, Katayama K, Koopmans M. Proposal for a unified norovirus nomenclature and genotyping. *Arch Virol* 2013; **158**(10): 2059-2068.
 - 9) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長通知食安監発第 0514004 号「ノロウイルスの検出法について」平成 19 年 5 月 14 日
 - 10) Kojima S, Kageyama T, Fukushi S, Hoshino FB, Shinohara M, Uchida K, Natori K, Takeda N, Katayama K. Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses. *J Virol Methods* 2002; **100**(1-2): 107-114.
 - 11) Saito H, Saito S, Kamada K, Harata S, Sato H, Morita M, Miyajima Y. Application of RT-PCR designed from the sequence of the local SRSV strain to the screening in viral gastroenteritis outbreaks. *Microbio Immunol* 1998; **42**(6): 439-446.
 - 12) Katayama K, Shirato-Horikoshi H, Kojima S, Kageyama T, Oka T, Hoshino F, Fukushi S, Shinohara M, Uchida K, Suzuki Y, Gojobori T, Takeda N. Phylogenetic analysis of the complete genome of 18 Norwalk-like viruses. *Virology* 2002; **299**(2): 225-239.
 - 13) 高田利香, 左近直美, 中田恵子, 本村和嗣, 弓指孝博. 大阪府における食中毒事例から検出されたノロウイルスの流行状況と分子疫学的解析 (2016 年度). *大阪健康安全基盤研究所研究年報 平成 29 年度* 2017; **1**: 10-19.
 - 14) 田村務, 渡邊香奈子, 田澤崇, 渡部香, 広川智香, 吉澄志磨, 横井一, 森功次, 入谷展弘, 藤井慶樹, 木内郁代, 加藤聖紀, 仁平稔, 野田衛. ノロウイルス GII/4 の新しい変異株の遺伝子解析と全国における検出状況. *病原微生物検出情報 (IASR)* 2012; **33**: 333-334.
 - 15) van Beek J, Ambert-Balay K, Botteldoorn N, Eden JS, Fonager J, Hewitt J, Iritani N, Kroneman A, Vennema H, Vinjé J, White PA, Koopmans M; NoroNet. Indications for worldwide increased norovirus activity associated with emergence of a new variant of genotype II.4, late 2012. *Euro Surveill* 2013; **18**(1): 8-9.
 - 16) 入谷展弘, 上林大起, 改田厚, 阿部仁一郎, 中村寛海, 山元誠司, 久保英幸, 小笠原準, 伯井紀隆, 森宏美, 坂本徳裕, 廣川秀徹, 松本健二, 吉村高尚, 土見日出夫, 喜多直哉, 伊藤大樹, 野田衛. 集団胃腸炎事例からのノロウイルス GII.P16-GII.4 Sydney_2012 の検出—大阪市. *病原微生物検出情報 (IASR)* 2016; **37**: 136-138.
 - 17) Matsushima Y, Shimizu T, Ishikawa M, Komane A, Okabe N, Ryo A, Kimura H, Katayama K, Shimizu H. Complete genome sequence of a recombinant GII.P16-GII.4 norovirus detected in Kawasaki City, Japan, in 2016. *Genome Announc* 2016; **4**(5). <https://doi.org/10.1128/genomeA.01099-16>
 - 18) Medici MC, Tummolo F, Martella V, De Conto F, Arcangeletti MC, Pinardi F, Ferraglia F, Chezzi C, Calderaro A. Emergence of novel recombinant GII.P16_GII.2 and GII.P16_GII.4 Sydney 2012 norovirus strains in Italy, winter 2016/2017. *New Microbiol* 2018; **41**(1): 71-72.
 - 19) Bidalot M, Théry L, Kaplon J, De Rougemont A, Ambert-Balay K. Emergence of new recombinant noroviruses GII.p16-GII.4 and GII.p16-GII.2, France, winter 2016 to 2017. *Euro Surveill* 2017; **22**(15). <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2017.22.15.30508>
 - 20) Bruggink L, Witlox K, Huang B, Warrilow D, Marshall J. GII.4 norovirus recombinant causes gastroenteritis epidemic in Eastern Australia, winter 2017. *J Med Virol* 2018; **90**(6): 1168-1171.
 - 21) Centers for Disease Control and Prevention

- (CDC) CaliciNet Data <https://www.cdc.gov/norovirus/reporting/calicinet/data.html>
- 22) Matsushima Y, Ishikawa M, Shimizu T, Komane A, Kasuo S, Shinohara M, Nagasawa K, Kimura H, Ryo A, Okabe N, Haga K, Doan YH, Katayama K, Shimizu H. Genetic analyses of GII.17 norovirus strains in diarrheal disease outbreaks from December 2014 to March 2015 in Japan reveal a novel el polymerase sequence and amino acid substitutions in the capsid region. *Euro Surveill* 2015; **20**(26).
<https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES2015.20.26.21173>
- 23) Sakon N, Yamazaki K, Nakata K, Kanbayashi D, Yoda T, Mantani M, Kase T, Takahashi K, Komano J. Impact of genotype-specific herd immunity on the circulatory dynamism of norovirus: A 10-year longitudinal study of viral acute gastroenteritis. *J Infect Dis* 2015; **211**(6): 879-888.
- 24) Debbink K, Lindesmith LC, Donaldson EF, Baric RS. Norovirus immunity and the great escape. *PLoS Pathog* 2012; **8**(10).
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002921>
- 25) Parra GI, Squires RB, Karangwa CK, Johnson JA, Lepore CJ, Sosnovtsev SV, Green KY. Static and evolving norovirus genotypes: Implications for epidemiology and immunity. *PLoS Pathog* 2017; **13**(1).
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006136>
- 26) Motomura K, Oka T, Yokoyama M, Nakamura H, Mori H, Ode H, Hansman GS, Katayama K, Kanda T, Tanaka T, Takeda N, Sato H; Norovirus Surveillance Group of Japan. Identification of monomorphic and divergent haplotypes in the 2006-2007 norovirus GII/4 epidemic population by genomewide tracing of evolutionary history. *J Virol* 2008; **82**(22): 11247-11262.
- 27) Kobayashi M, Matsushima Y, Motoya T, Sakon N, Shigemoto N, Okamoto-Nakagawa R, Nishimura K, Yamashita Y, Kuroda M, Saruki N, Ryo A, Saraya T, Morita Y, Shirabe K, Ishikawa M, Takahashi T, Shinomiya H, Okabe N, Nagasawa K, Suzuki Y, Katayama K, Kimura H. Molecular evolution of the capsid gene in human

norovirus genogroup II. *Sci Rep* 2016; **6**.
<https://doi.org/10.1038/srep29400>.

「WEB サイトの内容は 2018 年 6 月 13 日に
確認した」

Epidemic and molecular epidemiological analysis of norovirus outbreaks in case of food poisoning in Osaka Prefecture (Fiscal 2017 Report)

Rika TAKADA, Naomi SAKON, Keiko NAKATA, Kazushi MOTOMURA and Takahiro YUMISASHI

Norovirus is a leading cause of acute gastroenteritis in the world. In 25 out of 62 suspected food poisoning cases, noroviruses were detected in our tests during the 2017 epidemic season. We conducted comprehensive genome analysis to perform a molecular epidemiological study. As a result of analyzing the sequence of the capsid NS region (282 nt), GII.4 Sydney_2012 was found to be the most prevalent genotype (16/25: 64.0%), followed by GII.17 (4/25: 16.0 %) and GII.2 (2/25: 8.0%). The top two genotypes, GII.4 Sydney_2012 and GII.17, were subject to sequencing analysis of the RNA dependent RNA polymerase (RdRp) region (805 nt) and a full-length VP1 region (1623 nt). Regarding to above analysis, GII.4 Sydney_2012 strains were determined to be 14 strains of GII.Pe-GII.4 Sydney_2012 and 2 strains of GII.P16-GII.4 Sydney_2012. GII.P16-GII.4 Sydney_2012 was not detected in the 2016 epidemic season. All GII.17 strains were determined to be GII.P17-GII.17. As a result of phylogenetic tree analysis in the VP1 region, GII.4 Sydney_2012 strains had 96.6-97.9% nucleotide identity with the Norovirus GII/Hu/AU/2012/GII.4/Sydney/NSW0514 strain, and GII.17 strains had 99.3-99.6% nucleotide identity with the norovirus Hu/GII/JP/2015/GII.P17-GII.17/Kawasaki308 strain. It is necessary to conduct genetic analysis of both RdRp and VP1 regions in a molecular epidemiological study.

Key words ; norovirus, food poisoning, genotype

下水におけるエンテロウイルスの多様性に関する検討

高田利香, 中田恵子, 弓指孝博

国内へのポリオウイルスの流入監視目的のために行っている環境水（下水）サーベイランスでは、ポリオウイルスの他にエンテロウイルス（EV）B群を中心とした非ポリオエンテロウイルスが分離される。EV-B群は無菌性髄膜炎の主要病原体であり、これまでに下水から分離されるEV-B群の検出状況と患者から検出されたEVの動向に同様の傾向がみられることが報告されている。培養細胞を用いるウイルス分離はウイルスの細胞指向性や増殖速度の違い等の影響により、下水のEV存在状況が正確に反映されていない可能性が考えられる。本研究では、ウイルス遺伝子のPCRクローニングとシーケンス法を組み合わせ下水のEV遺伝子を直接検出し、存在状況を明確にすることを試みた。その結果、両手法においてポリオウイルスは陰性で、他のエンテロウイルス属が検出された。ウイルス分離法ではEV-B群11種類の遺伝子型が検出されたのに対し、PCRクローニング法ではEV-A～C群、ライノウイルスA～C群の合わせて20種類が検出された。本調査期間においてEV-B群が高い割合で検出されており、その中の優占な遺伝子型が変化していることがわかった。しかし、いずれかの手法でのみ確認された遺伝子型があったことから、両手法を組み合わせることで地域内伝搬しているEVの情報を広く集積できることが示唆された。

キーワード：ポリオウイルス、非ポリオエンテロウイルス、環境水、遺伝子型、クローニング

エンテロウイルス（EV）はピコルナウイルス科に属するウイルスの一つで、エンベロープを持たない一本のプラス鎖RNAウイルスである^{1,2)}。エンテロ（entero）は腸を意味しており、一般的に感染者の粘膜や腸管で増殖するウイルスである。エンテロウイルス属のうちヒトに感染するものは、エンテロウイルスA～D群であり、これらはポリオウイルス、コクサッキーウイルスA群（CV-A）、コクサッキーウイルスB群（CV-B）、エコーウイルス（Echo）など約200種類以上のウイルスで構成されている³⁾。他にも同じ属に分類されるライノウイルスA～C群は、鼻かぜ等の呼吸器症状を引き起こす^{1,2)}。EV感染者の多くは不顕性感染または軽症であり^{1,2)}、ウイルスは糞便と共に排出され下水中に集約する。そのため下水に存在するウイルスを調べることで顕性感染、不顕性感染にかかわらず地域

で伝播しているウイルスを捕捉することが可能であり、数多くの調査が行われてきた^{4,8)}。

感染症法で2類感染症に定められているポリオ（急性灰白髄炎、小児麻痺）はポリオウイルスによる感染症であり、1988年に世界保健機関（WHO）が世界ポリオ根絶計画を提唱して以降、世界的なポリオ撲滅計画が進められている⁹⁾。我が国ではワクチン接種の普及により1981年以降、野生型ポリオウイルスによる患者は発生してない¹⁰⁾。また2012年9月からは重篤な副作用（ワクチン株による急性弛緩性麻痺）のリスクがある弱毒化生ワクチンから不活化ワクチンへの切り替えが行われた¹¹⁾。

しかし現在もなお、アフガニスタン、パキスタン、ナイジェリアでは野生型ポリオウイルスの患者が発生しており、生ワクチン接種が実施されている国も多くあることから¹²⁾、今後は国

大阪健康安全基盤研究所微生物部ウイルス課

外から持ち込まれるポリオウイルスに警戒が必要となっている。それらを監視する目的として、我が国では2013年から感染症流行予測調査事業ポリオ感染源調査として下水を対象とした環境水サーベイランスが開始された¹³⁾。この環境水サーベイランスでは、培養細胞を用いたウイルス分離検査においてポリオウイルス以外の非ポリオエンテロウイルスも分離されており、その多くはCV-BやエコーウイルスなどEV-B群である¹⁴⁻¹⁷⁾。

EV-B群は、無菌性髄膜炎の主要病原体であり、過去に1998年のEcho30や2002年のEcho13による大規模な流行があった。近年ではEcho6、CV-B5が主要原因ウイルスとなって、周期的に流行を繰り返している¹⁸⁻²¹⁾。長期間流行しない時期が続くと、感染防御に有効な抗体価を保有していない感受性者の蓄積により大規模な流行が懸念されるため、その動向を注視する必要がある。これまでに下水から分離されたEV-B群の検出状況と、無菌性髄膜炎患者の原因ウイルスの動向に関連があることが報告されており^{5,22)}、下水からのEVの検出状況が無菌性髄膜炎の流行を把握する上で有効な指標となることが示唆されている。

現在、培養細胞を用いたウイルス分離検査が広く行われている。しかし、同法で得られる結果は、ウイルスの細胞指向性や増殖速度の違いなどに影響を受けるため、下水に存在するEVを正確に反映しているとは言えない。また環境中におけるEVの感染力の持続期間はウイルスの種類によって異なるため^{23,24)}、糞便が排出されてから下水処理場へ到達する間に感染力消失により分離されないEVが存在していることも懸念される。

本研究では、下水中に存在するEVの多様性をより明確にすることを目的に、PCRクローニングとシーケンス法を用いて下水からEVの遺伝子の直接検出を試み、検出されたEVの遺伝子型についてウイルス分離法と比較して検討を行った。

調査方法

1. 材料および方法

下水のウイルス濃縮は国立感染症研究所が示

す「ポリオウイルス感染症の実験室診断マニュアル」²⁵⁾の陰電荷膜吸着誘出法に準拠した。

2016年4月から2017年11月まで大阪府内の終末下水処理場（利用人口約40万人、分流式）において毎月1回、下水を1L採取した。下水500mLを4℃で3,000rpm、30分間遠心分離したのち、孔径2.7μmおよび1.0μmを連結したシリンジフィルターを用いて濁質を除去した。ろ過液に2.5M塩化マグネシウム溶液10mLを添加（最終濃度0.05M）し、0.5N塩酸を用いて攪拌しながらpH3.5に調整した後、陰電荷膜（ADVANTECメンブレンフィルター 孔径0.45μm、直径47mm）を用いて加圧ろ過し、ウイルスを膜に吸着させた。滅菌ガラスビーズと3%ビーフエキストラクト溶液8mLが入った50mLチューブに膜を裁断して回収し、2分間攪拌して膜からウイルスを誘出させた。それを4℃で3,000rpm、10分間遠心分離した後、上清を0.45μmシリンジフィルターでろ過し、ウイルス誘出液（1番誘出液）を得た（62.5倍濃縮）。再度、50mLチューブに3%ビーフエキストラクト8mLを加え同様にウイルスを誘出させた（2番誘出液）。

培養細胞によるウイルス分離と同定は以下のとおりに行った。48ウェルプレートに培養したウイルス感受性が異なるL20-B、RD-A、VeroE6、FL、Caco-2細胞に、誘出液（1番、2番）を 10^0 - 10^{-2} の3段階希釈し、それぞれ2ウェルに100μlずつ接種した。37℃の5%CO₂インキュベーターで1週間培養し、細胞変性効果（CPE; cytopathic effect）を観察し、CPEが出現した場合はプレートから培養液を回収した。CPEが陰性の場合3代盲継代を繰り返し陰性と判定した。回収した培養液を4℃で15,000rpm、5分間遠心分離した後、上清200μlを採取し、RNA抽出用検体とした。Magtration®-MagaZorb RNA Common Kit（PSS社）を用いて、全自動核酸抽出装置Magtration® System 12GC（PSS社）、またはカネカ簡易RNA抽出キット（Kaneka）によりRNA抽出を行った。

EVのViral Protein（VP）4領域に対するEVP4/OL68-1プライマー²⁶⁾を用いて、M-MLV Reverse Transcriptase（Invitrogen）によりcDNAを合成し、その後、EmeraldAmp MAX PCR Master Mix（タカラバイオ）を用いてPCRをおこなった。PCR条件は、94℃2分の反応後、94℃30秒、55℃1分、72℃1分の反応を35サイクル

おこない、最後に 72°C、5 分の伸長反応をおこなった。アガロース電気泳動にて PCR 増幅産物のバンドを確認しゲルを切り出した。BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied biosystems) を用いたダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定し、BLAST 相同性検索にて遺伝子型を決定した。

PCR クローニングおよびシーケンス法 (以下、PCR クローニング法) は以下の通りに行った。1 番誘出液上清 200µl を採取し、RNA 抽出用検体とした。RNA 抽出は、Magrator®-MagaZorb RNA Common Kit (PSS 社) を用いて、全自動核酸抽出装置 Magrator® System 12GC (PSS 社) により行った。EV の VP 4-2 領域に対する EVP2/OL68-1、EVP4/OL68-1 プライマー²⁶⁾を用いて、ウイルス分離法と同様の条件で seminested RT-PCR を実施後、PCR 増幅産物を得た。PCR 増幅産物のクローニングは、TA-Enhancer Cloning Kit (ニッポンジーン) および ECOSTM Competent E.coli DH5 α (ニッポンジーン) を用い、添付のプロトコールに従って行った。得られた白色コロニーは 1 検体あたり 10~16 個を選択し EVP4/OL68-1 のプライマーを用いてコロニー PCR を実施後、PCR 増幅産物をダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定し、BLAST 相同性検索にて遺伝子型を決定した。

結 果

1. 検出されたエンテロウイルス遺伝子型

ウイルス分離法および PCR クローニング法で検出されたエンテロウイルス属を表 1 に示す。いずれの方法においてもポリオウイルスは検出されなかった。

ウイルス分離法で L20-B 細胞を除く培養細胞から分離されたウイルスの遺伝子型は 11 種類であり、CV-B が 5 種類、エコーウイルスが 6 種類ですべて EV-B 群であった。

一方、PCR クローニング法では 17 種類の遺伝子型が検出され、EV-B 群が 10 種類と最も多く、他にも EV-A 群 5 種類、EV-C 群 2 種類であった。さらにライノウイルス A~C 群も検出された。

EV-B 群について、ウイルス分離法および PCR クローニング法の月別検出状況を図 1 に示す。

(●:ウイルス分離法、青:PCR クローニング法)

ウイルス分離法と PCR クローニング法の両方で検出された遺伝子型 (CV-B 群、Echo3 および Echo6) は、検出された時期はほぼ一致していた。

一方、Echo25 は 2016 年 6 月から数か月の期間ウイルス分離法で陽性であったが、PCR クローニング法では検出されなかった。Echo9 については、ウイルス分離法は陰性であったが、PCR クローニング法では 2016 年 10 月以降断続的に遺伝子が検出されるなどウイルス分離法と PCR クローニング法では異なる遺伝子型が検出された。

2. PCR クローニング法で検出された月別エンテロウイルス群または遺伝子型の割合

PCR クローニング法で検出された EV 群または遺伝子型の月別割合を図 2 に示した。得られたコロニー数や遺伝子型別が可能であった検体数が異なっているため、各月において遺伝子型が決定した総数 (N) に対する割合で示した。

2016 年 11 月はライノウイルス A~C 群のみが検出され、他の月と異なる傾向が見られた。この月を除き、EV-B 群は各月において 50%以上の割合で検出されており、年間を通じて EV-B 群が下水に存在していることが明らかになった。ウイルス分離法では陰性であった EV-A 群が PCR クローニング法では、2016 年に CV-A4、CV-A5 および EV-A 71 が、2017 年は CV-A10 および CV-A2 が検出された。

大きな割合を占めた EV-B 群について、各遺伝子型の割合推移を図 3 に示した。

2016 年 4 月から 8 月まで CV-B1 が優占な遺伝子型であり、その他に CV-B5 や CV-A9 が検出された。9 月以降になると、これらの割合は減少し、Echo6 や Echo9 などの割合が増加し、2017 年 4 月までエコーウイルスが優占な遺伝子型となった。2017 年 5 月以降になると、再び CV の割合が増加し、2016 年には検出されていなかった CV-B2 や CV-B4 が検出された。20 か月の調査期間において、CV-B1 から Echo6 へ、そして CV-B2 へと数か月間の短い期間で優占な遺伝子型が変化することが観察された。

表1 ウイルス分離法またはPCR クローニング法で検出されたエンテロウイルス属

方法	群	遺伝子型					
		CV-B1	CV-B2	CV-B3	CV-B4	CV-B5	
ウイルス分離法	EV-B	Echo3	Echo6	Echo7	Echo11	Echo25	Echo30
		CV-B1	CV-B2	CV-B3	CV-B4	CV-B5	
PCRクローニング法	EV-B	Echo3	Echo6	Echo9	Echo18	CV-A9	
	EV-A	CV-A2	CV-A4	CV-A5	CV-A10	EV-A71	
	EV-C	CV-A19	CV-A24				
	RhinovirusA						
	RhinovirusB						
	RhinovirusC						

EV：エンテロウイルス、CV：コクサッキーウイルス、Echo：エコーウイルス

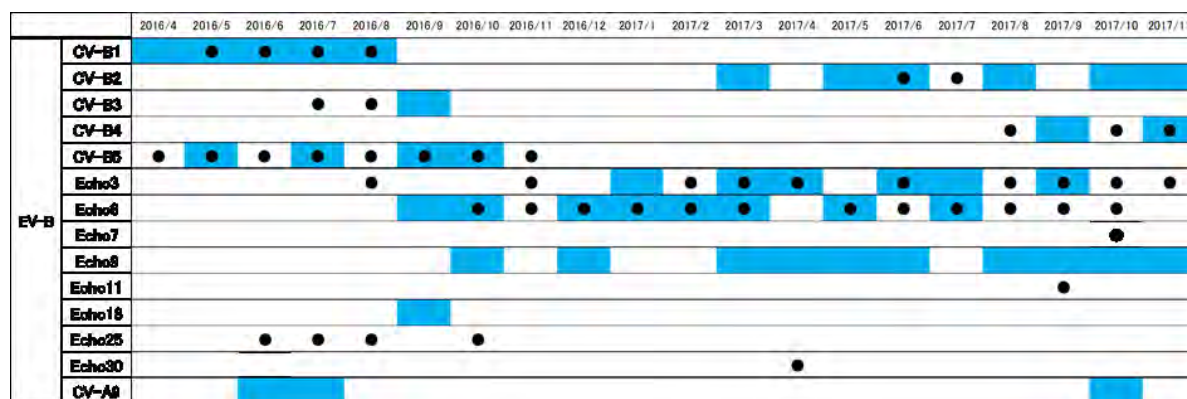


図1 月別エンテロウイルス B 群検出状況
(青：PCR クローニング法 ●：ウイルス分離法)

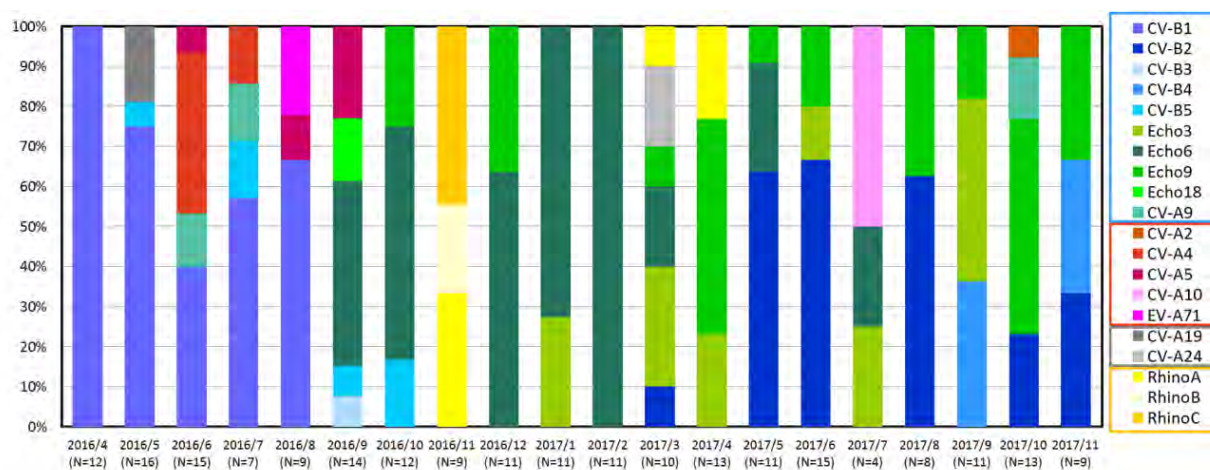


図2 PCR クローニング法で検出された月別エンテロウイルス群または遺伝子型の割合

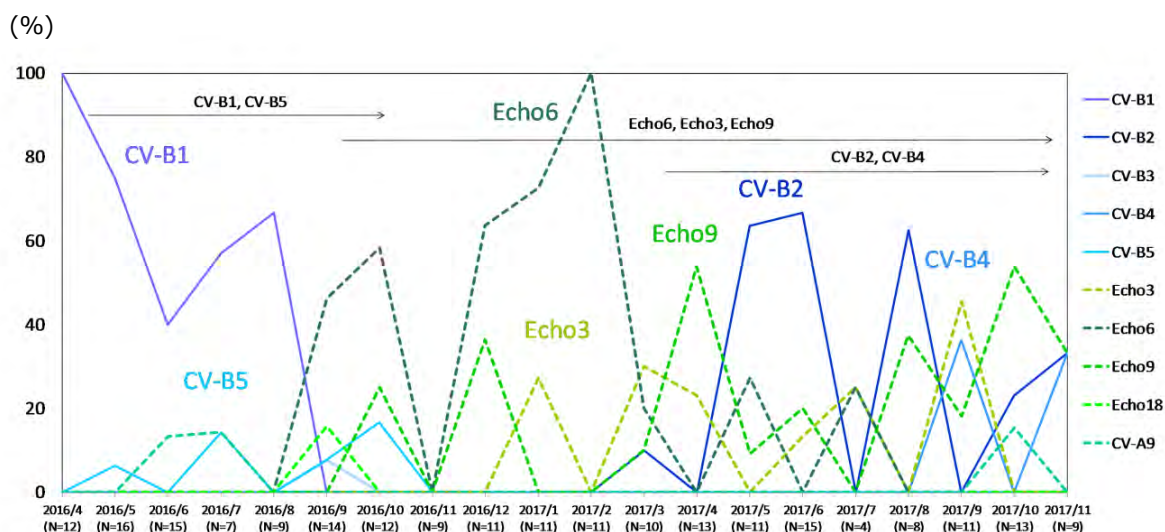


図3 PCR クローニング法で検出されたエンテロウイルス B 群各遺伝子型の割合推移

考 察

ウイルス分離法では下水から EV-B 群が多く分離されているが、PCR クローニング法を用いて直接遺伝子を調べたところ、EV-B 群に加え、EV-A 群、EV-C 群およびライノウイルス A～C 群が検出され、下水に存在している多種類の EV 属を検出することができた。

ウイルス分離法と PCR クローニング法で検出した EV-B 群を比較すると、両方で共通する遺伝子型については検出された時期がほぼ一致していた。しかし、一致しなかった遺伝子型もあった。Echo9 は 14 か月に渡って断続的に遺伝子が検出されたことから地域内伝播の可能性が示唆された。この間にウイルス分離法はすべて陰性であった。これは、Echo9 が他のウイルスに比べて培養細胞に対する感受性が低い可能性や、ウイルスの感染力の有無等の要因により分離されなかったと推察される。一方、Echo25 は 2016 年 6 月から数か月の期間分離されていたが、PCR クローニング法では遺伝子は検出されなかった。これは、EV の種類による塩基配列の違いによりプライマー配列に対する結合性が異なるため、PCR 増幅効率の影響が関与していると考えられる。いずれかの方法でのみ陽性となった遺伝子型が他にもあることから、ウイルス分離法と PCR クローニング法を組み合わせることでより

幅広い EV の種類を捕捉できると考えられる。

PCR クローニング法では、ウイルス分離法と同様に年間を通じて EV-B 群が高い割合で検出されていることから、常に EV-B 群の感染者が地域内に存在していることが示唆された。さらに EV-B 群を遺伝子型別に解析したところ、優占な遺伝子型は短期間のうちに変化することが明らかになった。

調査期間において、大阪府内の無菌性髄膜炎患者から検出した病原体は EV 属が半数以上であり²⁷⁾、同時期に PCR クローニング法で検出された EV-B 群遺伝子型と一致する傾向が見られた。これらの結果から下水中の遺伝子を直接検出する方法は、無菌性髄膜炎の病原体となりうる EV-B 群の動向を監視する有用な手法の一つになると考えられる。

また PCR クローニング法では、ウイルス分離法では見られなかった EV-A 群に分類される遺伝子が夏季に検出された。EV-A 群は手足口病やヘルパンギーナの主な病原体で、毎年夏季に主に乳幼児～小児年齢層で流行する^{1,2)}。2016 年はヘルパンギーナが、2017 年は手足口病が流行した^{21,27)}。下水から EV-A 群の遺伝子が夏季に検出されたが、患者から検出された病原体情報と下水から検出された EV-A 群の遺伝子型との一致率は低く、下水では夏季においても EV-B 群の検出割合が高かった。この要因として、発生動向調査ではこれらの感染症について小児科を定点

としており、患者年齢層は狭いが、流行動向を的確に捉えることが可能である。一方、下水は利用地域の全年齢層が対象であり、顕性感染、不顕性感染にかかわらず流行しているウイルスを検出している。今回調査を行った下水利用流域の年齢人口比率を調べたところ、これらの感染症の好発年齢である0～5歳の人口比率は全体の約5%であった。乳児はオムツ等の使用により下水への糞便流入量は少ないと推測されウイルスを含む糞便を下水へと排出した感染者数は下水利用人口全体からすると非常に少ない割合であると推測される。そのため、EV-A群については、患者からの病原体情報と下水から検出された遺伝子型はあまり一致しなかったのではないかと考えられる。

PCR クローニング法による遺伝子検出は、同じ属のウイルスでも濃度が低いと検出は難しいなど、下水に存在する全種類のEV 遺伝子を検出することは困難である。今後、多種ウイルス遺伝子配列を網羅的に検出可能である次世代シーケンサーを用いたメタゲノム解析^{28,29)}を行えば、さらにEV の構成について明確にすることが可能であると考えられる。

下水中のEV の多様性を明確にすることは、地域内伝播しているウイルスの動向を把握する上で有用な情報になり得ることが示唆された。

謝 辞

本研究を行うにあたり、検体採取にご協力いただきました関係機関の皆様に深く感謝致します。

利 益 相 反

開示すべき利益相反はない。

文 献

1) Mark Pallansch, Raymond Roos. (eds. Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus SE). Enteroviruses: Polioviruses, Coxsackieviruses, Echoviruses, and Newer Enteroviruses. Fields Virology, 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins; 2007. 840-893.

- 2) Heinz Z, Hans-Peter G. (eds. Steven S, Richard LH, Stephen AY). Clinical Virology Manual third edition-Enteroviruses. ASM Press; 2000. 252-269.
- 3) ICTV Picornaviridae Study Species <http://www.picornastudyspecies.com>
- 4) Yoshida H, Horie H, Matsuura K, Kitamura T, Hashizume S, Miyamura T. Prevalence of vaccine-derived polioviruses in the environment. *J Gen Virol* 2002; **83**(5): 1107-1111.
- 5) Iwai M, Yoshida H, Matsuura K, Fujimoto T, Shimizu H, Takizawa T, Nagai Y. Molecular epidemiology of echoviruses 11 and 13, based on an environmental surveillance conducted in Toyama Prefecture, 2002-2003. *Appl Environ Microbiol* 2006; **72**(9): 6381-6387.
- 6) Sellwood J, Dadswell JV, Slade JS. Viruses in sewage as an indicator of their presence in the community. *J Hyg* 1981; **86**(2): 217-225.
- 7) Apostol LN, Imagawa T, Suzuki A, Masago Y, Lupisan S, Olveda R, Saito M, Omura T, Oshitani H. Genetic diversity and molecular characterization of enteroviruses from sewage-polluted urban and rural rivers in the Philippines. *Virus Genes* 2012; **45**(2): 207-217.
- 8) Ndiaye AK, Diop PA, Diop OM. Environmental surveillance of poliovirus and non-polio enterovirus in urban sewage in Dakar, Senegal (2007-2013). *Pan Afr Med J* 2014; **19**: 2. <https://doi.org/10.11604/pamj.2014.19.243.3538>
- 9) WHO Polio Eradication and Endgame Strategic Plan 2013-2018. <http://polioeradication.org/who-we-are/strategy/>
- 10) 国立感染症研究所. 感染症発生動向調査週報 ポリオ（急性灰白髄炎・小児麻痺）とは. 2001年第26号 <https://www.niid.go.jp/niid/ja/kansennohanashi/386-polio-intro.html>
- 11) 厚生労働省 予防接種情報 ポリオ（急性灰白髄炎）ポリオワクチン <http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/polio/>
- 12) WHO Statement of the Sixteenth IHR Emergency Committee Regarding the International Spread of Poliovirus. WHO statement 14 February 2018

- <http://www.who.int/mediacentre/news/statements/2018/16th-ihp-polio/en/>
- 13) 国立感染症研究所 感染症流行予測調査実施要領 <https://www.niid.go.jp/niid/ja/pr/670-yosoku-procedure.html>
 - 14) 国立感染症研究所. 平成 25 年度感染症流行予測調査事業ポリオ環境水調査期間中 (2013 年 4~12 月) に検出されたエンテロウイルスについて. *病原微生物検出情報 (IASR)* 2014; **35**: 275-276.
 - 15) 国立感染症研究所. 平成 26 年度感染症流行予測調査事業ポリオ環境水調査にて検出されたウイルスについて. *病原微生物検出情報 (IASR)* 2016; **37**: 27-29.
 - 16) 国立感染症研究所. 平成 27 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. *病原微生物検出情報 (IASR)* 2016; **37**: 208-209.
 - 17) 国立感染症研究所. 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. *病原微生物検出情報 (IASR)* 2018; **39**: 67-69.
 - 18) 国立感染症研究所. エコーウイルス 30 型による無菌性髄膜炎の流行、1997~1998. *病原微生物検出情報 (IASR)* 1998; **19**(8).
 - 19) 国立感染症研究所 無菌性髄膜炎 <http://www.niid.go.jp/niid/ja/kansennohanashi/520-viral-meningitis.html>
 - 20) 国立感染症研究所. 無菌性髄膜炎関連エンテロウイルスの動向 2008 年 12 月現在. *病原微生物検出情報 (IASR)* 2009; **30**: 1-3.
 - 21) 国立感染症研究所 病原微生物検出情報 エンテロウイルス <https://www.niid.go.jp/niid/ja/iasr/510-surveillance/iasr/graphs/1532-iasrgv.html>
 - 22) 国立感染症研究所. 無菌性髄膜炎患者からのコクサッキーウイルス B 群の検出状況—千葉県. *病原微生物検出情報 (IASR)* 2017; **38**: 39-40.
 - 23) Hurst CJ, Benton WH, McClellan KA. Thermal and water source effects upon the stability of enteroviruses in surface freshwaters. *Can J Microbiol* 1998; **44**(2): 190-194.
 - 24) Subrahmanyam TP. Persistence of enteroviruses in sewage sludge. *Bull World Health Organ* 1977; **55**(4): 431-434.
 - 25) 国立感染症研究所 ポリオウイルス感染症の実験室診断マニュアル <http://www.nih.go.jp/niid/images/lab-manual/polio.pdf>
 - 26) Ishiko H, Shimada Y, Yonaha M, Hashimoto O, Hayashi A, Sakae K, Takeda N. Molecular diagnosis of human enteroviruses by phylogeny-based classification by use of the VP4 sequence. *J Infect Dis* 2002; **185**(6): 744-754.
 - 27) 大阪府感染症情報センター 病原体検出情報 <http://www.iph.pref.osaka.jp/kansen/zbs/bs.html>
 - 28) Rosario K, Nilsson C, Lim YW, Ruan Y, Breitbart M. Metagenomic analysis of viruses in reclaimed water. *Environ Microbiol* 2009; **11**(11): 2806-2820.
 - 29) Brinkman NE, Fout GS, Keely SP. Retrospective surveillance of wastewater to examine seasonal dynamics of enterovirus infections. *mSphere* 2017; **14**(2): 99-117.

「WEB サイトの内容は 2018 年 6 月 1 日に確認した」

Diversity of enteroviruses in sewage

Rika TAKADA, Keiko NAKATA and Takahiro YUMISASHI

Non-polio enteroviruses which are mainly Enterovirus B (EV-B) species were isolated in raw sewage during environmental surveillance of poliovirus. The EV-B species is the major pathogen of aseptic meningitis (AM), and it has been reported that there are a relation between EV-B species detected from AM patients and it isolated from sewage. In virus isolation using cell lines, it is possible that the situation of EV in sewage may not be accurately reflected due to the influence of difference in of the cell tropism and growth rate of the virus. This study aimed to clarify the presence of EV in sewage, by directly detecting the gene using PCR cloning and sequencing. As a result, 10 genotypes of EV-B species, 5 genotypes of EV-A species, 2 genotypes of EV-C species, Rhinovirus A species, Rhinovirus B species and Rhinovirus C species were detected in PCR cloning. On the other hand, 11 genotypes of EV-B species were detected in the virus isolation. It was observed that a high proportion of EV-B species was detected throughout the year, and further the predominant genotype of virus went changes short cycle in PCR cloning. In this study period, EV genotypes detected from sewage were similar to those from AM patients and it was the same as the previous reports. Some EV genotypes were detected only by either method, therefore it is necessary that the combination of both to clarify a diversity of EV.

Key words : poliovirus, non-polio enterovirus, sewage, PCR cloning, genotype

大阪府内における 2017/2018 シーズンのインフルエンザ流行状況

森川佐依子, 廣井 聡, 弓指孝博

大阪府ではインフルエンザの流行状況を把握することを目的として、年間を通じインフルエンザウイルス株の検出、分離・型別を行い、さらに流行期には流行株や流行規模の解析を行っている。

2017/2018 シーズンの大阪府内におけるインフルエンザの流行は、2017 年第 48 週に定点あたり患者数が 1.0 を越え、2018 年第 3～5 週をピークとして漸減した。例年になく、今シーズンは B 型 Yamagata 系統が主流株であった。大阪府内においては、A 型は AH3 亜型が多く検出された。A 型インフルエンザウイルスの地域流行分離株について HA 遺伝子全長の系統樹解析を行った結果、全国の解析データと同様にサブクレード内でのアミノ酸置換の多様性が見られ、どの群から次の流行株が派生するのか、分離株の解析が引き続き必要と考えられた。季節性インフルエンザウイルスが陰性であった検体数は少なく 17 検体であったが、その内の 8 検体からは他の呼吸器ウイルスが検出された。今冬は特に多く検出されたウイルスはなかった。

キーワード：インフルエンザウイルス、病原体サーベイランス、系統樹解析、呼吸器ウイルス

インフルエンザはインフルエンザウイルスの感染によって引き起こされる急性熱性の呼吸器感染症である。我が国においては毎年冬期に流行するため、インフルエンザのシーズンは毎年 第 36 週（8 月末から 9 月始め）から翌年の第 35 週（8 月末）とされている。2017/2018 シーズン（2017 年第 36 週から 2018 年第 35 週）においては、全国の医療機関を受診した患者数の推計である、「推計受診患者数」および、全国約 500 カ所の基幹定点医療機関からのインフルエンザによる入院患者数の累計である「累計入院患者数」は、2018 年第 10 週までのデータではあるがすでに近年の推計受診患者数および累計入院患者数を上まわっている¹⁾。

インフルエンザは、流行規模の大小はあるものの、日本では毎冬流行を繰り返し、特に高齢者の冬期超過死亡や、小児での重症化の主要因となるなど、その対策は我が国の医療施策において重要な課題である。インフルエンザワクチンは感染や発症そのものを完全には防御できな

いが、重症化や合併症の発生を予防する効果が証明されている^{2),3)}。インフルエンザ株サーベイランスは世界保健機関（World Health Organization: WHO）の世界インフルエンザ監視・対応システム（Global Influenza Surveillance and Response System: GISRS）によって、地球規模で実施されており、このサーベイランスの結果をもとに流行予測とワクチン株選定が行われている⁴⁾。

大阪健康安全基盤研究所ウイルス課では、国立感染症研究所との共同研究、「厚生労働省発生动向調査に基づくインフルエンザサーベイランス」事業の一環として、インフルエンザの流行状況を把握することを目的とし、毎冬の流行期に流行規模、流行株の分離、型別を行っている。本研究では、2017/2018 シーズンの大阪府内のインフルエンザ流行状況に加え、A 型インフルエンザウイルス分離株を用いた各亜型別の HA 遺伝子全長部分の分子系統樹解析、および季節性インフルエンザウイルスの検出が陰性であった

大阪健康安全基盤研究所微生物部ウイルス課

検体について他の呼吸器ウイルスの検出を行ったので併せて報告する。

研究方法

1. インフルエンザ定点サーベイランス

大阪府感染症発生動向調査事業に則り、大阪府感染症情報センターから発出される患者情報を用いた⁵⁾。

2. インフルエンザ病原体サーベイランス

大阪府感染症発生動向調査事業に基づくインフルエンザ指定提出機関および、各保健所からの学級閉鎖等集団発生事例にて採取された上気道由来検体を対象とした。2017/2018 シーズンのうち、2017年第36週(9月4日～9月10日)から2018年第13週(3月26日～4月1日)までに検体採取され、大阪健康安全基盤研究所ウイルス課に搬入された255検体について病原体の検出および遺伝子解析を行った。集団発生は1事例を1検体、同一患者から複数検体が搬入された場合は1人に付き1検体として集計した。

3. ウイルス遺伝子検査

搬入された上気道由来検体の200 μ Lを核酸抽出に供した。核酸抽出はMagDEA Viral DNA/RNA200(GC)キット(Precision System Science)を用い、全自動核酸抽出機(Precision System Science)にて行った。抽出した核酸はインフルエンザ診断マニュアル⁶⁾に従いリアルタイムRT-PCR法によるインフルエンザウイルス遺伝子の検出を行った。

インフルエンザウイルスの検出が陰性であった検体については、リアルタイムPCR法による呼吸器ウイルスの検出を行った⁷⁾。エンテロウイルス(EV)およびライノウイルス(RV)は共通領域を検出するため、陽性となった場合は、核酸を用いてVP4-2領域に対するsemi-nested RT-PCR法を行い、増幅産物のダイレクトシーケンスにて遺伝子配列を決定し、BLASTにて型別を行った⁸⁾。

4. ウイルス分離培養と分離株の解析

24ウェルプレートに単層培養したMadin - Darby Canine Kidney (MDCK)細胞および、

MDCK細胞にヒト2,6-シアル酸転移酵素cDNAをトランスフェクションし、細胞表面の糖鎖末端をアルファ2-6結合のシアル酸が多く占めるよう作製されたMDCK-SIAT1細胞⁹⁾(ともにDSファーマバイオメディカル)に各ウェル200 μ Lの検体を接種し34 $^{\circ}$ C、30分吸着後、分離用培地である3 μ g/mLアセチルトリプシン(SIGMA)添加DMEM(SIGMA)培地に交換し、34 $^{\circ}$ C、5%CO₂存在下で1週間培養しCPEを観察した。

CPEが観察された場合、培養上清を回収し、型別に供した。CPEが観察されない場合は盲継代を行い、2代目でCPEが観察されない場合は分離陰性とした。AH3亜型インフルエンザウイルスについては、検体量が十分な65検体を用いてMDCK細胞およびMDCK-SIAT1細胞の両者に検体を接種して分離率の比較を行った。

CPEが陽性であった培養上清は、3 μ Lを蒸留水にて50倍に希釈し、その5 μ Lを検体として、直接リアルタイムRT-PCR法による検出を行い型別した。

また、A型分離株については、RNAを抽出後、HA遺伝子の全長の塩基配列を決定し、インフルエンザウイルス遺伝子データベースGISAID(Global Initiative on Sharing All Influenza Data)¹⁰⁾から入手したワクチン株、2017年度の流行株とともに系統樹解析を行った。解析に供した株は、大阪府内の豊能・三島地区、北河内・中河内地区、南河内・泉州地区の3地区から、各亜型共に流行前の散发事例については全ての分離株を、流行期では地区別に検体採取日が、約3週間の間隔となるよう分離株を選択した。系統樹上のクレード、サブクレード、群の区別については全国データを参考とした¹¹⁾。

5. 本研究は、地方独立行政法人大阪健康安全基盤研究所倫理審査委員会の承認を得て(承認番号1402-02-2)、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」を遵守して実施したものである。

結果

1. 大阪府内のインフルエンザ流行状況とインフルエンザウイルス検出結果

2017/2018シーズンは2017年第44週(10月30日～11月5日)に、全国で既に流行期入りし

ていた2県に加え、新たに2県が流行期に入り、早期に流行が拡がるとの報道があった¹²⁾が、大阪府においては定点あたりの患者数が1.0を越えたのはその約1ヶ月後の第48週(11月27日～12月3日)からであり、流行開始時期は2016/2017シーズンと同様であった。

特記すべきは、例年は流行期前や流行早期に学級閉鎖事例からB型インフルエンザウイルスが検出されることがあっても、その後の流行はA型が主であることが一般的だが、2017/2018シーズンはB型が早期から検出され、主流行となった点である¹³⁾(図1)。

定点あたり患者数はその後増加し、2018年第3週に44.2、第4週に42.5、第5週に45.0とピークを形成した後、漸減した。定点あたり患者数が1.0を下回ったのは第14週(4月2日～4月8日)であり、2016/2017シーズンのように第18週まで患者数が1.0を下回らなかった¹⁴⁾のとは対照的であった。

2017年第36週(9月4日～9月10日)から2018年第13週(3月26日～4月1日)までに検体採取され、当センターに搬入された255検体からのウイルス検出数は、AH1pdm亜型が32、AH3亜型が93、B型 Yamagata 系統が108、Victoria 系統が5であり、A型とB型の検出比がほぼ1対1であった。

全国データを見ると、シーズン前半の第46週から2018年第1週はAH1pdm亜型とB型の検出報告が多く、第2週以降はAH3亜型とB型の検出報告が多くなり、A型の亜型が移り変わっていったことが伺えた¹⁵⁾。大阪府内は全国集計と異なりAH1pdm亜型の検出数は少なく、流行期を通じてAH3亜型が主に検出された。

近年のAH3亜型の分離株は、赤血球凝集活性(HA活性)が低く、赤血球凝集抑制(HI)試験に用いる8HA単位/50uLを満たさない株がほとんどである¹⁵⁾。2017/2018シーズンにおいても流行初期に得られた分離株をHI試験に供したところ、2016/2017シーズン同様にHA活性が低かったため、HI試験による型別は実施できず、「AH3分離株の遺伝子検査の簡便化とコスト削減に関する情報提供」¹⁵⁾を参考に、CPEが陽性であった培養上清の50倍希釈液を用いてリアルタイムRT-PCR法にて型別を行った。

AH3亜型インフルエンザウイルスが陽性であ

った一部の検体(n=65)については、MDCK細胞およびMDCK-SIAT1細胞の両者に検体を接種して分離培養を行ったが、分離陽性例はMDCK-SIAT1細胞で56株(86.2%)であったのに対し、MDCK細胞では8株(12.3%)のみであった。

2. 分離株の解析

各亜型共に該当週に検体がない場合があり、解析に用いた各地区の分離株数は必ずしも同数ではなかった。

AH1pdm亜型については大阪府内の豊能・三島地区、北河内・中河内地区、南河内・泉州地区の3地区からの分離株14株および、国立感染症研究所で実施された当センターからの今年度の分離株2株を加えた16株のHA全長のシーケンスを、昨シーズンの大阪府内分離株のシーケンスのうち固有のアミノ酸置換をもつ群に属した9シーケンス、GISAIDから得られた昨シーズンまでのワクチン株である、A/California/7/2009と今シーズンのWHO推奨ワクチン株⁴⁾A/Michigan/45/2015、我が国でのワクチン選定株A/Singapore/GP1908/2015¹⁶⁾のシーケンスとともに系統樹解析を実施した(図2)。解析に用いた臨床分離株のシーケンスは昨シーズンに引き続き、全てクレード6Bに属した。今シーズンはサブクレード6B.2に属する株はなく、S84N, S162N, I216Tのアミノ酸置換を持つサブクレード6B.1内のS74R, I295Vのアミノ酸置換を持つ群に全て属していた。さらに2017年9月に分離されたA/OSAKA/179/2017以外の解析株はS164Tのアミノ酸置換を有した。

全国的にも、ほとんどの解析株がS74R, I295V群内に分岐したS164T群に属し、さらにS164T群にP137S, I267T, I372L群、L161I, I404M群など複数の群が形成されている事が報告されている¹¹⁾。当課における解析株ではP137S, I267T, I372L群には1株が含まれたのみであった。L161I, I404M群には8株が含まれた。当群の分離株は全てS74R置換を持つ群から派生しているが、A/Osaka/14/2018のみはS74K置換を有していた。

AH3亜型ウイルスについては、分離株19株のHA遺伝子全長についてダイレクトシーケンスを実施し、GISAIDから得られた、国立感染症研究所で実施された当センターからの2016/2017

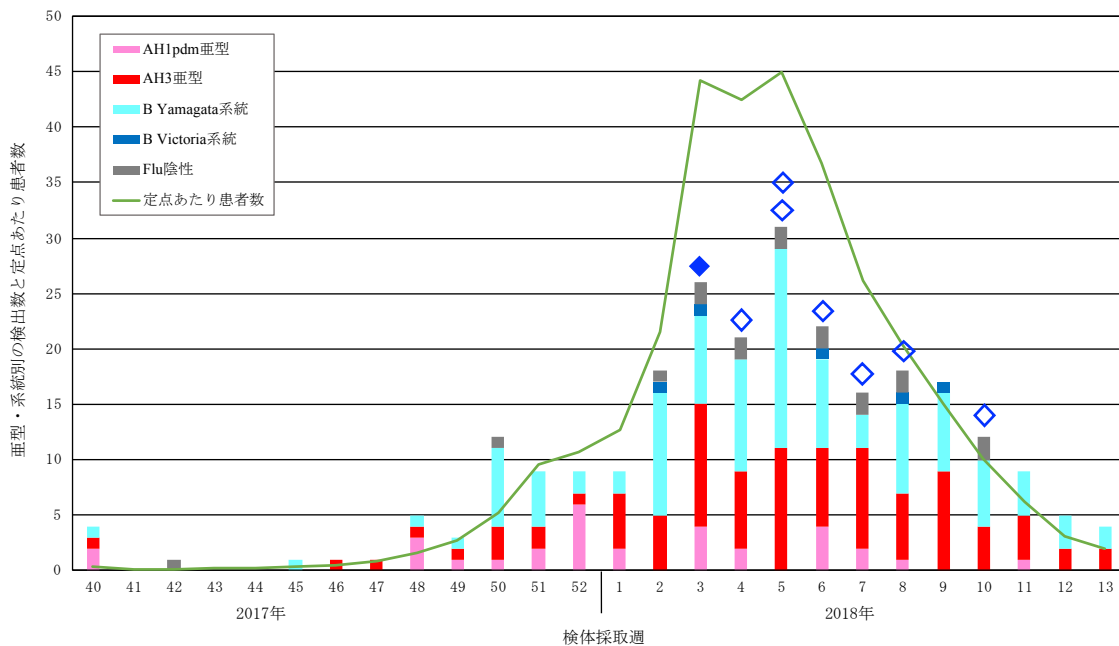


図1. 2017年第40週～2018年第13週のインフルエンザウイルス検出状況と定点あたり患者数の推移
各週の棒グラフ上のシンボルは、当該週にインフルエンザウイルス（Flu）陰性であった検体1検体につき、インフルエンザウイルス以外の呼吸器ウイルスが1種（◇）または2種重複して（◆）検出されたことを示す。検出ウイルス種については表1に掲載。

シーズン流行期、2017/2018シーズン流行期前の夏～秋季分離株のシーケンス、および2012/2013シーズン～2018/2019シーズンのワクチン株とともに系統樹解析を実施した。

全国の分離株の遺伝子解析によると、現在、系統樹上のサブクレード3C.2a内には、さらに特徴的なアミノ酸置換を持つサブクレード3C.2a1（N171K, I406V, G484E）、3C.2a2（T131K, R142K, R261Q）、3C.2a3（N121K, S144K）、3C.2a4（N31S, D53N, R142G, S144R, N171K, I192T, Q197H）が形成されている。3C.2aはさらに3C.2a1a（N121K, G479E, T135K, N122D）と3C.2a1b（N121K, K92R, H311Q）に分かれており、3C.2a1bは3C.2a1b+135K（E62G, R142G, T135K）および3C.2a1b+135N（T135N）が形成されている¹¹⁾。

2016/2017シーズン終了時点の当課での分離株の解析からは、3C.2a内に存在する抗原変異株A/OSAKA/109/2017の含まれる群、または3C.2a1bのいずれかが今後の流行株となっていくと考えられていたが¹⁴⁾、2017年7月～10月の流行期間前における分離株は3C.2a1bにほとんどが含

まれ、抗原変異株と同じ群に属する株はなかった。8月の分離株で1株のみ両群以外の3C.2a3に分類される株があった（図3）。

流行期に入ってから解析株は3C.2a1b、3C.2a2、3C.2a3に全て含まれた。3C.2a3に含まれたのは1株（A/Osaka/183/2017）のみで、残りは3C.2a1bと3C.2a2に属した。3C.2a1bには昨シーズンからの流行株も含まれアミノ酸置換も多様であるのに対し、3C.2a2は流行期の株のみが属し各株間のアミノ酸配列の差は比較的小さかった。

両亜型とも、地区毎で検出されるウイルスの群に偏りはなかった。

3. インフルエンザウイルス以外の呼吸器ウイルスの検出

搬入された255検体を検査した結果、季節性インフルエンザウイルスが陰性であった17検体のうち8検体から他の呼吸器ウイルスが検出された（図1、表1）。今シーズンは目立って検出されたウイルスはなく、ヒトコロナウイルス229E、C群ライノウイルスが2検体より検出さ

表 1. インフルエンザウイルス陰性検体からの他の呼吸器ウイルス検出状況

検体採取週		検出ウイルス
2018年	第3週	C群ライノウイルス + ヒトコロナウイルスHKU-1*
	第4週	ヒトコロナウイルスNL63
	第5週	ヒトコロナウイルス229E ヒトメタニューモウイルス
	第6週	パラインフルエンザウイルス2型
	第7週	C型インフルエンザウイルス
	第8週	ヒトコロナウイルス229E
	第10週	C群ライノウイルス

* 重複感染

れたが、他はヒトコロナウイルス NL63、ヒトメタニューモウイルス、パラインフルエンザウイルス 2 型、C 型インフルエンザウイルスが 1 検体ずつから検出されたのみであった。1 検体のみ、C 群ライノウイルスとヒトコロナウイルス HKU-1 が重複して検出された (表 1)。インフルエンザウイルス以外のウイルスが検出されたのは、定点あたり患者数がピークを示した 2018 年第 3 週から、同患者数が 10.1 を示す第 10 週までであった。

考 察

2017/2018 シーズンの大阪府内におけるインフルエンザの流行期は、2017 年第 48 週から 2018 年第 14 週であった。昨シーズンと比較し、今シーズンは、ピークを過ぎた後速やかに終息したが、ピーク時の定点あたり患者数は 3 週連続で 40 を越え、患者数は増大した。

ウイルス検出の結果、A 型対 B 型の検出数はほぼ 1 対 1 であり、珍しく B 型の流行が大きいシーズンとなった。亜型、系統別の検出比は、AH1pdm 亜型対 AH3 亜型が約 1 対 3 であったのに対し、B 型は 5 株を除き全て Yamagata 系統であったことから、主流は B 型の Yamagata 系統であった事が明らかとなった。全国データを見ると、2018 年 5 月 10 日現在の各亜型の検出数は、AH1pdm09 亜型 2167、AH3 亜型 2423 でほぼ 1 対 1 であり¹⁷⁾、他府県と比較して大阪府内では AH1pdm09 亜型の流行が小さかったことが伺えた。

AH3 亜型インフルエンザウイルスについては、MDCK 細胞および MDCK-SIAT1 細胞の両者に検体を接種して分離培養を行ったが、両細胞での分離率に大きく差がみられた。当課では、2016/2017 シーズンに引き続き、2017/2018 シーズンも MDCK-SIAT1 細胞を併用することで分離率の向上に努めてきた。AH3 亜型が主流となるシーズンは多いため、今後もヒト 2,6-シアル酸転移酵素 cDNA をトランスフェクションした細胞を従来の MDCK 細胞と併用して分離を行っていく必要がある。

2016/2017 シーズンに引き続き、A 型分離株について HA 全長のシーケンスを実施し、系統樹解析を行った。2017/2018 シーズン AH1pdm 亜型分離株については、解析した 16 株は全てサブクレード 6B.1 に属し、2017 年 9 月に分離された A/OSAKA/179 /2017 以外の解析株は S164T のアミノ酸置換を有した。さらに S164T 置換群に含まれる 15 株は、アミノ酸置換 P137S, I267T, I372L を持つ群に 1 株、アミノ酸置換 L161I, I404M を持つ群に 8 株が含まれており、多様化する群の中から新しい流行株が派生することが伺えた。さらに、L161I, I404M 群は全て S74R 置換を持つ群から派生しているが、同群の中の A/Osaka/14 /2018 のみは S74K 置換を有していた。今後、S74K 置換を有する株が増加してくるのかについても注目していきたい。また 1 株のみではあったものの、S164T 置換を持たず、H273Q 置換を持つ A/OSAKA/179/2017 がシーズン初期の 2017 年 9 月中旬に分離された。全国でもこの群に含まれるのは 2017 年秋期の数株に代表されるのみであ

るため¹¹⁾、今後この群に属する株が再度検出されるかも興味深い。

AH3 亜型については、2016/2017 シーズン終了時点では 3C.2a1 内に存在する抗原変異株 A/OSAKA/109/2017 の含まれる群、または 2016/2017 シーズン流行期後の 5 月、7 月の分離株が含まれるサブクレード 3C.2a1b のいずれかが今後の流行株となっていくと考察していた¹⁴⁾。2017 年 7 月～10 月の流行期間前における分離株はサブクレード 3C.2a1b にほとんどが含まれ、抗

原変異株と同じ群に属する株はなかった。

流行期に入ってから解析株は 3C.2a1b、3C.2a2、3C.2a3 に全て含まれた。3C.2a3 に含まれたのは 1 株のみで、残りは 3C.2a1b と 3C.2a2 に属する株に分かれた。

A 型インフルエンザウイルスの流行形態は「global migration」と表現されるように、世界各地の流行株の変異が地域ごとに異なるのではなく、ある流行株から派生した変異ウイルスの中から、常に 1 種類のウイルス株が世界中でほぼ

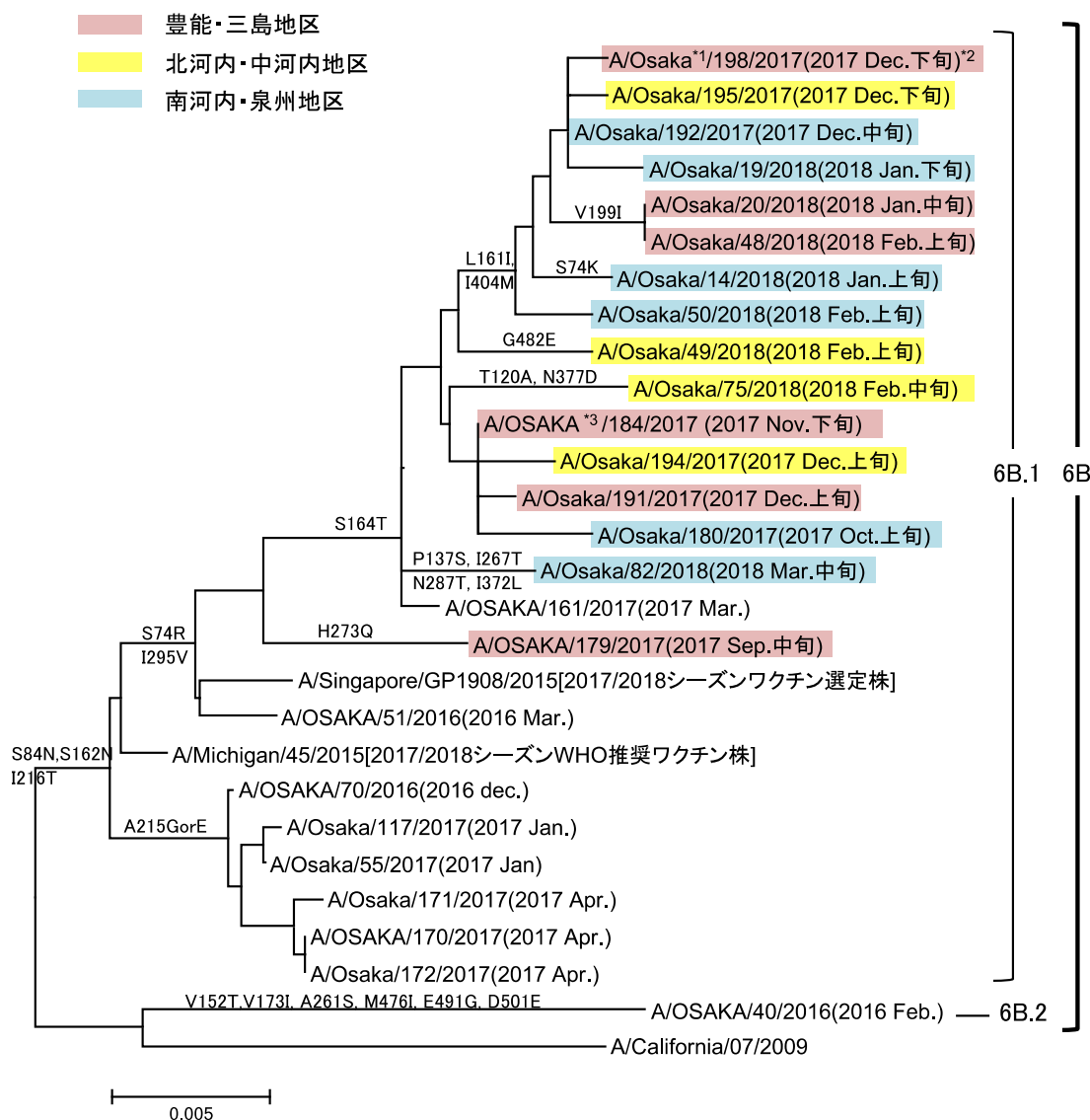


図 2. AH1pdm 亜型 HA 全長の遺伝子系統樹解析

- *1. Osaka 表記は当課でのシーケンスデータ
- *2. ()内は検体採取時期を示す
- *3. OSAKA 表記は国立感染症研究所でのシーケンスデータ

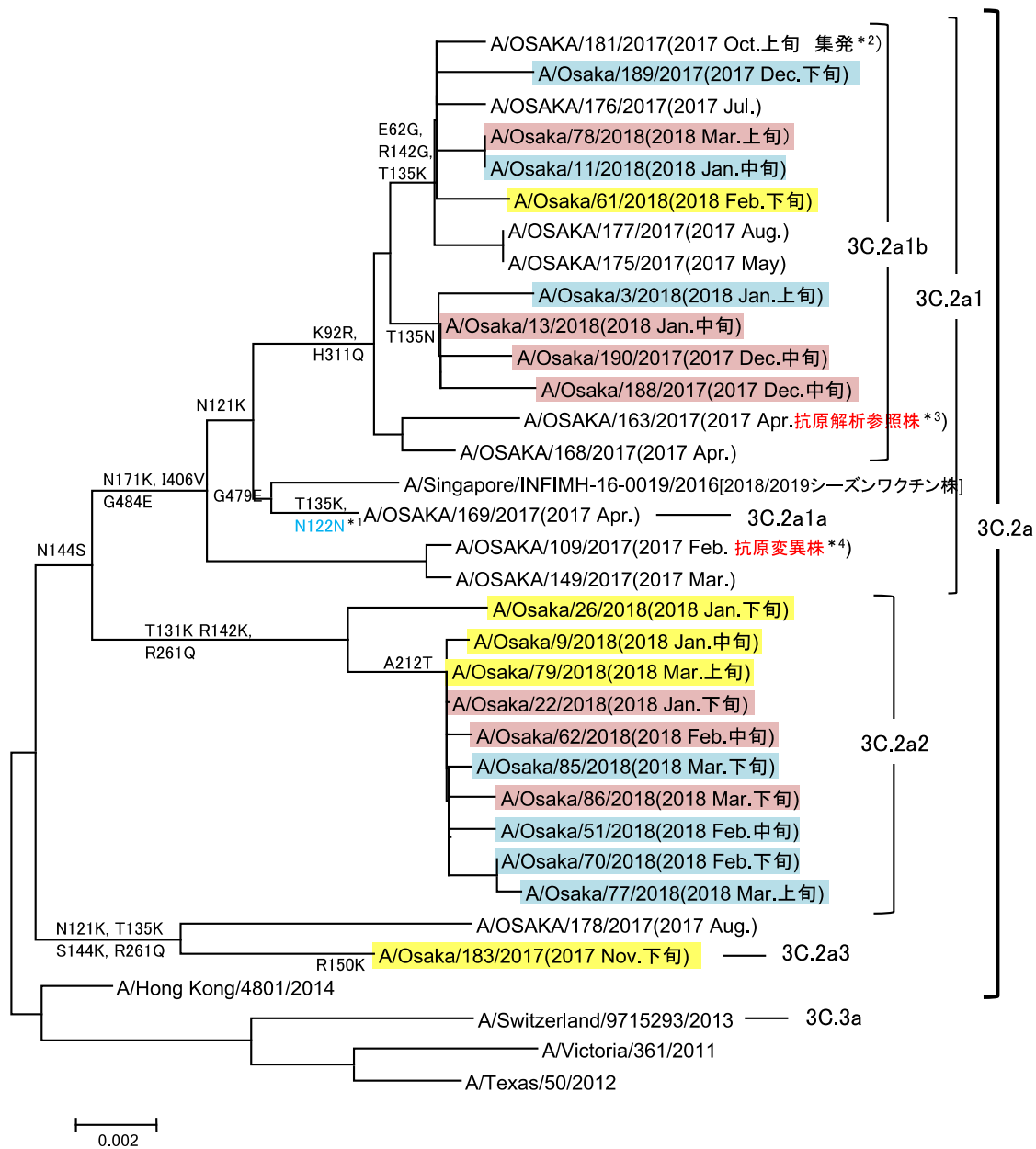
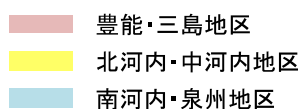


図3. AH3 亜型の HA 全長の遺伝子系統樹解析
 表記等は図2.と同様

- *1 サブクレード 3C.2a1a は N122D のアミノ酸置換を持つが、A/OSAKA/169/2017 は当該置換は見られない (青字)
- *2 府内中学校での集団発生事例から分離された株
- *3、4 2016/2017 シーズン分離株のうち、国立感染症研究所実施の詳細な抗原解析の結果抗原変異株と判定された株、または 2017/2018 シーズン抗原解析用の参照株に採用された株
 文献 14)参照

同時に選択淘汰されて次の流行株となることが示されている¹⁸⁾。

3C.2a1b には昨シーズンからの流行株も含まれアミノ酸置換も多様であるのに対し、3C.2a2 は 2017/2018 シーズン流行期の株のみが属し、各株間のアミノ酸配列の差は比較的小さいため、今後ヒト個体内での選択圧により多様化して来るとともに、新たな流行株が派生する可能性もあり、今後も継続して分離株の解析を続けていく必要があると考えられた。

2016 年度より、インフルエンザ病原体サーベイランスの検体は、インフルエンザ指定提出機関のみからの搬入となっている。さらに、それに伴い「感染症発生動向調査事業実施要綱の一部改正について」¹⁹⁾に記載された検査票様式に、インフルエンザ迅速診断キットの実施状況とその結果、および抗インフルエンザウイルス薬投与の有無の記載欄が追加された。それにならい大阪府においても、検査依頼票に迅速診断キットの実施状況とその結果の記載欄が設けられたためか、臨床症状のみでインフルエンザと診断され搬入される症例は減少している。

当課ではインフルエンザウイルスの検出が陰性であった検体について、その他の呼吸器ウイルスの検索を行っている。症例数が少ないこともあり、今シーズンは目立って検出されたウイルスはなく、ヒトコロナウイルス 229E、C 群ライノウイルスが 2 検体より検出されたが、他は 1 検体ずつの検出であり、重複感染例も 1 検体のみであった。また、インフルエンザウイルス以外のウイルスが検出された期間は、定点あたり患者数がピークを示した 2018 年第 3 週から同患者数が 10.1 を示す第 10 週までと流行の中心にあたり、ピーク時には症状と周囲の流行状況のみからインフルエンザと診断される例もあるが、そのような中には、他の呼吸器ウイルスが原因の紛れ込みがあり、インフルエンザワクチンの有効性を低下させる要因となるため、詳細な原因検索が必要であると考えられた。

謝 辞

本研究の一部は、厚生労働行政推進調査事業費補助金「ワクチンの有効性・安全性の臨床評価と VPD の疾病負荷に関する疫学研究」の一環

として行われた。

本研究において、検体採取、情報提供、諸連絡等に携わって頂きました、全ての皆様に深謝致します。

利 益 相 反

開示すべき利益相反はない。

文 献

- 1) 国立感染症研究所. IDWR 2018 年第 10 号 注目すべき感染症<インフルエンザ>. <https://www0.niid.go.jp/niid/idsc/idwr/IDWR2018/idwr2018-10.pdf>
- 2) 国立感染症研究所. IDWR 感染症の話「インフルエンザとは」. <https://www.niid.go.jp/niid/ja/kansennohanashi/219-about-flu.html>
- 3) 福島若葉. 6 歳未満児におけるインフルエンザワクチンの有効性:2013/14 および 2014/15 シーズン (厚生労働省班研究報告として). *IASR* 2016; **37**: 230-231.
- 4) WHO. Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2018-2019 northern hemisphere influenza season. http://www.who.int/influenza/vaccines/virus/recommendations/2018_19_north/en/
- 5) 大阪府感染症情報センター. インフルエンザ情報. <http://www.iph.pref.osaka.jp/infection/influ/shin-gata.html>
- 6) 国立感染症研究所. インフルエンザ診断マニュアル (第 3 版) リアルタイム RT-PCR(TaqMan Probe 法)による同定. 平成 26 年. 24-28.
- 7) Morikawa S, Hiroi S, Kase T. Detection of respiratory viruses in gargle specimens of healthy children. *J Clin Virol* 2015; **64**: 59-63.
- 8) Ishiko H, Shimada Y, Yonaha M, Hashimoto O, Hayashi A, Sakae K, Takeda N. Molecular diagnosis of human enteroviruses by phylogeny-based classification by use of the VP4 sequence. *J Infect Dis* 2002; **185**: 744-754.
- 9) Matrosovich M, Matrosovich T, Carr J, Roberts

- NA, Klenk HD. Overexpression of the alpha-2,6-sialyltransferase in MDCK cells increases influenza virus sensitivity to neuraminidase inhibitors. *J Virol* 2003; 77: 8418-8425.
- 10) GISAID (The Global Initiative on Sharing All Influenza Data). Epi Flu™. <http://platform.gisaid.org/epi3/frontend#1832a9>
 - 11) 国立感染症研究所. 「インフルエンザウイルス流行株抗原性解析と遺伝子系統樹 (2018年5月2日)」. <https://www.niid.go.jp/niid/ja/flu-antigen-phylogeny.html>
 - 12) 日経メディカル. インフルエンザ診療 Next トピックス 2017/11/10号. <http://medical.nikkeibp.co.jp/leaf/mem/pub/special/flu/topics/201711/553598.html>
 - 13) 国立感染症研究所. IASR インフルエンザウイルス分離・検出速報 (自動更新). <https://nesid4g.mhlw.go.jp/Byogentai/Pdf/data2j.pdf>
 - 14) 森川佐依子, 廣井聡, 弓指孝博. 大阪府内における 2016/2017 シーズンのインフルエンザ流行状況. *大阪健康安全基盤研究所 研究年報* 2017; 1: 20-28.
 - 15) 国立感染症研究所. 「AH3 分離株の遺伝子検査の簡便化とコスト削減に関する情報提供」. 平成 27 年 3 月 5 日 (担当者メール)
 - 16) 国立感染症研究所. 2018/19 シーズン インフルエンザワクチン株. <https://www.niid.go.jp/niid/ja/flu-m/2066-idsc/re-lated/584-atpcs002.html>
 - 17) 国立感染症研究所. IASR シーズン別ウイルス検出状況 由来ヒト:インフルエンザ&その他の呼吸器ウイルス、2007/08～2017/18 (2018年5月10日作成). <https://nesid4g.mhlw.go.jp/Byogentai/Pdf/data95j.pdf>
 - 18) Nelson MI, Simonsen L, Viboud C, Miller MA, Holmes EC. Phylogenetic analysis reveals the global migration of seasonal influenza A viruses. *PloS Pathogens* 2007; Sep 14: 3: 1220-8
 - 19) 厚生労働省. 「感染症発生動向調査事業実施要綱の一部改正について」(平成 27 年 11 月

9 日 健 発 1109 第 3 号) .
<http://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-10900000-Kenkoukyoku/0000115938.pdf>

WEB サイトの内容は 2018 年 5 月 30 日に確認した。

Influenza activity during the 2017/2018 season in Osaka Prefecture

Saeko MORIKAWA, Satoshi HIROI and Takahiro YUMISASHI

During the 2017/2018 influenza season in Osaka Prefecture, influenza activity increased in the 48th week in 2017, peaked in the 3rd - 5th weeks in 2018 (the number of cases per sentinel was 44.17, 42.49 and 45.02 respectively), and decreased. In this season, influenza B viruses (Yamagata lineage) predominated followed by influenza A each subtype virus. The dominant subtype of influenza A viruses is AH3 in Osaka Prefecture. The HA genes of some influenza A positive isolates were analyzed, they belonged to the several groups with some characteristic amino acid substitutions. The diversity of each group was the same trend as the sequence analysis of virus strains collected in Japan. It is necessary that genetic analysis of subsequent isolates to determine from which group the next epidemic strain is derived. We also tested 17 influenza virus negative specimens for other respiratory viruses. Only one of the 8 positive samples contained two viruses.

Key words : influenza virus, infectious agents surveillance, phylogenetic tree analysis, respiratory virus

大阪府における蚊媒介ウイルス感染症に対するサーベイランス調査 (2017年度)

青山幾子^a, 尾之内佐和^b, 山口敬治^a, 弓指孝博^a

大阪府では2003年度より蚊媒介ウイルス感染症の発生を監視する目的で、媒介蚊と死亡カラスについてサーベイランス事業を実施している。

2017年度は6月から10月にかけて府内27カ所で蚊の捕集を行った。捕集された雌の蚊(8種4,502匹、386プール)について、蚊媒介ウイルスの検出を試みたが、ウエストナイルウイルス、デングウイルス、日本脳炎ウイルス、ジカウイルス、チクングニアウイルスは検出されなかった。一方、捕集した蚊の乳剤をC6/36細胞、Vero細胞に接種し細胞変性効果が得られたもののうち22プールから、蚊の保有するフラビウイルス属の*Aedes Flavivirus*、*Culex Flavivirus*が分離された。

キーワード：蚊媒介感染症、媒介蚊、サーベイランス、*Aedes Flavivirus*、*Culex Flavivirus*

蚊が媒介するウイルス性感染症には日本脳炎やウエストナイル熱、デング熱、ジカウイルス感染症、チクングニア熱、黄熱などがある。日本脳炎は昔から日本に常在する感染症だが、その他の感染症は現在国内には常在しない。しかし、2014年夏に東京都内の公園を中心にデング熱の流行が起こり、162人のデング熱患者が発生した¹⁾。また近年、海外でジカウイルス感染症やチクングニア熱が流行し、それらの輸入症例が報告されていることから²⁾、これら感染症の国内発生が危惧されている。

これらの感染症が国内に侵入するには、ウイルスに感染した海外の蚊が何らかのルートで侵入する場合と、発症中もしくは潜伏期に帰国したヒトが国内の蚊にウイルスを伝播してしまう場合が考えられる。これらの病原体を媒介することのできる蚊の種類はわが国にも広く分布しているため、蚊媒介ウイルス感染症は、蚊の発生時期であればいつでもアウトブレイクが起きる可能性がある。そのような事態を防ぐために

は、これらウイルスの国内への侵入、流行を監視する必要があり、国のガイドラインにおいて地方自治体における媒介蚊の調査体制が求められている^{3,4)}。これらの感染症は日本脳炎と黄熱以外に有効なワクチンはなく、また治療薬もないため、アウトブレイクが起きないように努めることが重要である。

大阪府はウエストナイルウイルス(WNV)の侵入を早期発見し、蔓延を防止するために、2003年度より蚊のサーベイランス調査を開始し^{5,6)}、WNVに対する継続的な監視を実施してきた⁷⁾。2004年にはウエストナイル熱対応指針が策定され、WNV侵入前のサーベイランス調査や、侵入後の対応が速やかに行える体制が整えられた⁸⁾。サーベイランス開始時はウエストナイル熱、デング熱、日本脳炎を対象としていたが、その後海外でのチクングニア熱、ジカウイルス感染症の流行に伴って、これらの病原ウイルスも検出できるよう検査法を改定した⁹⁾。

a 大阪健康安全基盤研究所微生物部ウイルス課

b 岐阜大学応用生物科学部共同獣医学科(元・大阪健康安全基盤研究所微生物部ウイルス課)

また、カラスは WNV の感受性が高く、WNV 感染により死亡しやすいため、モニタリング調査に利用されている。大阪府においても厚生労働省の通知に従い¹⁰⁾、死亡原因の不明なカラスの死骸が同地点で2羽以上見られた場合、そのカラスについて WNV 検査を実施している。ここでは2017年度の調査結果について報告する。

調査方法

1. 捕集定点および調査実施期間

図1に示したように大阪府管内、東大阪市内、高槻市内、豊中市内、枚方市内に計27カ所の定点を設定し、2017年6月第4週から10月第1週（東大阪市及び高槻市は9月3週）までの期間、隔週の火曜日から水曜日に蚊の捕集調査を実施した。今年度新たに地点9、14、15を追加した。地点10は今年度同市内で地点を変更した。また、地点7、8、9は実施日によっていずれかの定点を選択して実施した。



2. 蚊の捕集方法

蚊の捕集には CDC ミニライトトラップ (John. W.Hock Company) を使用し、蚊の誘引のためドライアイス (1~2kg) を併用した。トラップは調査実施日の夕刻 16~17 時から翌朝 9~10 時までの約 17 時間設置した。トラップを設置する高さは地上 1.5~2m とした。回収時、捕集装置から蚊が逃げないように捕集網部分を外し、約 1 時間冷凍した後に、蚊を取り出して実体顕微鏡下で形態学的に種を同定した^{11,12)}。なお *Culex pipiens pallens* (アカイエカ) と *Culex pipiens molestus* (チカイエカ) については形態学的な同定が困難であるため、それらをまとめて *Culex pipiens complex* (アカイエカ群) とした。蚊は調査日、調査地点、蚊の種類ごとにプールし、ヒトにウイルスを媒介する可能性のある雌の蚊のみウイルス検査に用いた。1 地点 1 種類あたりの検体数が 50 匹を超える場合は、複数のプールに分割し、各検体は遺伝子検査時まで冷凍保存した。

	番号	設置市	担当保健所
北摂	1	池田市	池田
	2	吹田市	吹田
	3	茨木市	茨木
	4	高槻市	高槻市
	5	豊中市(西)	豊中市
	6	豊中市(中)	
	7	豊中市(北)	
	8	豊中市(南)	
	9	豊中市(東)	
北河内	10	守口市	守口
	11	寝屋川市	寝屋川
	12	大東市	四條畷
	13	枚方市(西)	枚方市
	14	枚方市(北)	
	15	枚方市(東)	
	16	枚方市(南)	
中南河内	17	八尾市	八尾
	18	藤井寺市	藤井寺
	19	富田林市	富田林
	20	東大阪市(西)	東大阪市
	21	東大阪市(東)	
泉州	22	和泉市	和泉
	23	泉大津市	岸和田
	24	岸和田市	
	25	貝塚市	
	26	泉佐野市	泉佐野
	27	阪南市	

図1 蚊の捕集地点

3. 蚊からのウイルス検出

蚊のウイルス検査は、蚊媒介ウイルスのうち、フラビウイルス科フラビウイルス属の WNV、日本脳炎ウイルス (JEV)、デングウイルス (DENV)、ジカウイルス (ZIKV)、トガウイルス科アルファウイルス属のチクングニアウイルス (CHIKV) を対象として実施した。

蚊の破碎は 2mL のマイクロチューブに検体と滅菌したステンレス製クラッシャーを入れ、0.2%ウシ血清アルブミン (BSA) 加ハンクス液を 250 μ L 加えた後、多検体細胞破碎装置 (シェイクマスター Ver1.2 システム、バイオメディカルサイエンス) で約 1 分間振とうして行った。破碎後、マイクロチューブを軽く遠心してからクラッシャーを除去し、0.2%BSA 加ハンクス液を 1 プール 30 匹未満は 500 μ L、30 匹~50 匹は 750 μ L 追加して攪拌した。それを 4 $^{\circ}$ C 12,000rpm で 15 分間遠心し、その上清を 0.22 μ m もしくは 0.45 μ m Millex フィルター (ミリポア) で濾過して蚊乳剤を作製した。このうち 150 μ L について E.Z.N.A. Viral RNA Kit (OMEGA bio-tek) または QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) を使用して RNA を抽出した。

WNV は多くの種類の蚊が媒介するため、全ての蚊の種類を検査対象とし、フラビウイルス共通プライマー (FU1/cFD2) と、WNV 特異的検出プライマー (WNNY 514/904) を用いて RT-PCR を実施した^{13,14)}。フラビウイルス共通プライマー (FU1/ cFD2) は JEV、DENV、ZIKV も検出可能であるため、FU1/ cFD2 のみ陽性の場合には増幅産物のダイレクトシーケンスを行い、BLAST 相同性検索にてウイルスの種類を同定することとした。また、CHIKV の媒介蚊はヒトスジシマカであるため、CHIKV についてはヒトスジシマカのプールのみ CHIKV 特異的検出プライマー (chik10294s/ 10573c) を用いてウイルス遺伝子の検出を実施した¹⁵⁾。また DENV については検出感度を上げるためにヒトスジシマカについて DENV 特異的検出プライマー (Dus/Duc) も使用してウイルス遺伝子の検出を試みた¹⁶⁾。

4. 蚊からのウイルス分離

蚊乳剤上清 100 μ L を 48 ウェルプレートに増殖させた Vero 細胞、C6/36 細胞に接種し、それぞれ 37 $^{\circ}$ C、28 $^{\circ}$ C で約 2 週間培養し、細胞変性効果

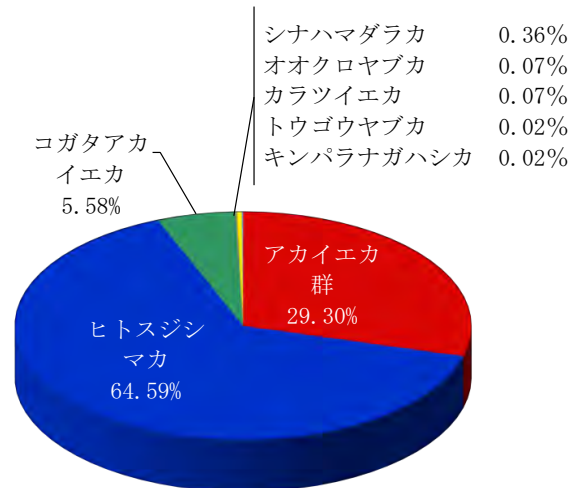


図 2 捕集された蚊の比率 (27 地点)

(CPE、cytopathic effect) を観察した。CPE が出現した場合は培養上清を回収した。なお、3 代盲継代を繰り返し、CPE が出現しなかった場合は陰性と判定した。回収した上清は QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) を使用して RNA 抽出を実施し、すべての蚊のプールについてフラビウイルス共通プライマー (FU1/cFD2、FU2/cFD3)^{13,17)}、ヒトスジシマカのプールについて CHIKV 特異的検出プライマー (chik10294s/ 10573c) を用いてウイルス遺伝子の検出を実施した。陽性の場合には増幅産物のダイレクトシーケンスを行い、BLAST 相同性検索にてウイルスの種類を同定した。

5. カラスからのウイルス検出

死亡原因の不明なカラスの死骸が同地点で 2 羽以上確認され、回収時に腐乱やハエのウジの発生がない新鮮な個体であった場合に WNV 検査を実施した。死亡カラスは、解剖して採脳した後、カラスごとに 0.2%BSA 加ハンクス液を用いて 10%脳乳剤を作製し、蚊と同様に RNA 抽出後、WNV 遺伝子検査を実施した。

結 果

1. 蚊の捕集結果について

捕集された雌の蚊は 8 種 4,502 匹であった。その構成は *Aedes (Stegomyia) albopictus* (ヒトスジシマカ) 2,908 匹、アカイエカ群 1,319 匹の 2 種で全体の 94.0% を占め、次いで *Culex tritaenio-*

rhynchus (コガタアカイエカ) が 251 匹捕集された (図 2)。その他に捕集された蚊の種類は *Anopheles sinensis* (シナハマダラカ) 16 匹、*Armigeres subalbatus* (オオクロヤブカ) 3 匹、*Culex bitaeniorhynchus* (カラツイエカ) 3 匹、*Aedes togoi* (トウゴウヤブカ) 1 匹、*Tripteroides bambusa* (キンバラナガハシカ) 1 匹であった。

調査期間を通じた捕集数の推移をみると (図 3)、アカイエカ群は調査期間中、常に捕集され、捕集数の推移はサーベイランス開始時の 6 月末から 7 月初めにかけてピークに達しており、その後捕集数は次第に減少した。ヒトスジシマカも、調査期間中、常に捕集され、7 月 12 日と 8 月 9 日にピークを示す二峰性を示した。

定点別の捕集数では (図 4)、各定点によって捕集数や捕集される種類に大きな差がみられたが、アカイエカ群とヒトスジシマカはすべての地点で捕集された。アカイエカ群は豊中 (中) と東大阪 (東)、藤井寺、阪南で多く捕集された。ヒトスジシマカは、高槻、豊中 (西)、寝屋川、東大阪 (東)、和泉で多く捕集され、この傾向は昨年度と同様であった。コガタアカイエカは 11 地点で捕集され、東大阪 (東)、阪南、高槻、和泉の順に多く捕集され、それぞれ 148 匹、42 匹、23 匹、17 匹で、東大阪 (東) が大きな割合を占めた (58.2%)。シナハマダラカは高槻、東大阪 (東)、和泉、貝塚の 4 地点、オオクロヤブカは和泉、貝塚の 2 地点、トウゴウヤブカは、東大阪

(東) の 1 地点、キンバラナガハシカは枚方 (東) の 1 地点、カラツイエカは豊中 (西)、東大阪 (東)、和泉の 3 地点でそれぞれ捕集された。

2. 蚊のウイルス遺伝子検査結果

各定点で捕集された蚊を種類別に分け 386 プールの乳剤を作製して RT-PCR 法による遺伝子検査を実施したところ、すべての検体において WNV、JEV、DENV、ZIKV 遺伝子は検出されなかった。またヒトスジシマカの 185 プールについても、CHIKV 遺伝子は検出されなかった。

3. 蚊からのウイルス分離結果

CPE が見られた 95 プール (Vero 細胞 32 プール、C6/36 細胞 63 プール) についてフラビウイルス共通プライマーを用いて遺伝子検査を実施したところ 22 プールが陽性となり、BLAST 相同性検索から 15 プールが *Aedes Flavivirus*、7 プールが *Culex Flavivirus* と同定された。これらは蚊の保有するフラビウイルスで、ヒトへの病原性は報告されていない。また、ヒトスジシマカを接種した 45 プールについて CHIKV 特異的検出プライマーを用いて遺伝子検査を実施したが、すべて陰性であった。

4. 死亡カラスのウイルス遺伝子検査結果

今年度死亡カラスの搬入事例はなかったため、検査を実施しなかった。

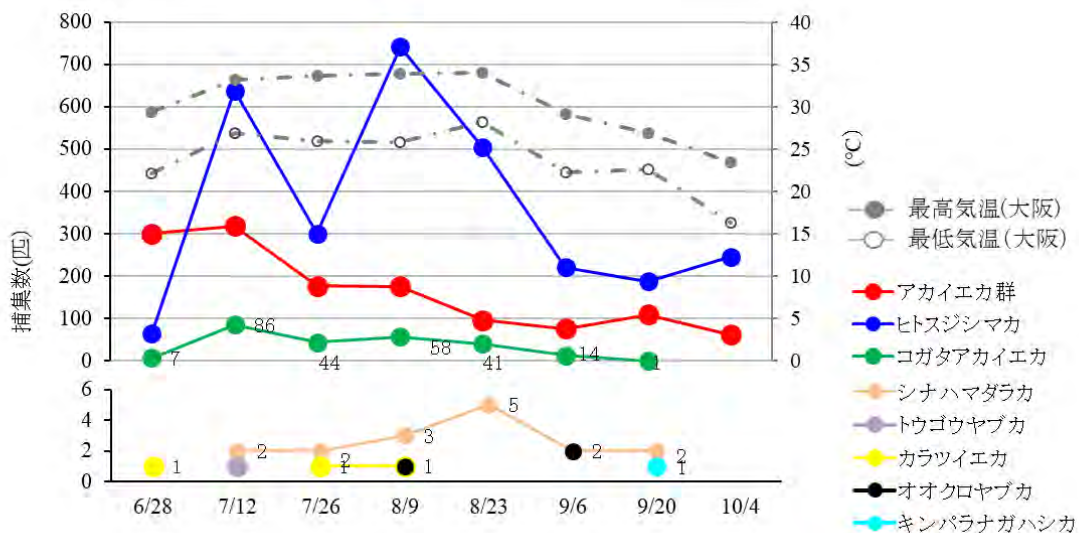


図 3 蚊の捕集数の推移

考 察

各調査地点で捕集される蚊の種類には、地点周囲の環境が大きく反映される。調査地点のうち、豊中（西）、東大阪（西）、和泉、阪南は、周囲に田畑や池、竹林などがあり、蚊の発生源になる環境の多いところにトラップを設置しているため捕集される蚊の種類が多様になったと考えられる。また、高槻や寝屋川は、トラップ設置個所の周囲に雨水桝等が多くあるため、ヒトスジシマカが発生しやすい環境が整っていたと考えられる。

捕集数の変動には、調査実施前の気候変動や当日の天候、気温、風速、降水量などが大きく影響する。今回、アカイエカ群は、調査を開始した6

月末から7月初旬にピークを示した。これはこれまでの調査と同様の傾向であった。大阪管区気象台によると大阪府では例年5月から平均気温が20℃を超え、6月には最高気温の平均が27～28℃となる¹⁸⁾。このような時期にはアカイエカはすでに各地で発生していると考えられる。ヒトスジシマカは、全地点の集計では、6月末より急激に捕集数が増加し、二峰性のピークを示した。地点別にみると二峰性の傾向が強いのは、ヒトスジシマカの捕集数の多い地点であり、これらの捕集数が反映されて調査地点全体で二峰性のピークになったと考えられた。ヒトスジシマカは、野外に放置された古タイヤや空き缶、墓地の花立て、雨水桝、竹の切株などに溜まる小規模な水たまりが

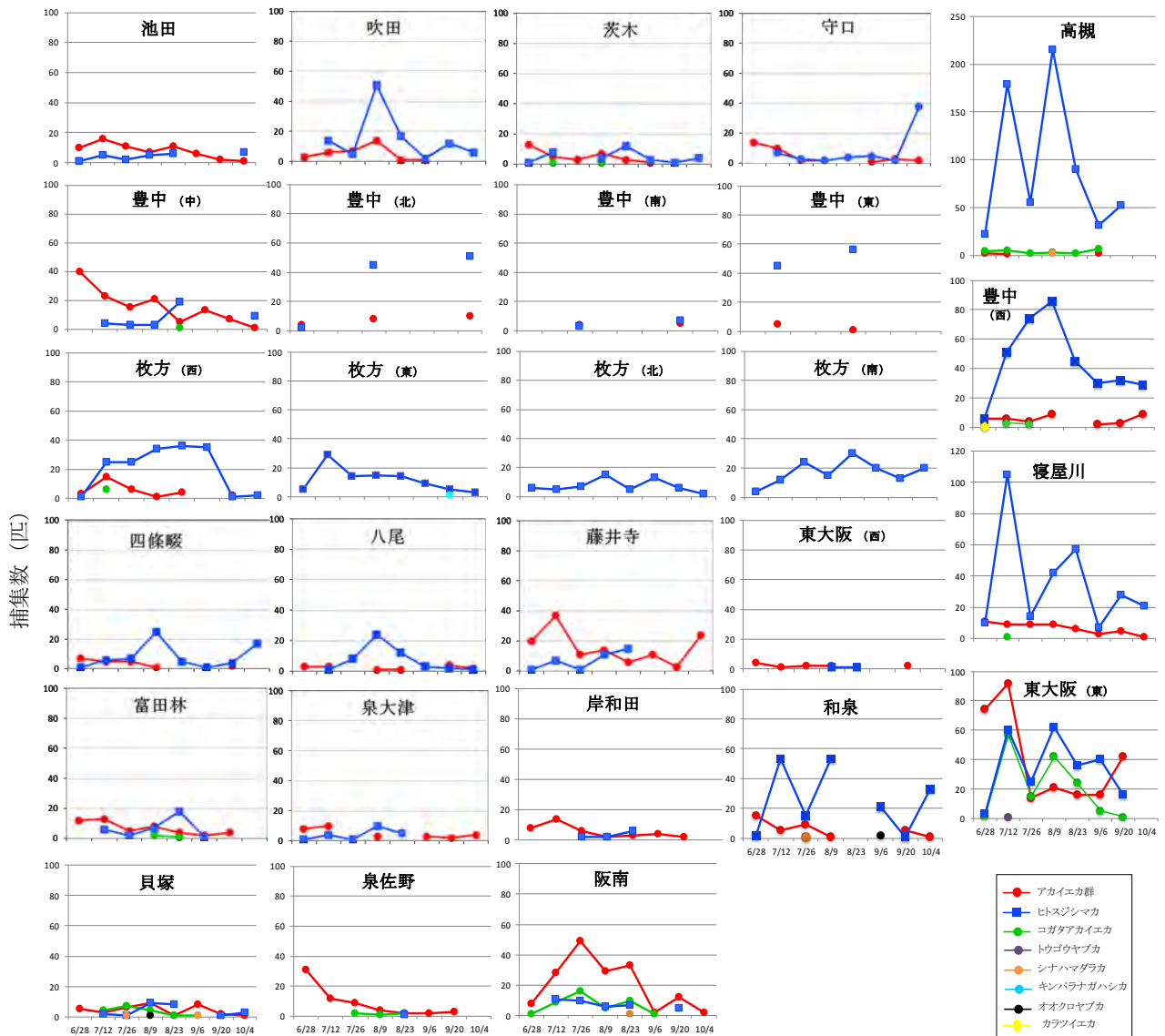


図4 定点別蚊の捕集数の推移

幼虫の生息場所（発生源）となる。このような発生源は、日照りや降雨などの気象条件に大きく影響を受けると考えられる。気象庁の資料によると、6月後半から7月にかけて大阪で降水量が記録されたのは6月20、21、24、25、28、30日、7月4、5、9、10、27、28、30日となっており¹⁸⁾、6月後半に比べ7月中旬は降雨がみられなかった。また7月は連日最高気温が30℃を超える真夏日であった。これら天候の影響をうけ、発生源となる水が蒸発するなど、ヒトスジシマカの継続的な発育・増殖が阻害され、ピークが二峰性になったと考えられた。

今年度、大阪府内における感染症媒介蚊サーベイランスの検査結果では、感染症の原因となるウイルスは検出されなかった。しかし、大阪府には国際拠点空港である関西国際空港や国際戦略港湾に指定された大阪港があり、それ以外にも大阪国際空港、堺泉北港などのいくつも国際空港があるため、海外から持ち込まれた蚊媒介感染症が大阪府内の蚊に浸淫する可能性は無視できない。捕集蚊のうち大多数を占めたアカイエカ、ヒトスジシマカはWNVの主要な媒介蚊、さらにヒトスジシマカはDENV、ZIKV、CHIKVの主要な媒介蚊であり、府内のいずれの地点でもこの2種は捕集された。蚊媒介感染症の蔓延防止対策には、国内未発生時からこれらの生息密度を低減させておくことが、重要であると考えられた。

また、今回のサーベイランスではDENV、ZIKV、CHIKVの海外における主要な媒介蚊である*Aedes aegypti*（ネッタイシマカ）は捕集されなかったが、成田空港（2012～2015年）、東京国際空港（2013年）、中部国際空港（2016年）と近年、航空機を介したネッタイシマカの侵入事例が増加する傾向にある¹⁹⁾。これらの空港では成虫だけでなく、幼虫や蛹も確認されており、いずれの事例も一時的な生息で年を越す定着は確認されていないが、今後空港周辺の生息場所の温度条件が蚊の生息環境として適合すれば、ネッタイシマカが越冬に成功する可能性があり、感染症媒介蚊の生息域の拡大も懸念される。

さらに、2016年関西国際空港で我が国に生息していない外来種の*Culex gelidus*（ゲリデュスイエカ）が捕集された¹⁹⁾。これは東南アジアでは日本脳炎の媒介蚊であり、今後も捕集される場合は大阪府域でも従来の媒介蚊であるコガタアカ

イエカだけではなく、本種についても媒介蚊として注意が必要になると考えられる。

海外からの輸入感染症例は大阪府でも毎年報告されており²⁾、ウイルスの侵入が懸念される。もし国内に生息する蚊でウイルスが確認された場合、迅速な対応が求められる。府内における蚊の生息状況を把握することは、感染症未発生時における蚊の防除計画に役立つだけでなく、感染症発生時には蚊の駆除の資料となり、防除の対象となる地域を見極め、蔓延防止対策を講じるために重要と考えられる。緊急時に即時対応するためには、本調査で実施しているような衛生研究所と保健所と行政との連携が不可欠であり、本サーベイランスは危機管理対策の一つとして重要だと考えられる。

謝 辞

本調査は、大阪健康安全基盤研究所、大阪府健康医療部環境衛生課および各保健所の協力のもとに大阪府健康医療部保健医療室医療対策課の事業として実施されたものであり、調査に関与した多くの方々に深謝致します。また、データの提供にご協力頂いた東大阪市保健所、高槻市保健所、豊中市保健所、枚方市保健所の関係者の方々に深くお礼申し上げます。

利 益 相 反

開示すべき利益相反はない。

文 献

- 1) Kutsuna S, Kato Y, Moi ML, Kotaki A, Ota M, Shinohara K, Kobayashi T, Yamamoto K, Fujiya Y, Mawatari M, Sato T, Kunimatsu J, Takeshita N, Hyakawa K, Kanagawa S, Takasaki T, Ohmagari N. Autochthonous dengue fever, Tokyo, Japan, 2014. *Emerg Infect Dis* 2015; Mar 21(3): 517-520.
- 2) 国立感染症研究所. 感染症発生動向調査週報. <https://www.niid.go.jp/niid/ja/idwr.html>
- 3) 国立感染症研究所. ウエストナイル熱媒介蚊対策に関するガイドライン 2003 <https://www.niid.go.jp/niid/images/ent/PDF/ent>

- wnf.pdf
- 4) 国立感染症研究所. デング熱・チクングニア熱等蚊媒介感染症の対応・対策の手引き 地方公共団体向け 2015
<https://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-10900000-Kenkoukyoku/0000163947.pdf>
 - 5) 弓指孝博, 瀧幾子, 齋藤浩一, 伊藤房子, 石田誠良, 倉持隆, 大竹徹, 奥野良信. 大阪府におけるウエストナイル熱に関する蚊のサーベイランス調査 (平成 16 年度報告). 大阪府立公衆衛生研究所所報 2004; **42**: 57-63.
 - 6) 瀧幾子, 弓指孝博, 吉田永祥, 田中智之, 大竹徹, 奥野良信. 大阪府の住宅地域における蚊の分布調査. 大阪府立公衆衛生研究所所報 2004; **42**: 65-70.
 - 7) 青山幾子, 山元誠司, 山口敬治, 石川温子, 弓指孝博. 大阪府における蚊媒介性ウイルス感染症に対するサーベイランス調査 (2016 年度). 大阪健康安全基盤研究所研究年報 2017; **1**: 29-35.
 - 8) 大阪府健康福祉部. ウエストナイル熱対応指針 2004
 - 9) 青山幾子, 弓指孝博, 中田恵子, 佐藤功, 佐藤良江, 倉持隆, 上澤行成, 加瀬哲男, 高橋和郎. 大阪府におけるウエストナイルウイルスに対するサーベイランス調査 (2008 年度). 大阪府立公衆衛生研究所所報 2009; **47**: 1-7.
 - 10) 厚生労働省健康局結核感染症課長通知. ウエストナイル熱の流行予測のための死亡カラス情報の収集等について 2003.12.13
https://www.mhlw.go.jp/web/t_doc?dataId=00tb8583&dataType=1&pageNo=1
 - 11) 弓指孝博, 青山幾子. ウエストナイル熱 (脳炎). 大阪府立公衆衛生研究所感染症プロジェクト委員会編 感染症検査マニュアル第 III 集 2004; 1-13.
 - 12) ウエストナイル熱媒介蚊対策研究会. ウエストナイル熱媒介蚊対策ガイドライン. 日本環境衛生センター; 2003.
 - 13) Kuno G, Chang GJ, Tsuchiya KR, Karabatsos N, Cropp CB. Phylogeny of the Genus Flavivirus. *J. Virol* 1998; **72**(1): 73-83.
 - 14) 国立感染症研究所. ウエストナイルウイルス病原体検査マニュアル Ver.4.
<https://www0.niid.go.jp/niid/reference/WNV-manual.pdf>
 - 15) 国立感染症研究所. チクングニアウイルス検査マニュアル 2012. <http://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/CHIKV.pdf>
 - 16) 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. <https://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/Dengue2014.pdf>
 - 17) Hoshino K, Isawa H, Tsuda Y, Sawabe K, Kobayashi M. Isolation and characterization of a new insect flavivirus from *Aedes albopictus* and *Aedes flavopictus* mosquitoes in Japan. *Virology* 2009; **391**: 119-129.
 - 18) 気象庁. 過去の気象データ検索
<http://www.data.jma.go.jp/obd/stats/etrn/index.php>
 - 19) 厚生労働省医薬・生活衛生局生活衛生・食品安全部企画情報課検疫所業務管理室横浜検疫所港湾衛生評価分析官. 検疫所ベクターサーベイランスデータ報告書 2016 年
「WEB サイトの内容は 2018 年 6 月 6 日に確認した」

Mosquito-borne virus surveillance in Osaka Prefecture (Fiscal 2017 Report)

Ikuko AOYAMA^a, Sawa ONOUCHI^b, Keiji YAMAGUCHI^a and Takahiro YUMISASHI^a

In Osaka Prefecture, mosquito-borne arbovirus surveillances have been conducted since 2003 to monitor the invasion of imported infectious diseases caused by arboviruses such as West Nile virus (WNV) and dengue virus (DENV) together with domestic Japanese encephalitis virus (JEV). Monitoring of Chikungunya virus (CHIKV) and Zika virus (ZIKV) have also been added as mosquito-based surveillance since 2008 and 2015, respectively.

In 2017, we conducted RT-PCR examinations for arboviruses on a total of 4,502 female mosquitoes (8 species) collected at 27 points in Osaka Prefecture from June to October. All mosquitoes' examinations gave negative results for WNV, DENV, JEV, CHIKV, and ZIKV. In contrast, we isolated 22 insect flaviviruses (15 *Aedes Flavivirus*, 7 *Culex Flavivirus*) from 22 mosquito pools that replicated in C6/36 cells with mild cytopathic effects.

Key words : mosquito-borne infection, vector mosquitoes, surveillance, *Aedes Flavivirus*, *Culex Flavivirus*

a Osaka Institute of Public Health

b Faculty of Applied Biological Sciences, Gifu University

2017年に大阪市内の食中毒原因調査で検出された下痢原性微生物

中村寛海, 後藤 薫, 梅田 薫, 山本香織, 入谷展弘, 阿部仁一郎, 久保英幸, 改田 厚,
山元誠司, 馬場 孝, 平井有紀, 長谷 篤, 平山照雄, 秋吉充子, 山崎一夫, 小笠原準

2017年に食中毒、有症苦情などで当研究所に検体が搬入された80件(503検体)について下痢原性微生物の検出を行った。下痢原性微生物が検出された61件の内訳は、ノロウイルスが検出されたものが30件、カンピロバクター23件(うち、サルモネラと同時検出が2件、黄色ブドウ球菌と同時検出が1件)、サルモネラ3件、ウェルシュ菌3件、ナグビブリオ1件、セレウス菌が1件であった。全国的な傾向と同様、ノロウイルスとカンピロバクターの検出が多かった。

キーワード：食中毒、下痢原性微生物、食品媒介感染症、疫学

2017年の大阪市の食中毒事件数は32件、患者数354名であり、2016年の46件、494名から減少した。食中毒事件32件のうちカンピロバクターが21件(65.6%)、ノロウイルスが6件(18.8%)、ウェルシュ菌が2件(6.3%)、腸管出血性大腸菌O157、サルモネラ、セレウス菌が各1件ずつであった¹⁾。ノロウイルスの事件数が2016年は46件中30%を占める14件であったが、2017年は6件(約19%)と大きく減少したことが事件数および患者数の減少に繋がったと考えられる。カンピロバクターによる食中毒事件数は減少しているものの、食中毒事件における割合は増加しており、65%を超えている。2017年の食中毒統計によると、全国的にもカンピロバクターによる事件が最も多く、食中毒事件総数1,014件のうち320件(31.6%)を占めていた²⁾。

本調査は、大阪市内で食中毒が疑われ当研究所に検体が搬入された事件についてまとめ、その原因病原体と疫学情報を基に感染源を明らかにすることで、本市における食品衛生行政の向上に役立てることを目的としている。なお、赤痢菌、コレラ菌、パラチフスA菌、チフス菌および腸管出血性大腸菌の三類感染症患者検出状況については感染症発生動向調査事業報告書に別途まとめた。

材 料 と 方 法

1. 検体

食中毒疑い、または有症苦情で当研究所に搬入された以下の検体について検査を行った。すなわち、有症者便と吐物、食品残品、原因と考えられる施設(患者宅を含む)に保存されていた検食と同施設のふきとり水および、調理従事者の便と手指のふきとり水を調査の対象とした。

2. 下痢原性細菌の検出

対象菌種と使用した培地は、表1に示した。細菌は分離後、常法に従って生化学性状を確認し、菌種を同定した。また、血清型別を必要とする細菌については、各種の型別用免疫血清(デンカ生研)を用いて血清型別試験を行った³⁾。

3. 毒素産生性試験および病原遺伝子の検出

下痢原性細菌分離後、必要とされる場合には毒素産生性試験、病原遺伝子の検出を行った。毒素産生性試験は各種毒素産生用培地および市販の毒素検出用キット(デンカ生研)を用いて行い、病原遺伝子の検出は遺伝子増幅法(PCR法)により行った³⁾。

表1 検査対象とした菌種と菌分離に用いた培地

対象菌種	増菌培地	分離培地
<i>Aeromonas</i> spp. (エロモナス)	アルカリペプトン水	BBG ^{8)*1}
<i>Bacillus cereus</i> (セレウス菌)		NGKG
<i>Campylobacter jejuni/coli</i> (カンピロバクター)	プレストン培地	mCCDA
<i>Clostridium perfringens</i> (ウェルシュ菌)	GAM 半流動培地、 チオグリコール酸塩培地	カナマイシン加 CW, カナマイシン不含有 CW ^{*2}
Diarrheagenic <i>Escherichia coli</i> (下痢原性大腸菌)	mEC 培地	CT-SMAC, DHL クロモアガーECC ^{*2} , クロモアガーSTEC ^{*2} , クロモアガーO157 ^{*2}
<i>Salmonella</i> spp. (サルモネラ)	SBG (糞便等)、BPW (食品等)、 RV (食品等)	SS, DHL, MLCB
<i>Salmonella</i> Typhi (チフス菌)	マンニット加セレナイト	SS, DHL
<i>Salmonella</i> ParatyphiA (パラチフス A 菌)	マンニット加セレナイト	SS, DHL
<i>Shigella</i> spp. (赤痢菌)	BPW、シゲラブロス	SS, DHL
<i>Staphylococcus aureus</i> (黄色ブドウ球菌)	7.5%食塩加トリプトソイブロス	食塩卵寒天
<i>Vibrio cholerae</i> (コレラ菌)	アルカリペプトン水	TCBS, クロモアガービブリオ ^{*2}
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> (腸炎ビブリオ)	アルカリペプトン水 (食品等)、 ポリミキシンプイオン (糞便等)	TCBS

*1 文献 8)参照 (自家調製)、*2 必要に応じて追加

4. 感染性胃腸炎の原因となるウイルスの検出
ウイルス性食中毒が疑われた事件については、リアルタイム RT-PCR 法^{4,6)}を用いてノロウイルスまたはサポウイルスの検査を行った。

5. クドア・セプテンpunkタータの検出
厚生労働省の通知による、「ヒラメからの *Kudoa septempunctata* 検査法 (暫定)⁷⁾」にしたがって検査を行った。

結果 および 考察

1. 食中毒事例数の内訳

2017 年に食中毒、有症苦情などで当研究所に検体が搬入された事例は合計 80 件であった。検体数は、患者および調理人の便および吐物 343 検体、食品、ふき取りなどが 160 検体で、計 503 検体あった。80 件中 61 件 (76.3%) から下痢原性微生物が検出された (表 2)。

2. 検出病原体

下痢原性微生物が検出された 61 件の内訳は、ノロウイルスが検出されたものが 30 件、カンピ

ロバクター 23 件 (うち、サルモネラと同時検出が 2 件、黄色ブドウ球菌と同時検出が 1 件)、サルモネラ 3 件、ウェルシュ菌 3 件、ナグビブリオ 1 件、セレウス菌が 1 件であった。表 3 に示すように 2005 年以降、検出される下痢原性微生物としては、ノロウイルスおよびカンピロバクターが最も多くなっており、両者が占める割合が 2017 年は 61 件のうち 53 件 (86.9%)、2016 年は 81 件のうち 75 件 (92.6%)、2015 年は 91 件中 78 件 (85.7%) であり、下痢原性微生物が検出された事例のうち、両者で 8 割を超えている。大阪市で発生したノロウイルスによる食中毒事件数は 5 件と少なかったものの、近隣の他府県で発生した事例の関連調査での検出事例数が多かったことから、検出された下痢原性微生物としては最も多い 30 件となった。遺伝子群は Genogroup II (GII) が 26 件と主流であったが、Genogroup I (GI) のみ検出が 3 件、GI と GII の同時検出が 1 件あった。カンピロバクターは、*C. jejuni* によるものが 18 件、*C. jejuni* と *C. coli* によるものが 4 件、*C. coli* によるものが 1 件であった。*C. coli* が検出された 1 事例は患者 1 名から *Salmonella* Schwarzengrund も同時に検出された。

表2 検出された下痢原性微生物と食中毒の疑いで調査された事例の概要

事例番号 ¹⁾	食中番号 ²⁾	発生日	患者数	摂食者数	検出微生物	陽性数 / 被験患者数	原因施設 ³⁾	原因食品 ⁴⁾
1	2	1月16日	4	18	<i>Norovirus</i> (GII)	1/3	飲食店 大衆酒場	生ガキボネ酢(一品料理)
2	1	1月18日	9	12	<i>C.jejuni</i> / <i>coli</i>	8/9	飲食店 その他料理	地鶏ももタタキ(一品料理)
3		1月15日	4	11	<i>Norovirus</i> (GII)	1/1	(他府県)飲食店 居酒屋	生カキ、刺身(マグロ、ハマチ)、唐揚げ、水炊き
4		1月21日	8	11	<i>Norovirus</i> (GII)	4/7	飲食店 大衆酒場	お造り、サラダ、血うどん、鳥料理あり
5	3	1月24日	3	7	<i>Norovirus</i> (GII)	1/1	飲食店 寿司屋	不明(コース料理)
6		1月25日	3	7	<i>Norovirus</i> (GII)	2/3	飲食店 鳥料理屋	きゅうりの酢、地鶏酒蒸し、オムレツ、コロッケ、せせり湯引き等
7	4	1月26日	12	15	<i>Norovirus</i> (GII)	3/3	飲食店 大衆酒場	不明(一品料理)
8		1月30日	31	不明	<i>Norovirus</i> (GII)	3/3	(大阪府内)飲食店	懐石料理(法事)
9	5	2月2日	2	5	<i>C.jejuni</i>	2/2	飲食店 大衆酒場	鶏ももタタキ(一品料理)
10	6	2月3日	4	4	<i>Norovirus</i> (GII)	3/3	飲食店 大衆酒場	不明(コース料理及び一品料理)
11		2月5日	4	4	<i>Norovirus</i> (GII)	1/1	(大阪府内)飲食店	かす汁、お造り、焼き物、茶碗蒸し、椀物、カキの酢の物等
12		2月13日	8	11	<i>Norovirus</i> (GI)	4/5	飲食店 寿司店	寿司、てっちり、すっぽん鍋、すっぽん血、内臓生(玉ひも)
13		2月17日	24	39	<i>Norovirus</i> (GII)	4/6	飲食店、居酒屋	チーズフォンデュ、お造り、唐揚げ他
14		2月19日	2	2	<i>Norovirus</i> (GI)	1/1	飲食店 焼き鳥店	ざるとうふ、レバーバテ、とりわさ、サラダ、串焼き等
15		2月15日	6	不明	<i>Norovirus</i> (GII)	2/2	給食施設	シーフードカレー、グリーンサラダ、パインアップル、牛乳
16		2月18日	53	159	<i>Norovirus</i> (GII)	13/16	(大阪府内)弁当店	弁当(複数種)
17		2月21日	3	3	<i>C.jejuni</i>	1/1	飲食店 鳥料理店	鶏刺身盛り合わせ、串焼き盛り合わせ
18	8	2月20日	18	32	<i>C.jejuni/coli</i>	8/16	飲食店 焼鳥屋	不明(子供用コース料理)
19		2月28日	不明	不明	<i>Norovirus</i> (GII)	0/0	焼き海苔刻み加工場	刻み海苔
22		3月10日	13	不明	<i>Norovirus</i> (GII)	1/1	飲食店 焼き鳥屋	鶏炭火焼、鶏たたき、チキン南蛮、肉巻おにぎり、馬刺し、フライドポテト、その他
23		3月13日	44	不明	<i>Norovirus</i> (GII)	3/3	(大阪府内)飲食店	フライドポテト、枝豆、エビマヨ、カルパッチョ、サラダ等
24		3月15日	26	不明	<i>C.coli</i> & <i>S. Schwarzengrund</i>	1/2	飲食店	3/14に提供された食事
25		3月18日	104	242	<i>Norovirus</i> (GII)	4/5	スキーツアー旅行(バス&宿泊施設)	不明
26		3月28日	7	不明	<i>Norovirus</i> (GII)	6/7	飲食店(弁当屋)	弁当
27	9	3月30日	26	42	<i>Norovirus</i> (GII)	4/10	飲食店 大衆酒場	不明(コース料理)
28		3月28日	5	14	<i>C.jejuni</i>	1/1	飲食店 居酒屋	不明
29		3月28日	14	不明	<i>Norovirus</i> (GII)	2/2	宿泊施設	不明
30		4月4日	18	44	<i>Norovirus</i> (GI/GII)	5/12	飲食店 寿司店調製出前弁当	寿司
31		4月1日	3	不明	<i>C.jejuni</i>	2/2	飲食店 居酒屋	卵かけごはん、鶏むね肉の刺身、ささみの刺身、唐揚げ、鶏の燻製等

- 1) 検体搬入時に付けられた番号。 2) 食中毒と判断され厚生労働省に届出された事件につけられた番号。太字で示す。
 3) 食中毒と判断されなかった事例は推定原因施設を示す。 4) 食中毒と判断されなかった事例は推定原因食品を示す。
 5) 患者の平均体温(未確認は+)。 6) 陽性数/被験調理者数あるいは陽性数/被験食品数

表2 続き

事例番号 ¹⁾	食中毒番号 ²⁾	潜伏時間	下痢	腹痛	発熱 ⁵⁾	嘔気	嘔吐	その他	備考(調理等従事者検便等) ⁶⁾
1	2	32.5-37hr	○	○	37	○	○	悪寒、倦怠感、頭痛	調理人Norovirus:0/1
2	1	44-87hr	○	○	38.8	○		悪寒、倦怠感、頭痛、しぶり腹	患者C.jejuni検出 8/9, C.jejuni/coli検出 1/9
3		36hr	○		39			頭痛	
4		14hr-41hr (Ave.31.5hr)	○	○	38	○	○	悪寒、倦怠感、頭痛	調理人Norovirus:0/5
5	3	25.5-33.5hr	○		37.2(1名のみ)	○	○	悪寒、倦怠感	調理人Norovirus (GII) 検出:1/3
6		18 - 33hr (Ave.25hr)	○	○	38-38.5(嘔吐者以外)	○	△	悪寒、関節痛	調理人Salmonella Schwarzengrund(4:d:1,7)検出:1/2
7	4	23 - 41hr	○	○	38.2	○	○	悪寒、倦怠感、頭痛、しぶり腹、痙攣	調理人Norovirus (GII) 検出:4/4
8			○	○			○		
9	5	65 - 72hr	○	○	○	○		悪寒、頭痛、倦怠感、しぶり腹	
10	6	30-38.5hr	○	○	38-39.5	○	○	頭痛、悪寒、倦怠感	調理人Norovirus (GII) 検出:1/2
11		17.5-40hr	○	○	37, 37.6	○	○	悪寒、頭痛	
12		20 - 62hr (Ave.44.3hr)	○	○	38	○	○	頭痛、悪寒、倦怠感	他都市患者よりNorovirus (GI) 検出 調理人Norovirus:0/4 施設内のふきとり水から黄色ブドウ球菌検出:1/5
13		16-60hr	○	○	37-40	○	○	頭痛、悪寒、倦怠感	調理人Norovirus:0/5
14		35 - 39hr	○	○	37-39	○	○	悪寒、倦怠感、頭痛	他都市患者よりNorovirus (GI) 検出 調理人Norovirus:0/4
15									他都市患者よりNorovirus (GII) 検出 感染症の可能性
16		24-48hr	○	○	37.5	○	○		
17		72hr	○	○	38				
18	8	24-109hr	○	○	38-39				患者C.jejuni検出 7/8, C.jejuni/coli検出 1/8
19									広域食中毒事例 作業場等ふきとり水からNorovirus (GII) 検出:8/25 約1ヶ月後作業場ふきとり水再検査Norovirus検出:0/16 食品(刻み海苔)からNorovirus (GII) 検出:3/10
22		4-38hr	○	○	37	○	○	悪寒、倦怠感、頭痛	
23			○		>38		○		
24		不明	○	○	○				患者1名からC. coliとS. Schwarzengrund(4:d:1,7)検出
25		不明	○	○	○		○	悪寒、臥床	
26		23 or 36hr	○	○	37-38	○	○	悪寒、頭痛、倦怠感、しぶり腹	調理人Norovirus:0/2
27	9	12 - 61hr	○	○	38	○	○	倦怠感、頭痛、関節痛	神戸市でNorovirus (GII)検出
28		不明	○	○	38.9	○	○	頭痛、悪寒、倦怠感	東大阪市事例
29		不明	○	○	○		○		和歌山県事例
30		10-70hr	○		○		○		患者Norovirus (GI)検出:4/12、Norovirus (GII)検出:1/12 調理人Norovirus:0/2
31		54-84 hr	○	○	37			倦怠感	藤井寺市事例

- 1) 検体搬入時に付けられた番号。 2) 食中毒と判断され厚生労働省に届出された事件につけられた番号。太字で示す。
 3) 食中毒と判断されなかった事例は推定原因施設を示す。 4) 食中毒と判断されなかった事例は推定原因食品を示す。
 5) 患者の平均体温。 6) 陽性数/被験調理者数あるいは陽性数/被験食品数

表2 検出された下痢原性微生物と食中毒の疑いで調査された事例の概要（続き）

事例番号 ¹⁾	食中毒番号 ²⁾	発生日	患者数	摂食者数	検出微生物	陽性数 ／ 被験患者数	原因施設 ³⁾	原因食品 ⁴⁾
32		4月7日	2	2	<i>Salmonella</i> Blockley	1/2	飲食店 居酒屋	鶏生肝刺身、サザエ造り、焼き鳥等
33		4月28日	16	不明	<i>Norovirus</i> (GII)	5/5	高齢者施設内給食施設	4月26日昼に提供された食事
34	13	5月5日	88	101	<i>C.perfringens</i> (cpe遺伝子保有)	2/2	飲食店 レストラン	牛もも肉のロースト(ビュッフェ料理)
35	15	5月8日	4	7	<i>C.jejuni</i>	1/3	飲食店 焼鳥屋	鶏肉の刺身盛り(ムネ、ズリ、ココロ)、 鶏生肝刺身(コース料理)
41	16	6月3日	5	6	<i>C.jejuni</i>	2/5	飲食店 焼鳥屋	モモ炙り焼き、ソリレス炙り、ソリレス刺身、 串焼き(肝)、鶏ユッケ(一品料理)
42		6月3日	21	37	<i>Norovirus</i> (GII)	3/4	飲食店	6月2日に原因施設で提供された食事
43		6月3日	2	18	<i>Norovirus</i> (GII)	2/2	飲食店	不明
44	18	6月14日	11	16	<i>C.jejuni</i>	1/1	飲食店 大衆酒場	鶏の胸肉のカルパッチョ(コース料理)
46	17	6月13日	4	14	<i>C.jejuni</i>	0/0	飲食店 大衆酒場	鶏のタタキ、ささみユッケ、胸の炙り (一品料理)
47		6月18日	15	17	<i>Norovirus</i> (GII)	1/2	飲食店 寿司屋	6月17日に当該施設において調製された食事
49		不明	不明	不明	<i>C.jejuni</i>	2/2	飲食店 焼鳥屋	不明(一品料理)
50		6月14日	3	6	<i>C.jejuni</i>	2/3	飲食店 大衆酒場	不明(一品料理)
51		8月9日	14	23	<i>Salmonella</i> Enteritidis	1/1	飲食店 海鮮料理店	8月8日に当該施設で提供された食事
52		8月13日	22	不明	<i>Vibrio cholerae</i> non-O1 (ナグビリオ)	1/1	飲食店 レストラン	8月13日に当該施設で提供された食事
55		8月21日	104	358	<i>C.jejuni</i>	5/8	宿泊施設	不明
56	21	8月29日	5	5	<i>Salmonella</i> Enteritidis	3/3	飲食店 レストラン	不明(一品料理)
58		8月27日	12	39	<i>C.perfringens</i> (cpe遺伝子保有せず)	1/1	飲食店	刺身(カンパチ等)、まぐろのタルタル、サラダ、 牛肉のカルパッチョ等
59	23	8月31日	5	5	<i>B.cereus</i> (GRS遺伝子陽性)	2/3	飲食店 主として喫茶	不明(日替定食)
60		8月24日	5	29	<i>C.jejuni</i>	4/5	学生実習	バーベキュー
61	22	8月28日	5	16	<i>C.jejuni</i>	1/1	飲食店 大衆酒場	鶏もも肉のたたき(コース料理)
62		9月1日	2	2	<i>Norovirus</i> (GI)	1/2	飲食店 主として喫茶	かき氷
63	24	9月2日	7	16	<i>C.jejuni</i>	2/6	飲食店 大衆酒場	鶏の生肝、焼鶏三品盛り合わせ(モモ、ココロ、 ズリ)(コース料理)
65		9月26日	3	4	<i>C.jejuni</i> / <i>Salmonella</i> Infantis	3/3	飲食店 居酒屋	トリ刺身(レバー、ささみ、ココロ)
66		10月1日	5	5	<i>S.aureus</i> / <i>C.jejuni</i> /coli	1/1	飲食店 焼鳥屋	一品料理
69	26	10月25日	6	10	<i>C.jejuni</i> / coli	5/5	共同生活施設	不明
70		11月30日	9	9	<i>Norovirus</i> (GII)	3/3	菓子製造業、飲食店(イタリアン)	不明
72	28	11月26日	3	3	<i>C.jejuni</i>	1/2	飲食店 焼鳥屋	鶏の生ハム、スモークチキンのサラダ (コース料理)
73		12月1日	3	3	<i>C.jejuni</i>	1/2	飲食店 焼鳥屋	鳥のタタキ、鶏ユッケ、焼き鳥等
74	29	12月3日	4	9	<i>C.jejuni</i>	2/3	飲食店 焼鳥屋	一品料理
75	30	12月10日	88	137	<i>C.perfringens</i>	0/0	飲食店 焼肉屋	ハラミステーキ、鶏肉の塩焼(仕出弁当)
78		12月17日	69	283	<i>Norovirus</i> (GII)	1/1	飲食店営業	12月16日の昼から18日の夜にかけて当該施設が 提供した食事
80	32	12月28日	32	131	<i>Norovirus</i> (GII)	4/4	飲食店営業 給食委託	不明

- 1) 検体搬入時に付けられた番号。 2) 食中毒と判断され厚生労働省に届出された事件につけられた番号。太字で示す。
 3) 食中毒と判断されなかった事例は推定原因施設を示す。 4) 食中毒と判断されなかった事例は推定原因食品を示す。
 5) 患者の平均体温。 6) 陽性数／被験調理者数あるいは陽性数／被験食品数

表2 続き

事例番号 ¹⁾	食中毒番号 ²⁾	潜伏時間	下痢	腹痛	発熱 ⁵⁾	嘔気	嘔吐	その他	備考(調理等従事者検便等) ⁶⁾
32		35hr	○	○	○				<i>Salmonella</i> Blockley (6,8:k:1,5)
33		42-210hr	○	○	○	○	○	倦怠感、悪寒、頭痛	
34	13	5.5-29 hr	○	○	○	○		倦怠感、しぶり腹	検食 <i>Clostridium perfringens</i> :0/9
35	15	49-64hr	○	○	40			倦怠感、悪寒、頭痛	
41	16	37-123hr (Ave 75hr)	○	○	38	○		倦怠感、悪寒、頭痛、しぶり腹	
43		不明	○	○	38	○	○	悪寒、倦怠感	広島県事例
44	18	54.5-97hr	○	○	38.3-38.8	○		倦怠感、悪寒、しぶり腹	
46	17	58-84hr	○	○	○	○	○	倦怠感、悪寒、頭痛	
47		不明	○	○	37	○	○	倦怠感、悪寒、頭痛、しぶり腹	東大阪市事例
49		不明							藤井寺市事例
50		52-95.5hr	○	○	○	○	○	倦怠感	
51		不明	○	○	39.7	○			
52		不明	○	○	○				神戸市事例:サルモネラO4群、腸炎ビブリオ検出 <i>Vibrio cholerae</i> non-O1:CT遺伝子陰性
55		不明	○	○	○	○			岐阜県事例
56	21	16.5-28.5hr	○	○	○	○	○	倦怠感、悪寒、頭痛、しぶり腹	調理人 <i>S. Enteritidis</i> :0/3 ふきとり水 <i>S. Enteritidis</i> :0/10
58		6.5-32.5hr	○	○		○			神戸市事例
59	23	1hr	○	○	○	○	○	倦怠感、悪寒	調理人 <i>B.cereus</i> (GRS遺伝子陽性):1/1 ふきとり水 <i>B.cereus</i> (GRS遺伝子陽性):10/10
60		不明	○	○					鶏のとさつ解体体験実習
61	22	46-97hr	○	○	○	○		倦怠感、悪寒、頭痛、しぶり腹	
62		36 - 41hr	○	○	38(1名のみ)	○	○	倦怠感、頭痛	調理人 <i>Norovirus</i> :0/1
63	24	51-108 hr	○	○	○	○	○	倦怠感、悪寒、頭痛、しぶり腹	
65		47 - 64 hr	○	○	38-38.4			倦怠感 頭痛、関節痛	患者: <i>C.jejuni</i> :3/3、 <i>S. Infantis</i> (7r:1,5):1/3
66		37 - 63hr	○	○	38.5				<i>S.aureus</i> :エンテロトキシン非産生
69	26	不明	○	○	37.6-39.1	○		倦怠感、悪寒、頭痛、しぶり腹	患者: <i>C.coli</i> (3/5)、 <i>C.jejuni/coli</i> (1/5)、 <i>C.jejun</i> (1/5) ふきとり水(0/13)からカンピロバクター検出せず ふきとり水: <i>B.cereus</i> :3/13、 <i>S.aureus</i> 3/13
70		34hr (6hr)	○		○	○			枚方市事例
72	28	37-60hr	○	○	○			倦怠感、悪寒、頭痛	
73		62 - 66.5 hr	○	○	○				
74	29	44 - 68 hr	○	○	○	○	○	倦怠感、悪寒、頭痛、しぶり腹、関節痛	
75	30	3.5 - 22 hr	○	○	○	○		倦怠感、悪寒、しぶり腹	ふきとり水(0/10)、食品(0/7)から ウェルシュ菌検出せず
78		不明	○		○	○	○		宇都宮市事例
80	32	26-50 hr	○	○	○	○	○	倦怠感、悪寒、しぶり腹	調理人 <i>Norovirus</i> (GII) 検出:1/6

- 1) 検体搬入時に付けられた番号。 2) 食中毒と判断され厚生労働省に届出された事件につけられた番号。太字で示す。
 3) 食中毒と判断されなかった事例は推定原因施設を示す。 4) 食中毒と判断されなかった事例は推定原因食品を示す。
 5) 患者の平均体温。 6) 陽性数/被験調理者数あるいは陽性数/被験食品数

表3 搬入検体から分離された下痢原性微生物数の過去20年間の年次推移*1

下痢原性微生物	発生年																			
	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017
サルモネラ	27	41 ^{*2}	15	10	11 ^{*2}	19 ^{*2}	10	7 ^{*2}	7	11	9	6	4	3	5	4	2 ^{*2}	0	3 ^{*2}	5 ^{*2}
内 S. Enteritidis	18	15	15	7	8	10	7	5	5	9	7	4	3	1	3	1	1	0	2	2
腸炎ビブリオ	19	24	3	8	8	2	3	1	3	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
内 K6	7	14 ^{*2}	1	5	5 ^{*2}	1	3	1	1	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
ノロウイルス	19	10	14	29	25	42 ^{*2}	47	51	94	29	38	41 ^{*2}	47	38	47	34 ^{*2}	28 ^{*2}	44	39 ^{*2}	30
カンピロバクター	6	2	3	7	10 ^{*2}	14 ^{*2}	7	10 ^{*2}	12	19	20	10 ^{*2}	14	20 ^{*2}	8 ^{*2}	11 ^{*2}	27 ^{*2}	32 ^{*2}	36 ^{*2}	23 ^{*2}
黄色ブドウ球菌	0	2	2	0	3 ^{*2}	4 ^{*2}	2 ^{*2}	2	1	4	4	3	2 ^{*2}	2	3 ^{*2}	10 ^{*2}	8 ^{*2}	7 ^{*2}	2 ^{*2}	1 ^{*2}
クドア	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1 ^{*2}	2	4 ^{*2}	7 ^{*2}	3 ^{*2}	0	0
下痢原性大腸菌	0	0	2	1	0	0	0	1 ^{*2}	1 ^{*2}	0	0	2 ^{*2}	3 ^{*2}	1 ^{*2}	2 ^{*2}	2 ^{*2}	2 ^{*2}	3	2	0
ウェルシュ菌	1	1	2	1	4	1	1	4	0	1	2	1	3 ^{*2}	1	0	3 ^{*2}	1	2	1	3
セレウス菌	1	0	0	0	3 ^{*2}	1 ^{*2}	2 ^{*2}	1	3	0	1	0	0	1	1	2 ^{*2}	0	0	0	1
エロモナス	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
サボウイルス	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	1	2	0	0	0	0
ナグビブリオ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1

—：実施せず

*1：感染症としての腸管出血性大腸菌は除く。

*2：件数は同時検出事例を含む。

全国的な傾向と同様、カンピロバクターとノロウイルスの事件が多く、これらの食中毒対策が望まれる。

グループの皆さま、大阪市保健所食品衛生監視員の方々、大阪市保健所感染症対策課の方々および検査実施に甚大なるご協力をいただきました微生物課・瀧野薫氏に深謝致します。

結 論

2017年に食中毒、有症苦情などで当研究所に検体が搬入された80件(503検体)について下痢原性微生物の検出を行った。下痢原性微生物が検出された61件の内訳は、ノロウイルスが検出されたものが30件、カンピロバクター23件(うち、サルモネラと同時検出が2件、黄色ブドウ球菌と同時検出が1件)、サルモネラ3件、ウェルシュ菌3件、ナグビブリオ1件、セレウス菌が1件であった。

謝 辞

本調査にあたり疫学情報の収集にご協力いただきました大阪市健康局生活衛生課食品衛生

利 益 相 反

開示すべき利益相反は無い。

文 献

- 1) 大阪市健康局. 平成29年大阪市食品衛生監視指導計画の実施結果概要.
<http://www.city.osaka.lg.jp/kenko/page/0000439567.html>
- 2) 厚生労働省. 食中毒統計資料. 平成29年食中毒発生状況.
https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/shokuhin/syokuchu/04.html
- 3) 中村寛海, 勢戸祥介, 長谷篤, 西川禎一, 北瀬照代, 他. 1998年に大阪市内の食中毒原因調査において明らかにされた下痢原性微生物.

- 大阪市立環境科学研究所報告 調査・研究年報 1999; **61**: 51-57.
- 4) Kageyama, T, Kojima S, Shinohara M, Uchida K, Fukushi S, Hoshino FB, et al. Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol* 2003; **41**: 1548-1557.
- 5) 入谷展弘, 勢戸祥介, 春木孝祐, 西尾治, 久保英幸, 村上 司, 他. リアルタイム PCR 法を用いた Norwalk virus 検出法の評価. 大阪市立環境科学研究所報告 調査・研究年報 2002; **64**: 6-10.
- 6) Oka T, Katayama K, Hansman HS, Kageyama T, Ogawa S, Wu FT, et al. Detection of human Sapovirus by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. *J Med Virol* 2006; **78**: 1347-1353.
- 7) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長通知. 食安監発 0711 第 1 号. *Kudoa septempunctata* の検査法について (暫定版). 2011
- 8) Nishikawa Y, Kishi T. A modification of bile salts brilliant green agar for isolation of motile *Aeromonas* from foods and environmental specimens. *Epidemiol Infect* 1987 ; **98** : 331-336.
- WEB サイトの内容は 2018 年 8 月 2 日に確認した

Enteric pathogens detected during investigation of food poisoning outbreaks in Osaka City in 2017

Hiromi NAKAMURA, Kaoru GOTO, Kaoru UMEDA, Kaori YAMAMOTO, Nobuhiro IRITANI, Niichiro ABE, Hideyuki KUBO, Atsushi KAIDA, Seiji P YAMAMOTO, Takashi BABA, Yuki HIRAI, Atsushi HASE, Teruo HIRAYAMA, Atsuko AKIYOSHI, Kazuo YAMAZAKI and Jun OGASAWARA

A total of 80 incidents of suspected food-borne infectious diseases or food-hygienic problems were investigated in Osaka city in 2017. Enteropathogenic microorganisms were detected as causative agents in 61 incidents (76.3%), *Norovirus* in 30 incidents, *Campylobacter jejuni / coli* in 23 incidents (detected with *Salmonella* spp. in 2 cases or *Stapylococcus aureus* in 1 case), *Salmonella* spp. in 3 incidents, *Clostridium perfringens* in 3 incidents, and *Bacillus cereus* and *Vibrio cholerae* non-O1 in 1 incident. In recent years, *Norovirus* and *Campylobacter jejuni / coli* were detected as major enteropathogenic microorganisms.

Key words : food poisoning, enteric pathogens, foodborne infection, epidemiology

畜水産物中の動物用医薬品の一斉分析法の妥当性評価

山口瑞香^a, 吉田優子^b, 永吉晴奈^a, 柿本健作^a, 白川育子^a, 北川陽子^a, 梶村計志^a

食肉、魚介類、牛乳および鶏卵中に残留する動物用医薬品の一斉分析法の妥当性評価を行なった。試料からの抽出にはぎ酸含有アセトニトリルを用い、脱脂にはアセトニトリル/ヘキサン分配、精製にはアミノプロピルの固相抽出遠心カラムを用いた。測定には液体クロマトグラフ-タンデム質量分析計を使用した。50成分の動物用医薬品を用いて添加回収試験を実施した結果、一部を除き、妥当性評価ガイドラインの目標値を満たした。

キーワード：畜水産物、動物用医薬品、液体クロマトグラフ-タンデム質量分析計、妥当性評価

当所では以前より食肉、魚介類、牛乳および鶏卵中の動物用医薬品の分析を行っており、サルファ剤、キノロン系抗菌剤、葉酸拮抗剤および駆虫薬を対象とした一斉分析法を用いてきた。この方法を改良し、抽出液にぎ酸含有アセトニトリルを用い、アミノプロピル基を結合した固相抽出遠心カラムを用いた精製方法について検討した。この方法を用いて50成分の動物用医薬品の妥当性評価を行なったので報告する。

実 験 方 法

1. 試料および試薬等

(1) 試料：市販の鶏卵、牛乳、鶏肉、牛肉、豚肉、サケ、エビおよびブリを用いた。

(2) 標準品：混合標準溶液は、富士フィルム和光純薬(株)製動物用医薬品混合標準液サルファ剤+葉酸拮抗剤、キノロン剤およびマクロライドを用いた。

駆虫薬の Albendazole sulfone、Oxibendazole、Thiabendazole、5-OH Thiabendazole、Praziquantel、Flubendazole、Levamisole は富士フィルム和光純薬(株)製、2-Amino flubendazole は Sigma-Aldrich 社製、Parbendazole は USP 製を用いた。

安定同位体で標識された Norfloxacin および

Sarafloxacin は Sigma-Aldrich 社製、Ciprofloxacin は林純薬工業(株)製を使用した。

(3) 試薬等：アミノプロピル基を結合した固相抽出遠心カラムは GL Science 社製 MonoSpin L NH₂、メンブランフィルターはアドバンテック東洋(株)製 DISMIC(親水性 PTFE, 13 mmφ, 0.2 μm)、残留農薬試験用ヘキサン、無水硫酸ナトリウム、LC/MS 用アセトニトリル、メタノール、高速液体クロマトグラフ用ぎ酸および生化学用ジメチルスルホキシドは富士フィルム和光純薬(株)製を使用した。水は Merckmillipore 社製 MQ-Advantage A10 により精製して用いた。

2. 装置および測定条件

(1) 装置：高速ホモジナイザーはポリトロン PT3100 (KINEMATICA 社製)、遠心分離器は himac CF7D2 (日立工機(株)製)、高速振とう機は CM-1000(東京理化工械(株)製)、遠心エバポレーターは CVE-3100 (東京理化工械(株)製)、LC-MS/MS は AQUITY UPLC I-Class-Xevo TQ-S (Waters 社製)を使用した。

(2) LC-MS/MS 測定条件

分析カラム：Waters CORTECS UPLC C18(100×2.1 mm i.d., 1.6 μm)、カラム温度：50℃、流速：0.2 mL/min、注入量：2 μL、移動相：A 液；0.1% ぎ

a 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部食品化学1課

b 大阪府茨木保健所検査課

酸水溶液、B液；0.1%ギ酸メタノール、グラジエント条件: B%；10%(0-5min), 10-74%(5-17min), 95%(7.1-22min)、イオン化モード: ESI(+), 測定モード: コーンガス(窒素)流量: 150L/h、脱溶媒ガス(窒素)温度および流量: 400℃および 1000 L/h。物質ごとの条件は表 1 に示した。

3. 試験溶液の調製

(1) 抽出: 筋肉試料は細切均一化し、鶏卵は複数個を割り均一化した。牛乳はそのまま試験に供した。試料 2 g を 50 mL 遠沈管に計り採り、1%ギ酸含有ヘキサン飽和アセトニトリル 15 mL および無水硫酸ナトリウム 5 g を加え、高速ホモジナイザーで混合粉碎した。3,000rpm で 5 分間遠心分離した後、上清を新しい 50 mL 遠沈管に分取した。残渣に 1%ギ酸含有ヘキサン飽和アセトニトリル 15 mL を加えて高速振とう器で 5 分間振とうし、同様に遠心分離後、上清を合わせ、1%ギ酸含有ヘキサン飽和アセトニトリルで 30 mL に定容した。ここにヘキサン 10 mL を加えて高速振とう器で約 5 分間振とう後、3,000 rpm で 5 分間遠心分離して下層を抽出液とした。

(2) 精製: 15 mL 遠沈管に MonoSpin L NH₂ を付け、抽出液 750 μL を負荷して 3,000 rpm で約 5 分間遠心分離した。ここに 1%ギ酸含有ヘキサン飽和アセトニトリル 200 μL を加え、同様に遠心分離した。MonoSpin L NH₂ を外してジメチルスルホキシド 25 μL を加え、遠心エバポレーターで濃縮した。濃縮液に 10%メタノールを加えて 0.5 mL とし、メンブランフィルターでろ過したものを試験溶液とした。

4. 検量線の作成

マトリックス入り標準溶液は各試料の種類に応じて調製した。添加試料と同様に抽出および精製を行なったブランク溶液に標準溶液を添加し、0.5~20 ng/mL となるように調製した。

結果 および 考察

1. 試験法の検討

標準品として、費用の抑制や濃度の正確性確保のため市販の混合標準溶液を使用することとした。使用した混合標準溶液の中で上記の測定条件で保持できなかった物質および感度不足で

あった物質は対象外とした。また、内部標準物質の安定同位体は感度が良好でその他の物質の補正も行えた Sarafloxacin を使用した。従来は、抽出をヘキサン飽和アセトニトリル 8 mL および 2%ギ酸含有ヘキサン飽和アセトニトリル 8 mL で行なっていたが、抽出液量が少なかったため液量を増やし、無水硫酸ナトリウムを加えて脱水して作業効率を向上させた。

これまでの方法では Levamisole の直前に大きな妨害ピークが見られた。そこで、MonoSpin L NH₂ による精製を検討した。通過液量が 1 mL までであれば妨害ピークを除去することができた(図 1)。そこで抽出液を 750 μL 負荷し、1%ギ酸含有ヘキサン飽和アセトニトリル 200 μL で溶出することにより、妨害ピークを除去でき、良好な回収率の前処理法を構築することができた。

2. 妥当性評価結果

鶏卵、牛乳、鶏肉およびサケについて妥当性評価試験(分析者 5 名、2 併行×1 日間)を行なった。牛肉、豚肉、エビおよびブリについては併行精度評価(5 併行)のみを行なった。各試料に 0.01、0.1 μg/g となるよう標準溶液を添加した。添加濃度及び妥当性評価試験結果を表 2 に示した。鶏肉の Tylosin 以外は、真度が 70 %~120 % 以内であり、併行精度および室内精度は「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」¹⁾の目標値を満たしていた。

ま と め

LC-MS/MS を使用した畜水産物中の動物用医薬品一斉分析法を確立した。添加回収試験の結果は、妥当性評価ガイドラインを満たすものであり日常の検査に利用できると考えられた。

利 益 相 反

開示すべき利益相反はない。

文 献 等

1) 平成 22 年厚生労働省食安発 1224 第 1 号

表1 各物質ごとの条件

Compound	Precursor ion (m/z)	Product ion1 (m/z)	Product ion2 (m/z)	Retention time (min)	Compound	Precursor ion (m/z)	Product ion1 (m/z)	Product ion2 (m/z)	Retention time (min)
Enrofloxacin	360	316	245	9.0	Sulfaethoxypyridazine	295	156	92	10.4
Ciprofloxacin	332	231	314	8.6	Sulfaquinoxaline	301	156	92	11.5
Oxfloxacin	362	318	261	8.1	Sulfachlorpyridazine	285	156	92	8.4
Orbifloxacin	396	295	352	9.4	Sulfadiazine	251	156	92	2.8
Sarafloxacin	386	342	299	9.6	Sulfadimidine	279	186	92	7.8
Difloxacin	400	356	299	9.4	Sulfadimethoxine	311	156	92	11.2
Danofloxacin	358	340	314	9.0	Sulfacetamide	215	156	92	2.1
Norfloxacin	320	233	276	8.2	Sulfathiazole	256	156	92	3.3
Marbofloxacin	363	72	320	7.2	Sulfadoxine	311	156	92	9.6
Oxolinic acid	262	244	216	11.5	Sulfatrazole	268	156	92	9.0
Nalidixic acid	233	215	187	13.2	Sulfapyridine	250	156	92	4.0
Flumequine	262	202	244	13.5	Sulfabromomethazine	357	92	156	13.4
Piromidic acid	289	271	243	15.0	Sulfabenzamide	277	156	92	9.9
					Sulfamethoxazole	254	156	92	8.7
Kitasamycin	772	109	174	14.6	Sulfamethoxy-pyridazine	281	92	156	8.0
Tylosin	917	174	101	14.6	Sulfamerazine	265	92	156	4.8
Tiamulin	494	192	119	13.9	Sulfamonomethoxine	281	92	156	8.8
					Sulfisozole	240	156	92	4.7
Albendazole metabolite	240	133	198	4.7	Sulfisomidine	279	124	186	2.9
Oxibendazole	250	218	176	12.2	Sulfamethoxydiazine	281	92	156	6.9
Thiabendazole	202	175	131	7.2	Sulfisoxazole	268	156	92	9.4
5-OH-Thiabendazole	218	147	191	5.0					
Praziquantel	313	203	83	16.3	Ormetoprim	275	123	259	8.5
Parbendazole	248	216	145	14.5	Diaveridine	261	245	123	5.7
Flubendazole	314	123	282	14.6	Trimethoprim	291	230	123	7.4
2-Amino flubendazole	256	123	95	11.3	Pyrimethamine	249	177	233	11.3
Levamisole	205	178	91	3.7					
					Sarafloxacin-d8	394	350	303	9.6

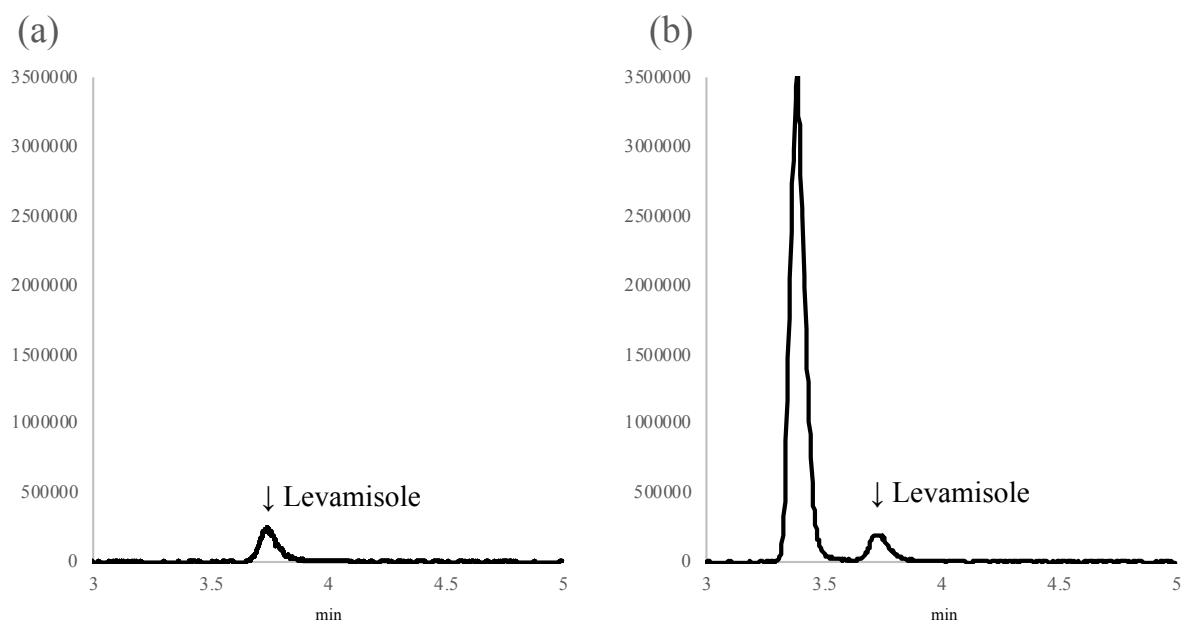


図1 鶏卵中の Levamisole (2 ng/mL) の Mono Spin L NH₂ による精製効果
 (a) Mono Spin L NH₂ 使用 (b) Mono Spin L NH₂ 不使用

表2 妥当性評価結果

Compound	hen egg						bovine milk					
	Spiked level: 0.01 µg/g			Spiked level: 0.1 µg/g			Spiked level: 0.01 µg/g			Spiked level: 0.1 µg/g		
	rec	repeat	Inter.Pre	rec	repeat	Inter.Pre	rec	repeat	Inter.Pre	rec	repeat	Inter.Pre
Enrofloxacin	98	4	5	97	5	5	104	4	4	99	3	3
Ciprofloxacin	80	4	5	79	7	7	82	3	5	88	2	4
Ofloxacin	95	8	9	95	7	7	102	2	3	97	4	5
Orbifloxacin	101	6	6	97	5	5	102	4	4	103	3	3
Sarafloxacin	85	6	6	85	6	6	84	3	5	90	2	3
Difloxacin	97	6	6	97	5	5	102	4	4	100	3	3
Danofloxacin	97	3	4	94	5	5	103	3	4	100	3	3
Norfloxacin	78	9	9	79	6	6	81	7	10	89	2	5
Marbofloxacin	102	4	7	100	6	6	103	4	5	106	2	2
Oxolinic acid	97	6	6	97	5	5	103	4	7	99	4	4
Nalidixic acid	97	3	4	93	6	6	99	4	5	100	4	4
Flumequine	97	6	6	95	7	7	98	2	4	100	3	3
Piromidic acid	97	6	6	96	7	7	98	4	4	99	2	3
Sulfaethoxypyridazine	92	5	6	87	2	3	96	3	3	92	4	5
Sulfaquinoxalinesodium	98	4	5	91	4	4	96	4	4	94	3	3
Sulfachlorpyridazine	93	9	9	89	3	3	97	7	7	95	3	4
Sulfadiazine	93	4	4	90	5	5	100	4	6	96	3	5
Sulfadimidine	95	6	6	88	2	2	96	4	4	94	4	5
Sulfadimethoxine	97	6	6	91	4	4	100	5	5	95	3	4
Sulfacetamide	98	5	7	93	5	5	104	4	6	98	6	8
Sulfathiazole	88	4	4	85	5	5	93	5	5	90	3	5
Sulfadoxine	95	4	4	92	3	4	99	3	7	94	2	3
Sulfatroxazole	98	8	8	91	5	5	100	6	10	96	5	6
Sulfapyridine	92	3	4	89	4	4	96	3	4	93	3	6
Sulfabromomethazine	97	5	5	93	2	2	100	5	5	94	4	4
Sulfabenzamide	97	7	8	93	5	5	99	7	7	94	4	5
Sulfamethoxazole	95	6	8	90	3	3	97	5	6	95	3	4
Sulfamethoxyipyridazine	89	7	7	88	5	5	98	9	9	93	3	6
Sulfamerazine	95	4	5	91	4	4	99	2	3	95	3	5
Sulfamonomethoxine	94	5	5	91	2	4	95	8	10	95	3	4
Sulfisozole	95	7	7	93	4	4	99	3	3	96	1	3
Sulfisomidine	89	7	7	87	6	6	96	4	5	91	3	7
Sulfametyoxydiazine	98	4	4	89	6	6	103	3	3	95	4	5
Sulfisoxazole	98	6	6	90	3	4	101	4	6	94	3	4
Ormetoprim	93	5	5	95	5	5	100	5	5	98	4	5
Diaveridine	92	3	4	95	7	7	99	3	4	98	4	7
Trimethoprim	97	3	6	93	7	7	101	1	4	97	4	6
Pyrimethamine	98	3	3	94	3	3	100	3	3	98	2	2
Albendazole metabolite	85	3	3	83	5	5	89	2	3	89	2	3
Oxibendazole	99	3	3	96	3	3	101	2	3	99	2	3
Thiabendazole	98	3	8	95	2	3	101	3	3	96	5	5
5-OH-Thiabendazole	92	7	7	91	5	5	102	9	9	96	4	8
Praziquantel	100	5	5	100	3	4	101	3	3	100	3	3
Parbendazole	104	4	4	99	3	3	104	4	4	98	2	2
Flubendazole	103	6	6	98	3	3	100	6	6	100	2	2
2-Amino-flubendazole	88	3	4	86	4	4	92	4	4	93	2	2
Levamisole	95	5	4	98	5	5	103	5	6	99	4	6
Kitasamycin	112	3	8	95	4	4	114	3	3	99	3	3
Tylosin	104	4	6	92	6	6	109	6	6	90	3	5
Tiamulin	109	4	4	102	3	3	115	3	3	105	2	2
IS補正												
Ciprofloxacin	108	2	4	96	4	4	108	2	2	101	2	3
Sarafloxacin	103	3	3	105	3	3	102	4	6	104	2	2
Norfloxacin	107	5	5	96	3	3	110	5	5	102	2	4

Compound	chicken						salmon					
	Spiked level: 0.01 µg/g			Spiked level: 0.1 µg/g			Spiked level: 0.01 µg/g			Spiked level: 0.1 µg/g		
	rec	repeat	Inter.Pre	rec	repeat	Inter.Pre	rec	repeat	Inter.Pre	rec	repeat	Inter.Pre
Enrofloxacin	87	7	7	82	3	3	87	3	4	91	2	2
Ciprofloxacin	73	7	7	76	5	5	74	4	4	72	2	3
Ofloxacin	80	8	8	79	4	4	87	5	6	91	2	2
Orbifloxacin	82	8	8	83	6	6	88	4	5	86	2	3
Sarafloxacin	76	5	6	80	6	6	82	4	6	78	1	3
Difloxacin	89	7	8	87	5	5	93	4	6	93	2	3
Danofloxacin	81	3	5	80	3	3	87	2	3	87	1	3
Norfloxacin	72	8	8	76	6	8	73	6	6	71	3	3
Marbofloxacin	87	5	6	83	6	4	89	14	14	93	1	3
Oxolinic acid	93	8	8	84	2	3	98	3	3	96	4	4
Nalidixic acid	92	4	4	87	3	4	93	5	5	94	3	3
Flumequine	92	4	5	90	3	4	91	7	7	94	2	2
Piromidic acid	90	6	7	86	3	4	97	4	4	94	4	4
Sulfaethoxypyridazine	97	6	6	85	5	6	87	3	4	86	6	6
Sulfaquinoxalinesodium	92	6	6	85	5	5	83	6	6	86	3	4
Sulfachlorpyridazine	96	8	8	84	7	7	90	6	6	87	4	5
Sulfadiazine	95	4	4	85	6	6	93	2	2	90	4	5
Sulfadimidine	102	5	5	86	5	6	88	9	9	90	4	6
Sulfadimethoxine	97	7	6	87	5	5	89	2	4	89	5	5
Sulfacetamide	95	7	8	82	7	7	89	10	10	92	5	5
Sulfathiazole	94	6	6	82	6	6	88	5	5	83	4	6
Sulfadoxine	100	4	5	86	5	5	93	4	4	90	4	4
Sulfatroxazole	94	7	7	85	3	3	90	7	7	88	7	7
Sulfapyridine	99	6	6	84	5	6	92	4	4	89	5	6
Sulfabromomethazine	93	7	7	86	4	5	81	8	8	86	4	5
Sulfabenzamide	90	10	12	86	5	5	91	6	6	87	4	4
Sulfamethoxazole	94	10	10	86	7	7	93	5	6	88	4	5
Sulfamethoxypyridazine	97	7	7	85	4	5	90	6	6	85	5	7
Sulfamerazine	98	6	6	86	5	6	89	1	4	90	4	5
Sulfamonomethoxine	95	15	15	86	7	7	90	9	12	88	4	5
Sulfisozole	93	5	5	87	5	5	90	4	4	90	3	4
Sulfisomidine	88	7	7	79	6	6	87	2	3	87	4	5
Sulfametoxydiazine	96	5	5	85	6	6	92	6	6	90	4	6
Sulfisoxazole	93	14	14	84	6	6	87	7	9	86	5	5
Ormetoprim	85	4	6	77	3	3	85	4	4	90	2	2
Diaveridine	83	3	3	73	4	4	85	1	4	90	2	2
Trimethoprim	83	5	7	76	2	3	85	3	3	89	2	2
Pyrimethamine	89	3	4	85	2	2	90	0.5	3	89	1	2
Albendazole metabolite	75	3	4	73	2	3	76	2	3	73	2	2
Oxibendazole	93	3	3	87	1	2	95	2	3	91	2	2
Thiabendazole	89	3	5	84	4	4	92	4	4	95	3	3
5-OH-Thiabendazole	82	6	6	74	4	4	81	4	4	79	2	3
Praziquantel	88	3	3	94	2	2	94	3	3	91	2	2
Parbendazole	91	4	5	90	1	2	94	2	2	86	2	2
Flubendazole	86	2	4	91	1	2	91	5	6	84	3	3
2-Aminoflubendazole	78	3	4	75	3	3	79	2	4	72	1	2
Levamisole	90	3	3	83	2	3	92	2	4	100	3	3
Kitasamycin	105	3	3	77	8	8	100	14	14	102	8	8
Tylosin	109	8	8	63	11	11	98	9	10	96	9	9
Tiamulin	111	3	3	97	1	2	114	2	2	100	1	2
IS補正												
Ciprofloxacin	102	6	6	93	3	3	106	2	2	89	6	6
Sarafloxacin	105	4	4	102	3	3	107	2	2	99	6	6
Norfloxacin	95	5	5	97	4	4	100	6	6	86	5	5

Compound	beef				pork				prawn				yellowtail			
	Spiked level: 0.01 µg/g		Spiked level: 0.1 µg/g		Spiked level: 0.01 µg/g		Spiked level: 0.1 µg/g		Spiked level: 0.01 µg/g		Spiked level: 0.1 µg/g		Spiked level: 0.01 µg/g		Spiked level: 0.1 µg/g	
	rec	repeat	rec	repeat	rec	repeat	rec	repeat	rec	repeat	rec	repeat	rec	repeat	rec	repeat
Enrofloxacin	86	5	85	8	93	4	97	3	93	5	91	3	92	3	89	1
Ciprofloxacin	71	1	72	3	75	2	77	3	78	2	73	3	73	2	78	4
Ofloxacin	86	3	82	8	88	5	94	3	92	4	91	2	87	3	90	1
Orbifloxacin	84	4	83	7	91	4	93	2	92	2	90	2	90	3	90	1
Sarafloxacin	76	3	76	6	82	2	86	3	83	2	81	2	73	2	83	1
Difloxacin	91	6	86	9	93	5	97	3	94	4	94	3	90	3	94	1
Danofloxacin	84	2	81	7	88	5	92	3	90	2	90	3	85	2	88	2
Norfloxacin	70	2	72	3	73	7	80	4	82	5	73	3	72	2	72	4
Marbofloxacin	90	4	85	8	97	3	100	3	101	2	94	5	90	7	94	1
Oxolinic acid	92	7	88	12	100	2	100	4	100	5	97	3	96	3	93	1
Nalidixic acid	89	7	88	10	96	4	99	2	94	3	95	3	83	4	90	3
Flumequine	91	3	87	9	97	4	99	2	98	6	97	2	93	4	95	2
Piromidic acid	86	4	84	11	93	5	95	4	96	7	92	5	88	6	94	2
Sulfathoxyypyridazine	82	5	81	8	86	5	86	2	84	5	83	2	87	8	84	5
Sulfaquinoxalinesodium	80	4	83	9	88	3	86	3	87	2	85	1	95	10	81	8
Sulfachloropyridazine	87	6	87	9	91	9	90	3	83	7	87	3	94	6	87	5
Sulfadiazine	83	2	83	9	91	3	91	2	90	3	87	3	89	4	88	2
Sulfadimidine	84	8	84	10	91	8	90	1	90	5	85	1	90	5	88	4
Sulfadimethoxine	84	1	82	8	92	6	90	3	87	5	87	2	98	6	90	6
Sulfacetamide	89	7	83	10	92	4	93	2	90	4	89	4	84	4	88	2
Sulfathiazole	76	4	78	8	83	2	81	3	80	2	76	2	83	8	80	4
Sulfadoxine	84	1	82	9	92	3	90	3	88	4	87	2	89	7	89	3
Sulfatrazazole	81	8	84	9	93	6	89	4	89	6	87	1	92	10	86	2
Sulfapyridine	84	4	83	8	88	2	89	2	85	4	84	1	86	5	87	4
Sulfabromomethazine	85	7	82	8	89	2	86	4	89	8	85	2	101	11	81	14
Sulfabenzamide	88	9	83	9	88	6	89	3	87	6	86	3	93	5	86	3
Sulfamethoxazole	86	7	82	9	86	4	90	4	86	5	87	4	83	13	86	3
Sulfamethoxyypyridazine	82	7	82	9	87	6	87	3	76	7	83	2	87	6	85	3
Sulfamerazine	83	5	83	9	92	4	90	1	89	3	86	1	89	6	88	4
Sulfamonomethoxine	87	7	82	7	90	3	91	1	93	9	87	1	92	6	86	4
Sulfisozole	84	6	82	8	89	5	92	2	93	3	88	1	88	3	89	3
Sulfisomidine	77	5	79	8	84	3	86	3	80	2	79	3	83	4	84	2
Sulfametyoxydiazine	86	7	82	8	97	3	88	4	90	9	86	2	81	6	88	3
Sulfisoxazole	84	10	82	8	91	2	89	3	86	9	86	3	93	11	84	9
Ormetoprim	84	3	82	6	91	2	94	2	89	3	89	3	83	3	87	2
Diaveridine	83	4	81	6	87	2	93	3	89	1	89	2	82	1	86	1
Trimethoprim	86	4	82	6	90	5	92	3	88	6	90	4	86	3	87	1
Pyrimethamine	85	3	88	4	89	1	92	2	94	2	92	2	88	2	90	1
Albendazole metabolite	71	4	73	2	75	3	76	2	83	3	77	4	72	1	73	2
Oxibendazole	91	4	88	5	99	2	97	2	99	1	93	2	91	3	89	2
Thiabendazole	90	5	87	5	96	3	97	3	96	3	91	2	85	3	91	2
5-OH-Thiabendazole	70	3	71	2	77	3	78	3	90	4	86	3	72	6	75	3
Praziquantel	90	4	91	2	98	2	98	3	95	2	91	2	95	2	92	2
Parbendazole	89	3	87	4	93	5	94	2	98	1	94	1	90	7	89	3
Flubendazole	90	5	90	5	91	1	94	2	95	5	94	3	94	2	94	2
2-Amino-flubendazole	71	3	75	4	78	2	78	2	85	2	80	3	74	2	75	3
Levamisole	91	4	88	6	96	2	99	3	93	1	94	1	90	3	92	1
Kitasamycin	101	3	84	9	105	3	87	1	96	1	74	2	101	3	94	3
Tylosin	96	4	79	8	96	7	81	3	94	5	73	3	104	5	89	2
Tiamulin	106	4	93	3	113	3	103	2	113	3	101	2	109	2	100	2
IS補正																
Ciprofloxacin	113	5	91	7	113	2	90	4	114	3	88	3	92	2	87	4
Sarafloxacin	109	4	102	5	111	2	102	4	108	2	98	4	91	3	102	2
Norfloxacin	111	3	88	8	111	2	88	4	118	1	87	2	96	3	88	4

rec; recovery (%)

repea; repeatability (%)

Inter.Pre; intermeditate precision (%)

Validation study for analytical method of veterinary drugs in livestock products and seafood

Mizuka YAMAGUCHI^a, Yuko YOSHIDA^b, Haruna NAGAYOSHI^a, Kensaku KAKIMOTO^a, Ikuko SHIRAKAWA^a, Yoko Kitagawa^a and Keiji KAJIMURA^a

Validity of the simultaneous analysis method of veterinary drugs remaining in meats, seafoods, milk, and hen egg was evaluated. Acetonitrile containing formic acid was used for extraction from the sample, acetonitrile / hexane partitioning was used for degreasing, aminopropyl solid phase extraction centrifugal column was used for clean-up. For the measurement, a liquid chromatograph - tandem mass spectrometer was used. As a result of the additional recovery test using 50 veterinary drugs, it almost fulfilled the target value of the adequacy assessment guidelines.

Key words : livestock product and seafood, veterinary drug, LC-MS/MS, validation study

a Osaka Institute of Public Health

b Osaka Prefecture Ibaraki Public Health Center

ジャガイモによる食中毒疑い事例について

山口瑞香, 栗津 薫, 徳永佑亮, 柿本 葉, 野村千枝, 藤原拓也, 梶村計志

平成 30 年 2 月に大阪府内の保育園から保健所に、給食を食べた園児および職員数名が喉の痛み、嘔気等の症状を呈していると連絡があった。この原因は、給食で提供されたジャガイモに含まれる植物性自然毒であるソラニンやチャコニン等のアルカロイド類であると考えられた。そこで、給食残品等の試料に含まれるジャガイモの代表的なアルカロイドであるソラニンおよびチャコニンを分析した。その結果、試料から通常のジャガイモと比較して高い濃度のソラニンおよびチャコニンが検出された。

キーワード：ソラニン、チャコニン、高速液体クロマトグラフ/質量分析計

ジャガイモには、植物性自然毒の一種であるソラニンやチャコニン等のアルカロイドが含まれている。これらのアルカロイドは緑化した皮や未成熟の個体に多く含まれ、熱に強いいため加熱調理で分解されない。近年、学校でのジャガイモによる食中毒事例が増加しており、子どもの発症者が多い傾向にある¹⁾。

平成 30 年 2 月、大阪府内の保育園にて、給食を食べた園児および職員数名が喉の痛み等を訴えた。提供された給食にジャガイモが使用されており、これによる食中毒であると考えられた。そこで、府保健所の依頼により原因物質と推定されるソラニンおよびチャコニンの分析を実施した。

実 験 方 法

1. 試料

保育園に検食として冷凍保存されていた生のメイクイン(以下原材料ジャガイモ)と有症者クラスの調理品(以下検食)、調理後に取り分けられていた残品(以下残品)を分析した。対照品として市販のメイクインの皮を剥いて使用した。

2. 試薬等

(1) 標準品

ソラニンは、シグマアルドリッチ社製、チャ

コニンは EXTRASYNTHESE S.A. 製を用いた。

(2) 標準溶液等

標準品 5 mg をメタノールで溶解して全量を 5 mL とし標準原液とした(1,000 µg/mL)。標準原液をメタノール等で希釈し、0.002~0.1 µg/mL の標準溶液を作成した。

(3) 試薬等

メタノールは富士フィルム和光純薬(株)製 LC/MS 用、ギ酸アンモニウムは富士フィルム和光純薬(株)製試薬特級を用いた。固相抽出カラムは Waters 社製 OASIS HLB 60 mg(以下 HLB)、フィルターは ADVANTEC DISMIC-13HP 0.2 µm を使用した。

3. 装置

高速ホモジナイザーはポリトロン PT 10-35 GT (KINEMATICA 社製)、遠心分離機は 5922 (久保田商事(株)製)、LC-MS は Prominence UFLC および LCMS-2020 ((株)島津製作所製)を使用した。

4. 測定条件

分析カラム：GL Sciences Inertsil ODS-4 (2.1x100 mm, 3 µm)、カラム温度：40°C、流速：0.2 mL/min、注入量：5 µL、移動相：A 液；10 mmol/L ギ酸アンモニウム水溶液 B 液；アセトニトリル、グラジエント条件：B 液 5%(0 min)→25%(6 min)→90%(11 min)→90%(12 min)。

大阪健康安全基盤研究所衛生化学部食品化学 1 課

イオン化法:ESI(+)、測定モード:SIR。測定 m/z :
ソラニン ; 869、868、チャコニン ; 853、852

5. 試験溶液の調製

(1) 抽出

細切均一化した試料 1 g を量りとり、メタノール 20 mL を加えてホモジナイズ後、毎分 3,000 回転で 5 分間遠心分離を行い、上清を採取した。残留物にメタノール 15 mL を加えてホモジナイズ後、同様に遠心分離して先の上清と合わせてメタノールで 40 mL に定容し、抽出液とした。

(2) 精製

抽出液 1 mL に水を加えて 20 mL とし、あらかじめメタノールおよび水各 3 mL でコンディショニングした HLB カラムに負荷した。5 %メタノール水溶液でカラムを洗浄後、メタノール 3 mL で溶出した。水で 5 mL に定容して試験溶液とした。この試験溶液をフィルターでろ過後、適宜希釈して LC-MS で測定した。

結果 および 考察

1. 検量線

0.002~0.1 µg/mL の標準溶液を調製し、絶対検量線を作成した。決定係数(r^2)=0.99 以上の良好な直線性が得られた。定量下限は 0.4 mg/kg とした。

2. 分析結果

原材料ジャガイモ、検食および残品から対照品よりも高い濃度のソラニンおよびチャコニンが検出された(表 1)。

給食で使用されたジャガイモは、通常の大さきであり、緑化も確認されなかった。しかし、今回分析した試料からは、市販されているジャガイモよりも高い濃度のソラニンおよびチャコニンが検出された²⁾。また、過去の食中毒事

例^{3),4)}と比較しても同程度の検出結果であった。

一般的に体重 50 kg の人の場合、ソラニンやチャコニンを 50 mg 摂取すると症状が出る可能性があるとされており、子どもの場合はもう少し少量でも発症すると考えられている⁵⁾。本事例でも有症者が園児であることから、比較的少量のソラニンおよびチャコニンで食中毒を発症した可能性が考えられた。

利益相反

開示すべき利益相反はない。

文献等

- 1) 登田美桜, 畝山智香子, 豊福肇, 森川馨. わが国における自然毒による食中毒事例の傾向(平成元年~22 年). *食品衛生学雑誌* 2012; **53**: 105-120.
- 2) 新藤哲也, 牛山 博文, 観 公子, 安田 和男, 斉藤 和夫. ジャガイモ中の α -ソラニン、 α -チャコニンの含有量および貯蔵中の経時変化. *食品衛生学雑誌* 2004; **45**: 277-282.
- 3) 下井俊子, 田口信夫, 観公子, 大石充男. 化学物質及び自然毒による食中毒事件例(平成 25 年). *東京都健康安全研究センター研究年報* 2014; **65**: 167-172.
- 4) 折口菜都希, 柚田有加, 安藤尚子, 岡山明子. ジャガイモによる食中毒事件の発生について. *奈良県保健研究センター年報* 2014; **49**: 59-60.
- 5) 厚生労働省 HP 自然毒のリスクプロファイル http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryou/shokuhin/syokuchu/poison/index.html 「WEB サイトの内容は 2018 年 6 月 22 日に確認した」

表1 結果一覧

試料	試料中濃度(mg/100 g)	
	ソラニン	チャコニン
対照品(メーカー)	1.2	1.3
原材料ジャガイモ	39.7	37.0
検食	19.0	19.4
残品	16.0	16.0

Food-poisoning outbreak caused by potato

Mizuka YAMAGUCHI, Kaoru AWAZU, Yusuke TOKUNAGA, Yo KAKIMOTO, Chie NOMURA and
Keiji KAJIMURA

In February 2018, at the nursery school in Osaka Prefecture, a few kindergarten children and staffs who had eaten school meals presented with symptoms such as sore throat and nausea. The reason for this was considered to be alkaloids such as solanine and chaconine, which are plant-derived natural poisons contained in potatoes provided for meals. Therefore, solanine and chaconine, which are representative alkaloids contained in potatoes, were analyzed. As a result, high concentrations of solanine and chaconine were detected from the sample as compared with normal potatoes.

Key words : solanine, chaconine, LC-MS

大阪市で発生したクワズイモによる食中毒事例について

村上太郎^a, 昌山 敦^a, 大島 詔^b, 仲谷 正^a, 山口之彦^a

クワズイモは東アジア原産の亜熱帯地域に分布している常緑性多年草であり、植物組織中に不溶性のシュウ酸カルシウムの針状結晶が含まれるため、摂食した場合には食中毒を引き起こす。クワズイモは食用のサトイモなどの根茎と類似しているため、誤食による食中毒が多く報告されている。平成30年3月に大阪市内でクワズイモの誤食による食中毒が発生したため、当研究所で食中毒の原因究明のための対応を行った。本事例ではPCRによるクワズイモの検出法により迅速にクワズイモを同定し、光学顕微鏡による観察によりシュウ酸カルシウムの針状結晶を確認することによって、食中毒の原因物質を確認することが可能であった。クワズイモなどの有毒植物による食中毒は重篤な症状を引き起こす事例も報告されているため、今後も原因究明のための検査体制の整備が必要である。

キーワード：植物性自然毒、食中毒、クワズイモ、針状結晶、シュウ酸カルシウム

クワズイモは東アジア原産の亜熱帯地域に分布している常緑性多年草であり、被子植物系統グループ (APG: Angiosperm Phylogeny Group) の分類体系ではオモダカ目、サトイモ科、クワズイモ属に分類される¹⁾。日本でクワズイモ (*Alocasia odora*) は四国南部、九州南部以南に、シマクワズイモ (*Alocasia cucullata*) は琉球列島と小笠原諸島に、ヤエヤマクワズイモ (*Alocasia atropurpurea*) は西表島に自生している²⁾。

クワズイモには植物組織中に不溶性のシュウ酸カルシウムの針状結晶が含まれるため、摂食した場合には針状結晶が口腔粘膜に刺さり、舌の痛みやしびれ、口腔内の腫れ、胃痛などの症状を起こす¹⁾。

クワズイモは、食用のサトイモやハスイモなどの根茎と類似しているため、誤食による食中毒が報告されている³⁻⁶⁾。厚生労働省の発表では、2007年から2013年にかけて、日本国内で49人のクワズイモによる食中毒患者が報告されている¹⁾。また、クワズイモは観葉植物としても普及しており、家庭で栽培されていたクワズイモを誤食したことによる食中毒も東京都で報告されている^{4,5)}。

食中毒の原因究明の方法としては、植物の形態観察による植物種の鑑別法やクワズイモ属のDNAを特異に検出する同定法²⁾も報告されている。また、植物組織内の針状結晶の観察^{3,5)}や組織中のシュウ酸の定量^{3,6)}によって、食中毒の原因となるシュウ酸カルシウムを確認する方法も報告されている。

食中毒が発生した際には、迅速に原因食品の特定と原因物質の確認を行う必要がある。本論文では平成30年3月に大阪市内で発生したクワズイモの誤食による食中毒への対応について報告する。

事 例

1. 事例の概要

平成30年3月12日、植物の根を喫食したことによる食中毒疑いの患者が発生している連絡が大阪市内の医療機関から大阪市保健所があり、保健所による調査が行われた。

食中毒患者は平成30年3月10日に自宅で育てていた植物の根を揚げて調理し、家族2名(男性1名、女性1名)で喫食した直後に、口腔内

a 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部食品化学2課

b 大阪市立環境科学研究センター

のしびれ、痛み、呼吸困難等の症状を呈し、医療機関に救急搬送された。患者の自宅には植物の根と調理した残品が確認されたため、食中毒の原因究明のために当研究所に試料が搬入された。

2. 試料

食中毒患者の自宅から当研究所に搬入された試料を図1 (A, B) に示す。試料として、食中毒患者が自宅で栽培していた植物の根を油で揚げた調理残品 (図1A) と食中毒患者の自宅で栽培されていた植物の根 (図1B) が搬入された。搬入された植物の根からは芽が生えていたが、葉は確認されなかったため、形態観察のみでは植物種の鑑別は困難であった。

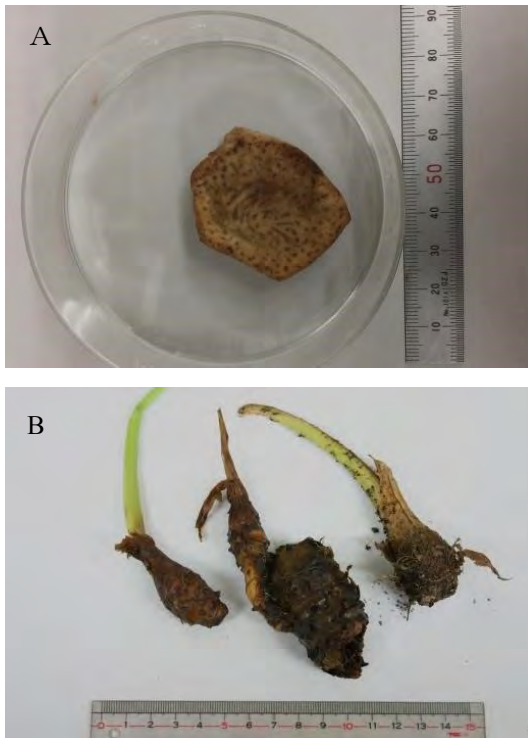


図1 搬入された試料の写真

A: 調理残品 (油で揚げた植物の根)

B: 対照品 (食中毒患者の自宅で栽培されていた植物の根)

調査方法

1. PCR法によるクワズイモの検出

試料を細切後、100 mg を採取して DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN 社製) によって DNA の抽出を行った。調製した DNA 溶液は分光光度計 (島津製作所製 UV1700) で波長 260 nm の吸光度を測定し、濃度を算出した。

PCR 法によるクワズイモの検出は、萩野らの方法に従い、真核生物検出用プライマーとクワズイモ検出用プライマーによって PCR を行った²⁾。PCR 産物は E-Gel (Thermo Fisher Scientific 社製、アガロース濃度: 4%) によって電気泳動後、UV ランプ下でゲルを撮影し、増幅断片長の確認を行った。

2. 光学顕微鏡による観察

調理残品および対照品について、従手切片法 (free hand sectioning) により切片を作成し、光学顕微鏡 (Nikon 製 Eclipse 80i) を用いて微分干渉観察法で観察した。観察された結晶には 1 mol/L の塩酸を滴下し、結晶の状態を観察した。

結果および考察

1. PCR法によるクワズイモの検出

調理残品と対照品から DNeasy Plant Mini Kit によって DNA の抽出を行ったところ、試料によって組織溶解用の API Buffer が吸水されたため、QIAshredder ホモジナイザーに試料溶液を負荷するまでは操作マニュアルの 2 倍量の試薬を使用して抽出した。

抽出した DNA 溶液を鋳型として、真核生物検出用プライマーとクワズイモ検出用プライマーによって PCR を行ったところ、図2に示すように、調理残品と対照品のいずれの DNA から真核生物とクワズイモの DNA が検出された。クワズイモ検出用プライマーはクワズイモとシマクワズイモの DNA の塩基配列を元に設計されており²⁾、クワズイモ属の植物を検出することが可能であると考えられる。このため、対照品はクワズイモ属の植物の根であり、調理残品は植物の根を調理したものであることが確認された。

結 論

萩野らは水煮によって加熱調理した試料からのクワズイモの検出について検討を行い、100℃で30分間加熱した試料からもクワズイモが検出できることを報告している²⁾。本事例では、水煮よりも高温で加熱したと推定される油で揚げた調理残品からもクワズイモの検出が可能であった。このように、PCRによるクワズイモの検出法は、加熱した微量の試料からクワズイモ属の植物を確認するために有効な方法と考える。

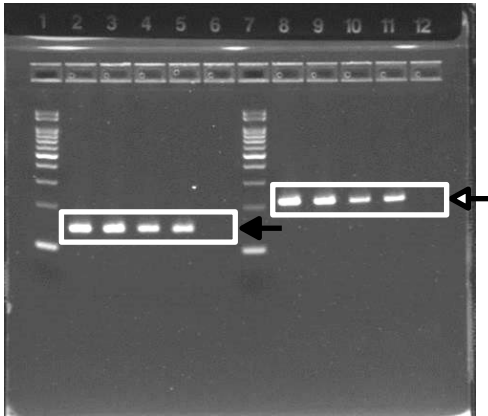


図2 PCR増幅産物のアガロース電気泳動写真

1 DNA Marker	7 DNA Marker
2 対照品 1	8 対照品 1
3 対照品 2	9 対照品 2
4 調理残品 1	10 調理残品 1
5 調理残品 2	11 調理残品 2
6 Negative Control	12 Negative Control
← 真核生物検出	← クワズイモ検出

2. 光学顕微鏡による観察

微分干渉観察法によって観察された光学顕微鏡写真を図3に示す。調理残品には針状結晶が確認された(図3A)。また、対照品には針状結晶が束になって確認された(図3B)。観察された針状結晶は1 mol/L塩酸の滴下により溶解したため、不溶性のシュウ酸カルシウムであると考えられた。

シュウ酸カルシウムの針状結晶はサトイモなどの食用植物の組織内にも分布し、えぐ味の原因物質として報告されている⁷⁾。一方で、クワズイモ中のシュウ酸カルシウムの針状結晶による有症事例がこれまでも多く報告されており³⁻⁶⁾、本事例で確認された食中毒患者の症状もシュウ酸カルシウムの針状結晶が原因であると考えられた。

本論文では平成30年に大阪市内で発生したクワズイモによる食中毒への対応について報告した。有毒植物による食中毒では迅速に原因食品の特定と原因物質の確認が必要となる。クワズイモによる食中毒はこれまでも報告されているが、それぞれの事例ごとに原因究明の方法は異なる。本事例ではPCRによるクワズイモの検出法によって迅速にクワズイモを同定し、光学顕微鏡による観察によって食中毒の原因物質となったシュウ酸カルシウムの針状結晶を確認することが可能であった。

有毒植物による食中毒は食中毒全体の発生件数に占める割合は低いが、重篤な症状を引き起こす事例も報告されているため⁸⁾、迅速に原因を究明するための検査体制の整備が必要である。また、有毒植物の食中毒事例では食用植物との誤認による食中毒も多く報告されているため、有毒植物についての情報提供と注意喚起を行う必要がある。

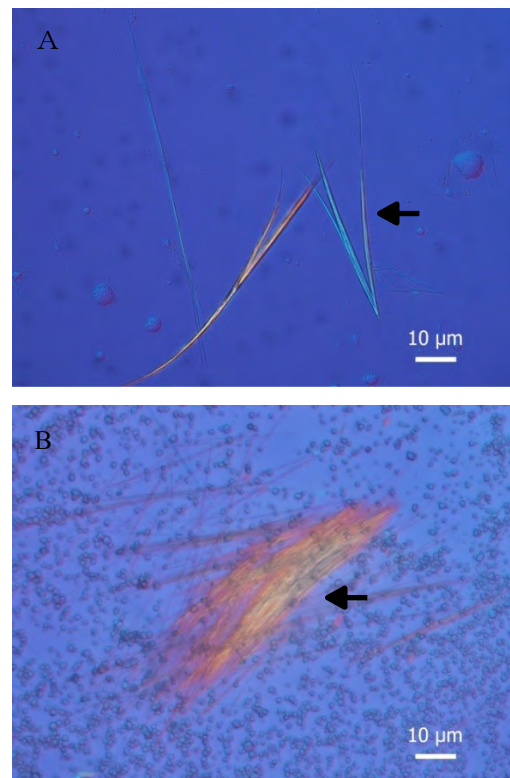


図3 微分干渉観察法による光学顕微鏡写真

- A 調理残品
B 対照品
← 針状結晶

謝 辞

本事例の調査にあたり、大阪市健康局生活衛生課と大阪市保健所西部生活衛生監査事務所のご協力を受けたことを記し、深謝申し上げます。

利 益 相 反

開示すべき利益相反はない。

文 献

- 1) 厚生労働省，自然毒のリスクプロファイル：
http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/shokuhin/syokuchu/poison/
「WEB サイトの内容は 2018 年 5 月 29 日に確認した」
- 2) 萩野賀世，中野久子，清水本武，寺井朗子，大貝真美，荒金眞佐子，阿部朋宏，笹本剛生．PCR 法によるクワズイモの同定．*食品衛生学雑誌* 2017; **58**(1): 32-35.
- 3) 熊野眞佐代，石飛栄二，石崎修造，八並誠．クワズイモによる食中毒．*長崎県衛生公害研究所報* 2000; **46**: 83-85.
- 4) 下井俊子，田口信夫，観公子，大石充男．化学物質及び自然毒による食中毒事件例（平成 25 年）．*東京健安研セ年報* 2014; **65**: 167-172.
- 5) 木村圭介，朝倉弘幸，観公子，田淵節子，笹本剛生．化学物質及び自然毒による食中毒及び有症苦情事件例（平成 26 年）．*東京健安研セ年報* 2015; **66**: 165-170.
- 6) 西名武士，村川弘，宇梶徳史，濱本愛，松本理世，増永ミキ，野田康平．LC/MS/MS を用いたクワズイモ中のシュウ酸の迅速分析法の検討．*熊本県保健環境科学研究所報* 2015; **45**: 20-25.
- 7) 田中政信，中島寿亀，森欣也．サトイモ組織内におけるシュウ酸カルシウム結晶の形成及びその分布．*園学誌* 2003; **72**(2): 162-168.
- 8) 登田美桜，畝山智香子，豊福 肇，森川 馨．わが国における自然毒による食中毒事例の傾向（平成元年～22 年）．*食品衛生学雑誌* 2012; **53**(2): 105-12.

Case report of food poisoning caused by *Alocasia* in Osaka City

Taro MURAKAMI^a, Atsushi MASAYAMA^a, Akira OSHIMA^b, Tadashi NAKATANI^a
and Yukihiro YAMAGUCHI^a

Kuwazuimo (*Alocasia odora*) and shimakuwazuimo (*Alocasia cucullata*) are inedible plants that originated in East Asia. They are occasionally eaten by misidentification and have caused food poisoning in Japan because they resemble edible tubers such as satoimo (*Colocasia esculenta*). In 2018, a food poisoning case due to eating the roots of *Alocasia* occurred in Osaka city. The specimen was confirmed to be *Alocasia* species based on PCR method. Using microscopic optical analysis, raphides (needle-like crystals) of calcium oxalate, the causative substance of the poisoning, were observed in the cellular tissue of the specimen.

Key words : phytotoxin, food poisoning, *Alocasia* species, raphides, calcium oxalate

a Osaka Institute of Public Health

b Osaka City Research Center of Environmental Science

リアルタイムPCR法によるクワズイモの同定

野村千枝^a, 昌山 敦^b, 村上太郎^b, 梶村計志^a

クワズイモの摂食が原因と疑われる食中毒が発生した場合、迅速に原因食品を特定する必要がある。調理前の栽培品や摂食した食品の残量が十分ある場合は、葉柄、根茎等の形態と比較、光学顕微鏡によるシュウ酸カルシウムの針状結晶の確認、さらにはバーコーディング領域のシーケンス解析による鑑別が可能である。しかし、残量が少ない場合や、加工度の高い調理品の場合はこれらの方法による同定が困難なことがある。そこで、既存のPCR法¹⁾をリアルタイムPCR法に応用し、より迅速にクワズイモの同定が可能か検討した。さらに本方法が実際の食中毒検体に適用可能か確認した。

キーワード：食中毒、クワズイモ、リアルタイムPCR、同定、シーケンス

クワズイモの摂食が原因と疑われる食中毒が発生した場合、迅速に原因物質を特定する必要がある。調理前の栽培品や摂食した食品の残量が十分ある場合は、葉柄、根茎等の形態と比較による鑑別が可能である。また、光学顕微鏡によるシュウ酸カルシウムの針状結晶の観察や組織中のシュウ酸の定量によって、食中毒の原因となるシュウ酸カルシウムを確認する方法も報告されている。しかし、残量が少ない場合や、加工度の高い調理品の場合はこれらの方法による同定が困難な場合がある。萩野らは、新規に作製したクワズイモ検出用プライマーを用いたPCR法を開発し、少量かつ調理等された食品試料への適用が可能なた同定法を作成した¹⁾。そこで、本論文では、萩野らのクワズイモ検出用プライマーを用いて、リアルタイムPCR法に応用し、より迅速にクワズイモの同定が可能か検討した。さらに本方法が実際の食中毒検体の残品にも適用可能か確認したので報告する。

実 験 方 法

1. 試料

検討用試料：クワズイモは大阪府内の小売店にて鉢植えを購入し、根茎と葉柄に分けた。根茎

の皮を剥いて下記の方法を用いて抽出したDNA溶液を陽性コントロールとした。本試験の陰性コントロールとして、ジャガイモ（マークイン）とサトイモの市販品を購入し、塊茎の皮を剥いて用いた。

食中毒検体：対照品 S1-1、S1-2（食中毒患者の自宅で栽培されていた植物の根）、調理残品 S2-1、S2-2（油で揚げた植物の根）。

2. 装置

粉砕機 IFM-700G (IWATANI 社)、高速冷却遠心機 Model 5922 (KUBOTA 社)、分光光度計 NanoPhotometer® Pearl (IMPLEN 社)、サーマルサイクラー GeneAmp PCR System 9700 (ThermoFisher 社)、DNA シーケンサー ABI PRISM®3130 Genetic Analyzer (ThermoFisher 社)、リアルタイムPCR装置 LightCycler®96 (roche 社)

3. DNA 抽出

粉砕機で粉砕した試料について、DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN 社) または DNeasy Plant Maxi Kit (QIAGEN 社) を用いて DNA 抽出を行った。Mini Kit には 50 mg、Maxi Kit には 100 mg を試料として供した。DNA 抽出はキット付属の使用方法に従った。調製した DNA 溶液は分光光度計で

a 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部食品化学1課

b 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部食品化学2課

波長 260 nm における吸光度の値 1 を 50 ng/ μ L DNA として DNA 濃度を算出後、DNA 濃度を 10 ng/ μ L に調整して試験に供した。

4. プライマー

既報¹⁾に従い、クワズイモおよびシマクワズイモのリボソーム DNA の ITS 領域の一部を特異的に増幅するプライマー対 (KUWAZU-Fb ; 5'-CTC TCT CCC GTC CCT CG-3' および KUWAZU-Ra ; 5'-CGG GAG TCG TTC AGA CTC G-3' 以下、クワズイモ検出用プライマー対) を用いた。このプライマー対 (KUWAZU-Fb / KUWAZU-Ra) を使用して PCR を行った場合、想定する増幅長は、クワズイモでは 219 bp、シマクワズイモでは 215bp である。また、各試料から DNA 抽出が確実にされているかを確認するために、真核生物共通 DNA 配列を検出するプライマー (TR03 ; 5' '-TCT GCC CTA TCA ACT TTC GAT GGT A-3' および TR04 ; 5' '-AAT TTG CGC GCC TGC TGC CTT CCT T-3' 以下、真核生物検出用プライマー対) を PCR に用いた。このプライマー対 (TR03/TR04) を使用して PCR を行った場合、想定する増幅長は約 137 bp である。プライマー合成は、インビトロジェン社に依頼した。

5. リアルタイム PCR

PCR に供する溶液は、2×GeneAce SYBR qPCR Mix α (ニッポンジーン社製) 10 μ L、10 μ mol/L のフォワードプライマーとリバースプライマー各々 0.8 μ L、10 ng/ μ L に調製した DNA 溶液を 1 μ L 加えた後、滅菌水で 20 μ L となるよう調製した。PCR は 95 $^{\circ}$ C 10 分間の後、95 $^{\circ}$ C 30 秒間、60 $^{\circ}$ C 60 秒間を 1 サイクルとして 45 サイクルで行った。その後、95 $^{\circ}$ C 10 秒間、65 $^{\circ}$ C 60 秒間、97 $^{\circ}$ C 1 秒間を行い、融解曲線分析を行った。リアルタイム PCR 結果の解析は、装置付属のソフトウェアで行った。

6. 検出限界の算出

クワズイモ根茎の DNA 抽出液を 0.00002~1 ng/well (0.00002, 0.00005, 0.0001, 0.0002, 0.0005, 0.001, 0.002, 0.005, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1 ng/well) になるように反応液に添加し、各濃度 10 ウェル併行でリアルタイム PCR を行い、10 ウェル併行全てでサイクル数 (装置に付

属の解析ソフトで Automated Method を用いて得られる値、Cq 値) が得られた DNA 量を検出限界とした。

7. 増幅効率の算出

クワズイモ根茎の DNA 抽出液の希釈系列を用いて、3 ウェル併行でリアルタイム PCR を行い、DNA 量の対数値と Cq 値をプロットして得られた傾きから増幅効率を算出した。

8. 繰返し再現性およびウェル間差の性能評価

日本ジェネティクス社技術資料²⁾を参考に、繰返し再現性およびウェル間差の評価として、検出限界濃度 (0.005 ng/well) の n=96well/プレートを準備し、1 日 1 回を計 3 日間繰返し実施した。それぞれの繰返し再現性 (RSD) およびサイクル数の値の差 (Δ Cq) を検討した。

9. 定性的検出による判定

装置の Minimal EPF (End Point Fluorescent 最小の最終蛍光強度) を 0.1 (0.1 以下は認識させない)、Maximal Cq を 38 (38 以上は認識させない) に設定した。2 ウェル併行で真核生物共通 DNA 配列を検出するプライマー対 (TR03/TR04) と、クワズイモ検出用プライマー対を用いたリアルタイム PCR を同時に行い、両方とも 38 未満の Cq 値が得られた場合はクワズイモ陽性と判定した。一方、真核生物共通 DNA 配列を検出するプライマー対 (TR03/TR04) において 38 未満の Cq 値が得られ、クワズイモ検出用プライマー対において 38 未満の Cq 値が得られなかった場合をクワズイモ陰性と判定した。

10. 遺伝子塩基配列の解析による植物種の確認

食中毒事例で搬入された試料の植物種の確認は既報³⁾⁴⁾に従い、marutase 遺伝子部分配列 (mat K) と非翻訳領域 (internal transcribed spacer; ITS) を増幅して、ダイレクトシーケンス法による塩基配列の解析を行った。

PCR に供する溶液は、10×PCR 緩衝液 (タカラバイオ社製) 2.5 μ L、dNTPs (タカラバイオ社製、2.5 mmol/L) 2 μ L、EX Taq Hot Start Version (タカラバイオ社製) 0.2 μ L、6 μ mol/L のフォワードプライマーとリバースプライマー各 2.5 に調製した。PCR は、98 $^{\circ}$ C 10 秒間、60 $^{\circ}$ C 30 秒

間、72 °C 60 秒間を 1 サイクルとして 30 サイクルで行った。PCR 後の溶液から、余剰のプライマーおよび dNTPs を ExoSAP-IT (Affymetrix 社製) を用いて除去後、PCR 産物を Big Dye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Thermofisher 社製) を用いて蛍光ラベル化した。未反応の試薬を除去するため、BigDye XTerminator® Purification Kit (Thermofisher 社製) により精製した。その後、脱イオン化ホルムアミド (Thermofisher 社製) を等量加えた後、DNA シーケンサーにより塩基配列の解析を行った。解析した塩基配列は DNA 配列解析ソフトウェア SEQUENCHER (Gene Codes 社製) によって、波形を確認して塩基を決定した。決定した塩基配列は日本 DNA データバンク (DDBJ) の Nucleotide BLAST によってデータベース (Genbank) に登録されている遺伝子配列との相同性の検索を行った⁵⁾。

結果 および 考察

1. 融解曲線分析による反応特異性

クワズイモ検出用プライマー対を用いて、リアルタイム PCR の反応特異性の解析を行った。クワズイモ根茎と葉柄に対しては、増幅曲線で増幅が認められ (図 1a)、かつ融解曲線分析において、融解曲線の Tm 値が陽性コントロールと一致した (Tm 値 91 °C) ことから陽性と判定した (図 2a)。しかし、サトイモについて、増幅曲線でやや増幅が認められた (Cq 値>38) (図 1b)、融解曲線の Tm 値 (76 °C) が陽性コントロールと一致しなかったことから陰性と判定した (図 2b)。ジャガイモについては増幅が認められなかったことから陰性と判定した (図 1c)。

サトイモにおいて増幅曲線で増幅が認められた Cq38 以降を非特異的増幅とみなし、Maximal Cq 値を 38 と設定することにした。

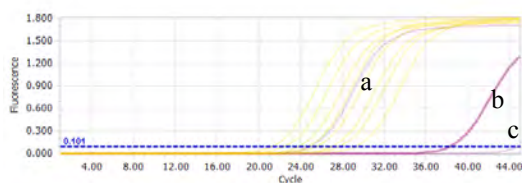


図 1 KUWAZU-Fb/KUWAZU-Ra による増幅曲線
黄色線 クワズイモ根茎(0.005-1 ng/well) 紫色線
a:クワズイモ葉柄, b:サトイモ, c:ジャガイモ

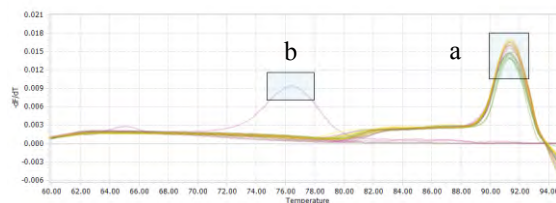


図 2 融解曲線分析による Tm 値の算出
a:クワズイモ 91 °C, b:サトイモ 76 °C

2. 検出限界および増幅効率

検出限界は 0.005 ng/well (5 pg/well) であった。クワズイモ根茎の DNA 抽出液を用いて、DNA 量の対数値と Cq 値をプロットした結果、0.005 ng-1 ng/well (0.005、0.01、0.02、0.05、0.1、0.2、0.5、1 ng/well の 8 点検量線) の範囲で良好な直線性を示した (R² 値=1.0)。増幅効率は 2.05 と理論値の 2 に近く良好な結果であった (図 3)。

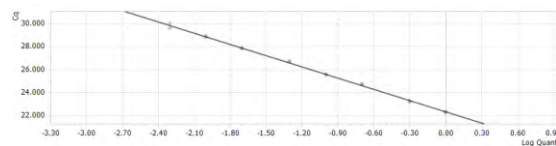


図 3 KUWAZU-Fb/KUWAZU-Ra によるクワズイモの検量線

3. 繰り返し再現性およびウェル間差

繰り返し再現性およびウェル間差の評価として、検出限界 (0.005 ng/well) 濃度の n=96 well/プレートの反応プレートを準備し、それぞれ 1 日 1 回とし、計 3 回繰り返し実施した。それぞれの繰り返し再現性 (RSD) および Cq の最大値と最小値の差 (ΔCq) を検討した。その結果、3 回の Cq 平均値は 30.58~30.70、RSD は 0.59~0.65 %、ΔCq については 0.82 ~ 0.89 と 1 未満であり良好な結果を示した (表 1)。

表 1 繰り返し再現性およびウェル間差の結果

DNA (ng/well)	Cq 平均値	Cq SD	RSD (%)	ΔCq
0.005	30.58	0.19	0.62	0.89
	30.70	0.19	0.65	0.82
	30.67	0.16	0.59	0.82

4. 食中毒検体のリアルタイム PCR 結果

食中毒事例の検体 (S1, S2) を用いて、2 併行抽出でリアルタイム PCR 法によるクワズイモの同定を行った。真核生物検出用プライマー、クワズイモ検出用プライマーを用いたリアルタイム PCR の両方の結果において、対照品 1, 2 (S1-1, S1-2)、調理残品 1, 2 (S2-1, S2-2) は、すべて明瞭な増幅曲線を示した (図 4、図 5)。定性的検出を行い、当該品がクワズイモであることを確認した。

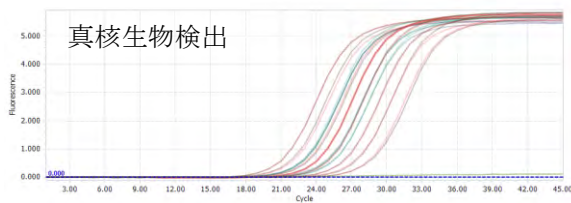


図 4 T03/T04 による増幅曲線：赤色線 クワズイモ根茎 (0.005-1 ng/well)、緑色線 食中毒検体

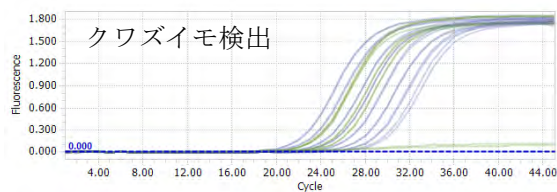


図 5 KUWAZU-Fb / KUWAZU-Ra による増幅曲線：青色線 クワズイモ根茎 (0.005-1 ng/well)、緑色線 食中毒検体

5. 遺伝子配列の解析による植物種の確認

抽出した DNA 溶液を鋳型として PCR を行ったところ、調理残品と対照品のいずれの DNA からも mat K および ITS 遺伝子が増幅された。mat K 遺伝子を DNA シークエンサーによって解析を行い、720 bp の塩基配列を決定した。DNA データバンクに対して検索を行った塩基配列は、クワズイモ (*Alocasia odora*) もしくはシマクワズイモ (*Alocasia cucullata*) の塩基配列と最も高い相同性を示した。また、ITS 領域の 274 bp の塩基配列もクワズイモもしくはシマクワズイモと最も高い相同性を示した。

石垣島におけるクワズイモとシマクワズイモの調査では、ITS 領域の遺伝子配列の解析だけでは鑑別は困難であり、RAPD (Random Amplified

Polymorphic DNA) や ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) の解析によって鑑別が可能であることが報告されている⁶⁾。本報告でも遺伝子の塩基配列の解析のみではクワズイモとシマクワズイモの鑑別は困難であったが、食中毒の原因となった試料はクワズイモ属の植物であることが確認された。本報告で使用したクワズイモ検出用プライマーは、クワズイモとシマクワズイモを検出するために設計されており、クワズイモ属の植物を検出することが可能であると考えられる。遺伝子塩基配列の解析結果からも検出法の特異性が確認された。

ま と め

今回、リアルタイム PCR 法による迅速なクワズイモ属の検出法を示した。本法は電気泳動を伴う PCR 法や遺伝子配列の解析による解析よりも迅速に結果が得られた。さらに平成 30 年に大阪市内で発生したクワズイモの食中毒検体にも適用可能であった。

利 益 相 反

開示すべき利益相反はない。

文 献

- 1) 萩野賀世, 中野久子, 清水本武, 寺井朗子, 大貝真美, 荒金真佐子, 阿部朋弘, 笹本剛生. PCR 法によるクワズイモの同定. *食品衛生学雑誌* 2017; **58(1)**: 32-35.
- 2) 日本ジェネティクス社, 厚生労働省より通知されている「遺伝子組換え食品検査方法」に則った、ロシュ社製リアルタイム PCR 装置の同等性試験の結果および補足資料:
<https://co.n-genetics.com/product/3001/>「WEB サイトの内容は2018年7月26日に確認した」
- 3) Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 1997; **25**: 3389-3402.
- 4) 牛山温子, 赤星千絵, 大澤伸彦, 清水智美,

松島勇紀, 清水英明, 橋口成喜. LC-MS/MS およびDNA バーコーディングを用いた 食中毒事例におけるチョウセンアサガオ類の鑑別. *食品衛生学雑誌* 2017; **58(2)**: 58-86.

5) 昌山敦, 村上太郎, 佐久間大輔, 紀雅美, 山野哲夫, 清水充. 食中毒原因究明のための遺伝子解析によるキノコ鑑別. *食品衛生学雑誌* 2012; **53(5)**: 237-242.

6) Witono JR, Konishi T, Kondo K. DNA polymorphisms analysis of *Alocasia odora* and *A. cucullata* in Ishigaki Island, Japan generated by RAPD and ISSR markers and ITS nrDNA sequence data. *Chromosome Botany* 2008; **3**: 11-18.

Identification of *Alocasia odora* (Kuwazuimo in Japanese) using real-time PCR

Chie NOMURA^a, Atsushi MASAYAMA^b, Taro MURAKAMI^b and Keiji KAJIMURA^a

In case of food poisoning suspected to be caused by feeding of *Alocasia odora*, it is necessary to identify the causative food quickly. If the remaining amount of the eaten food before cooking is enough, forming a comparison and confirmation of acicular crystals of calcium oxalate by optical microscope is available, and also sequence analysis is possible. However, when the remaining amount is small or food is highly processed, identification is difficult. Therefore, current PCR method was applied to real-time PCR method, and it was confirmed whether this application can be applied to actual food poisoning specimens.

Key words : food poisoning, *Alocasia odora*, real-time PCR, identification, sequencing

a Division of Hygienic Chemistry Food Chemistry Section 1, Osaka Institute of Public Health

b Division of Hygienic Chemistry Food Chemistry Section 2, Osaka Institute of Public Health

水質検査における外部精度管理 (2016 年度)

—フェノール類—

吉田 仁, 小泉義彦

水道水質検査精度の向上を図ることを目的に、大阪府内水道事業体、保健所、地方衛生研究所（以下、水道事業体等）17 機関を対象に、フェノール類を対象項目として外部精度管理試験を実施した。その結果、1 機関が「外れ値」となった。外れ値となった機関を対象にフォローアップ調査を行い、再度、外部精度管理試験を実施したところ、良好な検査値を得た。

キーワード：水道水、外部精度管理、フェノール類

大阪府水道水質検査外部精度管理事業は、水道水質検査精度の向上を図ることを目的に、1993 年度より、大阪府内水道事業体、保健所、地方衛生研究所（以下、水道事業体等）を対象に実施している¹⁻¹⁰⁾。

2016 年度の対象項目は、有機項目として「フェノール類」を選定した。フェノール類は、主に防腐剤や消毒剤として、また医薬品、農薬、合成繊維・樹脂、染料等の製造原料として利用されている。フェノール類は塩素と反応して、モノ-、ジ-、トリ-クロロフェノール類を生成し、飲料水に異臭味を与える¹¹⁾。フェノールそのものは 0.1 mg/L 以下では異臭は感じられない。臭気の観点から問題となるのは塩素消毒により生成されるクロロフェノール類であり、それらはフェノールの 300~500 倍の不快感となる^{11,12)}。フェノール類の水道水質基準は、1958 年の水質基準に関する省令（厚生省令第 23 号）により「0.005 ppm を超えてはならない」と定められた。その後、1960 年の水質基準に関する省令（厚生省令第 20 号）より項目名がフェノール類となり、基準値は「フェノールとして 0.005 ppm を超えてはならない」となった¹³⁾。そして、1978 年の水質

基準に関する省令（厚生省令第 56 号）により基準値の表現が「フェノールとして 0.005 mg/L 以下であること」となった。1992 年の水質基準に関する省令の改正（厚生省令第 69 号）や、2003 年の水質基準の見直しの検討会でも表現は変更されず、現在でもフェノール類は水質基準として 0.005 mg/L 以下と規定されている¹¹⁾。

調 査 方 法

1. 参加機関

本調査に参加した水道事業体等は、17 機関であった。

2. 実施方法

(1) 精度管理試料の調製方法

2016 年 9 月 20 日~26 日にかけて精製水約 120 L をステンレスタンクに採水した。精製水中のフェノール類濃度は 0.0005 mg/L 未満であった。9 月 26 日にフェノール標準液（和光純薬：1.0 mg/mL 水溶液）0.5 mL、4-クロロフェノール標準液（AccuStandard：5.0 mg/mL メタノール溶液）

0.1 mL、2,6-ジクロロフェノール標準液 (AccuStandard: 5.0 mg/mL メタノール溶液) 0.2 mL 及び 2,4,6-トリクロロフェノール標準液 (AccuStandard: 5.0 mg/mL メタノール溶液) 0.2 mL を、精製水で 50 mL に希釈して添加用混合標準液を調製した。ステンレスタンクに添加用混合標準液を 15 mL を添加した。アセトン洗浄済み 3 L ガロン瓶 30 本に満水になるよう分注して冷蔵保管した後、9 月 28 日に大阪健康安全基盤研究所の上水試験室において各検査実施機関に配付した。

(2) 精度管理試料の均一性及び安定性

2016 年 9 月 26 日に精度管理試料を分注順に等間隔で 5 本抜き取って測定した。5 試料の平均値はそれぞれ、フェノール 0.00122 mg/L、4-クロロフェノール 0.00105 mg/L、2,6-ジクロロフェノール 0.00212 mg/L、2,4,6-トリクロロフェノール 0.00205 mg/L であり、試料間の変動係数はそれぞれ、フェノール 2.15%、4-クロロフェノール 1.63%、2,6-ジクロロフェノール 2.81%、2,4,6-トリクロロフェノール 4.42%であった。また、配付日、配付 1、2、5 日後にフェノール類を測定した結果を図 1 に示す。いずれの化合物も近似直線の傾きはほぼ 0 で、精度管理試料の安定性に問題はないことを確認した。

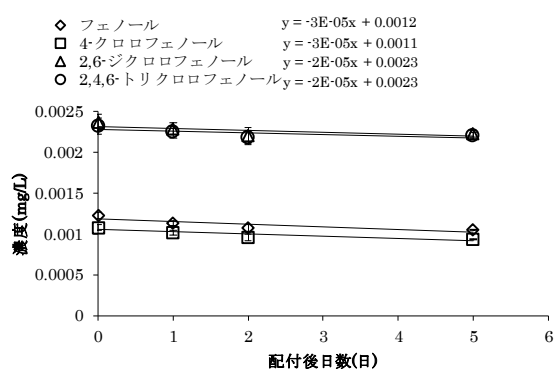


図 1 精度管理試料に含まれるフェノール類分析値の安定性
(n = 5、平均±標準偏差)

(3) 試料の測定方法

検査方法は「水質基準に関する省令の規定に基づき厚生労働大臣が定める方法」の固相抽出—誘導体化—ガスクロマトグラフ—質量分析法 (以下、誘導体化 GC/MS 法) 及び固相抽出—液体クロマトグラフ—質量分析法 (以下、LC/MS 法) とした。配付試料については前処理を含めて 5 回の測定を行い、その結果と分析法の分析条件等を「外部精度管理結果報告書」に記入することとした。「外れ値」に該当した機関に対してフォローアップ調査を実施した。

(4) 評価の検証方法

検査結果は、「真値」に対する誤差率 (以下、誤差率) および Z スコアで評価を行い、両方の評価方法において許容範囲を超過した検査値を「外れ値」とした。「真値」は、各機関からの検査値を用いて、有意水準を 5% として Grubbs の棄却検定¹⁴⁾を行い、棄却された検査値を除いた検査値から平均を求め、これを「真値」とした。誤差率は、以下の式から算出し、±20%を許容範囲とした。

$$\text{誤差率 (\%)} = (\text{各機関の検査値} - \text{「真値」}) / \text{「真値」} \times 100$$

Z スコアは四分位数法で算出し¹⁵⁾、Z スコアの絶対値 3 未満を許容範囲とした。なお、各機関内で測定された精度管理試料の CV が 20% を超過した機関の検査値は評価対象外とした。

結果 および 考察

1. 分析方法

すべての機関が誘導体化 GC/MS 法によって検査を実施していた。

2. 検査結果の検証

(1) 誤差率、Z スコア及び「外れ値」

水道事業者等 17 機関から報告された検査値、変動係数、誤差率及び Z スコアを表 1 に示す。

精度管理試料では、フェノール類の内、フェノール、4-クロロフェノール、2,6-ジクロロフェノール及び 2,4,6-トリクロロフェノールを添加して調製したが、すべての機関はフェノール類の

表1 水道事業体等17機関の測定結果の概要

フェノール

機関番号	検査値 (平均値) (mg/L)	変動係数 (%)	真値に対する 誤差率 (%)	Zスコア
B-1 *	0.000906	10.88	-22.16	-3.13
B-2	0.00107	4.10	-8.29	-1.04
B-5	0.00109	1.20	-6.57	-0.78
B-6	0.00110	2.03	-5.54	-0.62
B-9	0.00110	4.50	-5.54	-0.62
B-3	0.00113	3.37	-2.96	-0.23
B-10	0.00114	3.66	-2.45	-0.16
B-7	0.00114	7.22	-2.45	-0.16
B-14	0.00115	1.68	-1.42	0.00
B-15	0.00116	2.11	-0.39	0.16
B-12	0.00118	0.76	0.99	0.36
B-16	0.00120	1.99	3.05	0.67
B-4	0.00120	5.71	3.39	0.73
B-8	0.00123	3.25	5.62	1.06
B-11	0.00124	1.14	6.48	1.19
B-13	0.00125	1.55	7.69	1.37
B-17	0.00126	3.14	8.37	1.48
平均値	0.00115			
最大値	0.00126			
最小値	0.000906			
標準偏差	0.0000858			
変動係数(%)	7.46			
n	17			

真値 : 0.00116 mg/L

*真値に対する誤差率が±20%を超え、Zスコアの絶対値が3以上の機関

4-クロロフェノール

機関番号	検査値 (平均値) (mg/L)	変動係数 (%)	真値に対する 誤差率 (%)	Zスコア
B-1	0.000904	4.87	-17.03	-2.73
B-2	0.000982	2.58	-9.85	-1.55
B-5	0.00100	0.66	-8.27	-1.29
B-3	0.00103	2.90	-5.86	-0.89
B-6	0.00103	2.92	-5.53	-0.83
B-4	0.00108	2.54	-0.85	-0.06
B-10	0.00108	4.34	-0.85	-0.06
B-13	0.00108	1.21	-0.67	-0.03
B-8	0.00108	3.84	-0.48	0.00
B-15	0.00111	2.68	1.54	0.33
B-16	0.00111	0.40	1.72	0.36
B-12	0.00111	0.90	1.90	0.39
B-7	0.00112	5.64	2.64	0.52
B-11	0.00116	0.77	6.86	1.21
B-9	0.00117	2.09	7.41	1.30
B-14	0.00118	2.96	8.70	1.52
B-17	0.00129	3.52	18.61	3.15
平均値	0.00109			
最大値	0.00129			
最小値	0.000904			
標準偏差	0.0000878			
変動係数(%)	8.06			
n	17			

真値 : 0.00109 mg/L

表 1 水道事業体等 17 機関の測定結果の概要(続き 1)

2,6-ジクロロフェノール

機関番号	検査値 (平均値) (mg/L)	変動係数 (%)	真値に対する 誤差率 (%)	Zスコア
B-1	0.00213	4.73	-11.17	-2.35
B-4	0.00222	1.82	-7.16	-1.46
B-2	0.00223	3.69	-7.08	-1.44
B-3	0.00231	2.18	-3.74	-0.70
B-7	0.00233	5.72	-2.57	-0.44
B-13	0.00236	1.48	-1.32	-0.17
B-6	0.00236	3.04	-1.32	-0.17
B-8	0.00237	4.12	-1.07	-0.11
B-11	0.00238	1.50	-0.57	0.00
B-5	0.00240	0.76	0.01	0.13
B-9	0.00243	2.78	1.43	0.44
B-10	0.00246	4.28	2.52	0.68
B-15	0.00248	2.44	3.52	0.91
B-16	0.00249	0.80	3.94	1.00
B-14	0.00249	1.24	3.94	1.00
B-12	0.00254	0.99	5.86	1.42
B-17	0.00275	4.02	14.79	3.40
平均値	0.00240			
最大値	0.00275			
最小値	0.00213			
標準偏差	0.000142			
変動係数(%)	5.91			
n	17			

真値 : 0.00240 mg/L

2,4,6-トリクロロフェノール

機関番号	検査値 (平均値) (mg/L)	変動係数 (%)	真値に対する 誤差率 (%)	Zスコア
B-1	0.00211	3.06	-12.58	-2.64
B-7	0.00225	4.91	-6.73	-1.37
B-4	0.00225	3.02	-6.48	-1.31
B-2	0.00225	3.10	-6.48	-1.31
B-11	0.00232	2.92	-3.82	-0.74
B-8	0.00232	4.20	-3.82	-0.74
B-13	0.00239	1.98	-1.00	-0.13
B-3	0.00239	1.61	-0.92	-0.11
B-12	0.00240	1.18	-0.42	0.00
B-6	0.00242	4.11	0.49	0.20
B-5	0.00245	1.20	1.74	0.47
B-9	0.00246	2.43	2.15	0.56
B-14	0.00247	0.72	2.40	0.61
B-10	0.00250	4.63	3.56	0.86
B-16	0.00258	1.36	6.88	1.58
B-15	0.00265	2.99	9.87	2.23
B-17	0.00278	4.45	15.18	3.38
平均値	0.00241			
最大値	0.00278			
最小値	0.00211			
標準偏差	0.000163			
変動係数(%)	6.74			
n	17			

真値 : 0.00241 mg/L

表 1 水道事業体等 17 機関の測定結果の概要(続き 2)

フェノール類				
機関番号	検査値 (mg/L)	変動係数 (%)	真値に対する 誤差率 (%)	Zスコア
B-1	0.00380	5.18	※	※
B-2	0.00415	2.83	-7.56	-2.20
B-3	0.00435	2.38	-3.01	-1.05
B-4	0.00437	3.02	-2.65	-0.96
B-5	0.00437	0.69	-2.57	-0.93
B-6	0.00437	2.89	-2.52	-0.92
B-7	0.00437	5.87	-2.52	-0.92
B-8	0.00450	3.87	0.29	-0.21
B-9	0.00453	2.80	1.09	-0.010
B-10	0.00454	4.12	1.14	0.010
B-11	0.00458	1.31	2.03	0.23
B-12	0.00459	0.82	2.34	0.31
B-13	0.00460	1.53	2.65	0.39
B-14	0.00463	1.36	3.19	0.53
B-15	0.00466	2.58	3.99	0.73
B-16	0.00467	1.15	4.12	0.76
B-17	0.00512	3.67	14.11	3.30
平均値	0.00448			
最大値	0.00512			
最小値	0.00380			
標準偏差	0.000272			
変動係数(%)	6.06			
n	17			

真値 : 0.00449 mg/L

※フェノールが外れ値であったため評価の対象外とした

個々の成分を正しく同定していた。いずれの化合物についても、機関内変動係数が 20%を超過した機関は存在しなかったため、すべての機関を評価対象とした。

フェノールについて、「真値」を算出するため、検査値を有意水準 5%で Grubbs の棄却検定を行った。その結果、1 検査値 (B-1) が棄却され、残りの 16 検査値を平均した 0.00116 mg/L を「真値」とした。「真値」に対する誤差率の許容範囲を超えたのは 1 機関 (B-1) であった。一方、17 検査値を用いて Z スコアを求めた結果、Z スコアの範囲は-3.13~1.48 となり、Z スコアが許容範囲を超えたのは 1 機関 (B-1) であった。誤差率と Z スコアとの両方の許容範囲を超えた検査値を「外れ値」と評価したが、この「外れ値」に該当する機関は 1 機関 (B-1) であった。一方、4-クロロフェノール、2-6-ジクロロフェノール及び 2,4,6-トリクロロフェノールにおいて「外れ値」に該当する機関は存在しなかった。

フェノール類とは、フェノールとクロロフェノール類をフェノールとして換算したものの総

量である。17 の検査値のうち、フェノールで「外れ値」となった 1 機関 (B-1) を除いてフェノール類として評価を行ったところ、1 機関 (B-17) が棄却されたため、15 機関の平均値 0.00449 mg/L を真値とした。「真値」に対する誤差率で許容範囲±20%を超えた機関は存在しなかった。16 検査値を用いて Z スコアを求めた結果、Z スコアの範囲は-2.20~3.30 となり、Z スコアが許容範囲を超えたのは 1 機関 (B-17) となった。誤差率と Z スコアとの両方の許容範囲を超えた検査値を「外れ値」と評価したが、この「外れ値」に該当する機関は存在しなかった。外れ値の存在率は、5.88% (1/17) であったため、概ね良好な外部精度管理結果であったと考えられた。「外れ値」となった機関 (B-1) に対してフォローアップ調査を行った。

(2) フォローアップ調査

機関 B-1 は、誘導体化 GC/MS 法を用いており、フェノールの検査値は 0.000906 mg/L、Z スコアは-3.13、「真値」に対する誤差率は-22.16%であった。提出された資料や電話による聞き取

りを行ったところ、GC-MSの感度が安定化する前に標準系列及び精度管理試料を測定していたことが原因として考えられた。そして機関B-1の担当者らが、分析回数とフェノール類及び内部標準物質であるアセナフテン-d₁₀のピーク面積値の関連性を調べたところ、概ね10回程度分析するまでピーク面積値が安定せず、増加傾向を示すことが確認された。

その後、大阪健康安全基盤研究所で新たに調製した精度管理試料を、機関B-1においてGC-MSが安定化するまで測定を行ってから再測定した結果、フェノールの濃度は設定値0.00120 mg/Lに対して検査値0.00127 mg/L、変動係数4.02%、誤差率5.83%と精度の良い結果が得られた。今回のフォローアップ調査の結果、外れ値の原因はGC-MSの感度が安定化する前に測定を開始したことによることが明らかとなった。今回の結果を受けて、機関B-1はGC-MSの感度が安定するまで標準試料を繰り返し測定することを標準作業手順書に明記することになった。

(3) 全体的な留意点

① 検量線

告示では別表に記載された濃度範囲内で4段階以上の標準液を用いて検量線を作成するように記載されている¹⁶⁾。すべての機関において検量点を4点以上用いて検量線を作成していた。

誘導体化GC/MS法の告示における濃度範囲の上限は各成分とも0.01 mg/Lであるが、すべての機関において最も高い検量点は告示の範囲内であった。すべての機関は告示に従って空試験を実施していた。なお、告示では空試験の判定の際、空試験の値が濃度範囲の下限值

(0.0005 mg/L)を下回る必要がある。すべての機関の検量線で空試験を判定することが可能であった。2017年4月1日より告示が改正された結果、空試験における定量下限値の評価対象について、検水の濃度範囲の下限値から検量線の濃度範囲の下限値に変更されている。すべての機関は1次式を用いて検量線を算出していた。原点強制通過を行った機関は存在しなかった。

また、寄与率(R²)の範囲は、フェノール0.9930～1.0000、2-クロロフェノール0.9955～1.0000、4-クロロフェノール0.9922～1.0000、2,4-ジクロロフェノール0.9911～1.0000、2,6-ジクロロフェノール0.9958～1.0000、2,4,6-トリクロロフェノール

0.9930～1.0000と概ね良好であった。

② 前処理及び標準液

フェノール類は72時間以内に試験することが告示に記載されているが、すべての機関は配付後72時間以内に分析操作を開始していた。すべての機関は告示に従い、検水量を500 mLとし、塩酸を用いてpH1.9～2.012に調整していた。希釈率は、1～5倍希釈となっており、すべての機関が告示の濃度範囲及び各機関が用いている検量線の範囲内でフェノール類を定量していた。その他の前処理操作についても、すべての機関が告示に従って実施していた。

告示では、「試薬における標準原液、標準液又は混合標準液は、計量法(平成4年法律第51号)第136条若しくは第144条の規定に基づく証明書又はこれらに相当する証明書(以下この2において「値付け証明書等」という。)が添付され、かつ、次号から第52号までの各号の別表に定める標準原液と同濃度のもの又は同表に定める標準液若しくは混合標準液と同濃度のもの(以下この(1)において「同濃度標準液」という。)を用いることができること」と2016年度から認証付混合標準液の使用が認められるようになった。今調査では、すべての機関が市販の標準原液を使用しており、B-4、B-7、B-10、B-11、B-12、B-13、B-14、B-15の8機関では認証付混合標準液を使用していた。残りの機関においては、認証無しだが告示に定められた標準原液と同濃度の市販品を使用していた。標準原液から標準液の調製時期について、告示では使用の都度調製することになっている。すべての機関は、標準系列を用時調製していた。

③ 妥当性試験

2012年9月6日付で厚生労働省より水道水質検査における妥当性ガイドラインについて通知され、標準検査法においても妥当性試験を行うことが望ましいとされている¹⁷⁾。今調査ではすべての機関が妥当性試験を実施していた。

ま と め

大阪府の水道水質検査外部精度管理事業として、フェノール類の検査結果を「真値」に対する誤差率±20%とZスコアの絶対値3未満を許容範囲とする2つの方法で評価を行った。

報告された 17 検査値の内、変動係数が 20% を超えた機関は存在しなかった。フェノールについて、17 検査値のうち、「真値」に対する誤差率 $\pm 20\%$ を超えたのは 1 機関であった。また、Z スコアの絶対値が 3 以上であったのは 1 機関であった。両方法で許容範囲を超えた検査値を「外れ値」と評価したが、この「外れ値」に該当したのは 1 機関であった。フェノール以外の成分では「外れ値」に該当した機関は存在しなかった。「外れ値」の存在率は、5.88% (1/17) であり、フェノール類に関する外部精度管理は概ね良好な結果であったと考えられる。そして検証の結果、検査精度を向上するためには、以下の留意点が考えられた。

- 1) GC-MS の機種によっては感度が安定するまでに時間を要するため、標準液を繰り返し注入して装置の感度が安定するのを確認してから測定を始めること。

謝 辞

本研究は「平成 28 年度大阪府水道水質検査外部精度管理事業」により実施された。研究実施にあたり協力していただいた大阪府環境衛生課の各位に感謝いたします。

利 益 相 反

開示すべき利益相反はない。

文 献

- 1) 小泉義彦, 宮野啓一. 大阪府水道水質検査外部精度管理結果と分析の留意点-トリハロメタン (平成19年度) -. 大阪府立公衆衛生研究所研究報告 2010; **46**: 75-90.
- 2) 宮野啓一, 小泉義彦, 高木総吉, 安達史恵, 渡邊功. 大阪府水道水質検査外部精度管理結果-陰イオン界面活性剤(平成18年度) -. 大阪府立公衆衛生研究所研究報告 2009; **47**: 81-88.
- 3) 田中榮次, 安達史恵, 渡邊功. 大阪府水道水質検査外部精度管理結果-ナトリウム及びその化合物 (平成19年度) -. 大阪府立公衆衛生

研究所研究報告. 2010; **48**: 50-57.

- 4) 田中榮次, 安達史恵, 小川有理, 吉田直志, 木村直昭, 足立伸一. 大阪府水道水質検査外部精度管理-蒸発残留物(平成21年度) -. 水道協会雑誌 2011; **80**: 12-22.
- 5) 小泉義彦, 宮野啓一, 足立伸一. 大阪府水道水質検査外部精度管理結果と分析の留意点-シス-1,2-ジクロロエチレン及びトランス-1,2-ジクロロエチレン (平成21年度) -. 大阪府立公衆衛生研究所研究報告 2011; **49**: 61-72.
- 6) 小泉義彦, 足立伸一. 大阪府水道水質検査外部精度管理結果と分析の留意点 -1,4- ジオキサン (平成23年度) -. 大阪府立公衆衛生研究所研究報告 2014; **52**: 49-52.
- 7) 小泉義彦, 足立伸一. 大阪府水道水質検査外部精度管理結果と分析の留意点-全有機炭素 (TOC) の量 (平成24年度) -. 大阪府立公衆衛生研究所研究報告 2014; **52**: 53-57.
- 8) 小泉義彦, 足立伸一. 大阪府水道水質検査外部精度管理結果と分析の留意点-ハロ酢酸 (平成26年度) -. 大阪府立公衆衛生研究所研究報告 2016; **54**: 50-58.
- 9) 小泉義彦, 木村明生. 大阪府水道水質検査外部精度管理結果と分析の留意点-ジクロロメタン (平成 27 年度) -. 大阪府立公衆衛生研究所研究報告 2016; **54**: 59-63.
- 10) 吉田仁, 木村明生. 水質検査における外部精度管理 (2015 年) -銅及びその化合物-. 大阪健康安全基盤研究所研究年報 2017; **1**: 15-33.
- 11) 水質基準の見直しにおける検討概要 整理番号 22005 フェノール類 (PDF) . 厚生労働省ホームページ <http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/kenkou/suido/kijun/dl/k42.pdf> . WEB サイトの内容は 2018 年 4 月 26 日に確認した
- 12) 真柄泰基. 水道水質ハンドブック. 日本水道新聞社; 1994. 68-69.
- 13) 上水試験方法解説編 2001 年版. 日本水道協会; 2001. 711-712.
- 14) JIS Z8402-2: 測定方法及び測定結果の精確さ (真度及び精度-第 2 部: 標準測定方法の併行精度及び再現性を求めるための基本的方法. 日本規格協会; 1999.

- 15) 藤井賢三. 試験所認定制度における技能試験 (1). *環境と測定技術* 2000; 27: 51-56.
- 16) 厚生労働省健康局水道課長. 水質基準に関する規定に水質基準に関する省令の規定に基づき厚生労働大臣が定める方法の一部を改正する件、資機材等の材質に関する試験の一部を改正する件並びに給水装置の構造及び材質の基準に係る試験の一部を改正する件等について (健水発 0228 第 1 号, 平成 24 年 2 月 28 日)
- 17) 厚生労働省 (2017) 水道水質検査方法の妥当性評価ガイドラインについて (健水発 0906 第 1 号, 平成 24 年 9 月 6 日, 最終改正 平成 29 年 10 月 18 日)

Results of external quality control on the analytical measures for phenols in tap water, performed in 2016 in Osaka Prefecture

Jin YOSHIDA and Yoshihiko KOIZUMI

In Osaka Prefecture, external quality control on analytical measures for tap water has been implemented since 1993, collaborated with water supply corporations, public health centers and institutes of public health (referred as water supply corporation etc.). Seventeen water supply corporation etc. participated in the external quality control on analytical measure of phenols in 2016. As a result, one water supply facility was evaluated as an outlier. We executed the follow up survey for the facility and retesting was performed. In conclusion, after unfolding and correcting the causes, the facility obtained the accurate results in retesting.

Key words : drinking water, external quality control, phenols

水質検査における外部精度管理 (2016 年度)

—亜硝酸態窒素および塩化物イオン—

安達史恵, 高木総吉

水道水質検査精度の向上を図ることを目的に、大阪府内水道事業者、保健所、地方衛生研究所（以下、水道事業者等）31 機関を対象に、外部精度管理を実施した。対象項目は無機項目として亜硝酸態窒素及び塩化物イオンを選定した。その結果、亜硝酸態窒素では 2 機関、塩化物イオンでは 1 機関が「外れ値」となった。「外れ値」となった機関に対してはフォローアップ調査を実施し、「外れ値」の原因を究明後、再測定による分析精度の確認を行った。

キーワード：水道水、外部精度管理、亜硝酸態窒素、塩化物イオン

大阪府水道水質検査外部精度管理事業は、水道水質検査精度の向上を図ることを目的として 1993 年度より大阪府内水道事業者、保健所、地方衛生研究所（以下、水道事業者等）を対象に実施している^{1,2)}。

2016 年度の対象項目は、無機項目として「亜硝酸態窒素」及び「塩化物イオン」を選定した。亜硝酸態窒素は無機肥料の使用、腐敗した動植物、家庭排水、下水等に由来している。これらに含まれる窒素化合物が、水や土壌で化学的・微生物学的に酸化還元を受け、アンモニア態窒素、亜硝酸態窒素及び硝酸態窒素となる。亜硝酸態窒素は分解過程の生成物であり、硝酸態窒素より低濃度であるが、自然界に広く存在している³⁾。ヒトにおける亜硝酸態窒素の毒性は次の 2 点が重要である。第 1 に、血液中のヘモグロビンと反応して、メトヘモグロビン血症を起こすこと、第 2 に第 2 級、第 3 級のアミドやアミンと反応し、発がん性のニトロソアミンを生成することである。亜硝酸態窒素の水道水質基準は、硝酸態窒素とともに水の汚染の指標として「硝酸態窒素及び亜硝酸態窒素の合計量で 10 mg/L 以下であること」されてきたが、2014 年の「水質基準に関する省令」（平成 15

年厚生労働省令第 101 号）の改正で新たに水質基準項目として追加され、基準値は「0.04 mg/L 以下であること」と規定された⁴⁾。

一方、塩化物イオンは、水中に溶解している塩化物中の塩素分をいう。塩化物はナトリウム塩 (NaCl)、カリウム塩 (KCl)、カルシウム塩 (CaCl₂) 等として自然界に広く存在している。水中の塩化物イオンとしては、天然由来のものが多く、通常の表流水中では一般に数～数十 mg/L 程度であるが、常態より増加した場合は、生活排水、工場排水等の混入汚染が考えられる。また、水道水中の塩化物イオンは、凝集剤のポリ塩化アルミニウムや消毒剤である次亜塩素酸ナトリウム、塩素の使用により増加する⁵⁾。

1958 年の水質基準に関する省令（厚生省令第 23 号）で塩化物イオンとして「200 mg/L 以下であること」とされ、これ以降変更はないが、この基準値は汚染の指標ではなく、味覚という観点から定められている。塩化物イオンはイオンクロマトグラフで測定する場合、亜硝酸イオンとピークが近接しているため、両物質の分離が悪いと亜硝酸態窒素の定量に影響を与える。したがって亜硝酸態窒素とともに対象項目とした。

調 査 方 法

1. 参加機関

本調査に参加した水道事業者等は、「亜硝酸態窒素」は 29 機関、塩化物イオンは 31 機関であった。

2. 実施方法

2-1. 精度管理試料の調製方法

2016 年 9 月 23 日に精製水約 22 L をポリタンクに採水し、亜硝酸態窒素標準液（和光純薬、1000 mg/L）を 660 μ L、塩化物イオン標準液（和光純薬、1000 mg/L）を 253 mL 添加し、攪拌した。なお、精製水中の両イオンはいずれも定量下限値未満であった。その後、250 mL または 1 L のポリエチレン製瓶に分注して冷蔵保管した後、9 月 28 日に大阪健康安全基盤研究所上水試験室において各検査実施機関に配付した。

2-2. 精度管理試料の均一性及び安定性

精度管理試料を分注順に等間隔で 5 本抜き取って測定したところ、試料間の変動係数は、亜硝酸態窒素は 1.31%、塩化物イオンは 0.29% であった。

また、調製後 1, 3, 7, 10, 14 日後まで測定した結果、両イオンともに近似直線の傾きはほぼ 0 で安定性に問題ないことを確認した（図 1）。

2-3. 試料の測定方法

検査方法は「水質基準に関する省令の規定に基づき厚生労働大臣が定める方法」の別表 13 イ

オンクロマトグラフ（陰イオン）による一斉分析法、別表 16 の 2 イオンクロマトグラフ法、及び別表 21 滴定法（塩化物イオンのみ）とした。配布試料については前処理を含めて 5 回の測定を行い、その平均値を検査値として「外部精度管理結果報告書」で報告することとした。「外れ値」に該当した機関に対してフォローアップ調査を実施した。

2-4. 評価の検証方法

検査結果は、「真値」に対する誤差率（以下、誤差率）および Z スコアで評価を行い、両方の評価方法において許容範囲を超過した検査値を「外れ値」とした。「真値」は、各機関からの検査値を用いて、有意水準を 5% として Grubbs の棄却検定を行い、棄却された検査値を除いた検査値から平均を求め、これを「真値」とした。誤差率は、以下の式から算出し、 $\pm 10\%$ 以内を許容範囲とした。

誤差率(%)

$$= ([各 機 関 の 検 査 値] - [真 値]) / [真 値] \times 100$$

Z スコアは四分位数法で算出し⁶⁾、Z スコアの絶対値 3 未満を許容範囲とした。なお、各機関内で測定された精度管理試料の変動係数が 10% を超過した機関の検査値は評価対象外とした。

結 果 お よ び 考 察

1. 分析方法

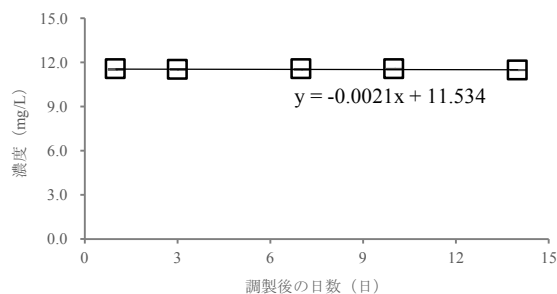
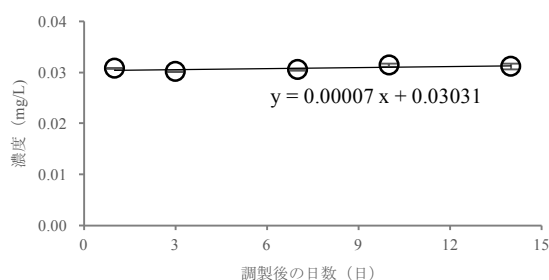


図 1 精度管理試料の安定性 左図：亜硝酸態窒素 右図：塩化物イオン
(n = 3、平均 \pm 標準偏差)

各機関が用いた試験方法は、亜硝酸態窒素ではイオンクロマトグラフ（陰イオン）による一斉分析法が 25 機関、イオンクロマトグラフ法が 4 機関であった。一方、塩化物イオンでは、イオンクロマトグラフ（陰イオン）による一斉分析法が 27 機関、イオンクロマトグラフ法が 2 機関、滴定法が 2 機関であった。

2. 検査結果の検証

2-1. 誤差率、Zスコア及び「外れ値」

(1) 亜硝酸態窒素

水道事業者等 29 機関から報告された検査値、変動係数、誤差率及び Zスコアを表 1 に、Zスコアの度数分布を図 2 に示す。機関内変動係数が 10% を超過した機関は存在せず、すべての機関を評価対象とした。「真値」を算出するため、検査値を有意水準 5% で Grubbs の棄却検定を行った。その結果、棄却された検査値はなく、すべての検査値を平均した 0.0307 mg/L を「真値」とした。「真値」に対する誤差率の許容範囲を超えたのは 2 機関（A-10、A-19）であった。一方、Zスコアを求めた結果、Zスコアの範囲は-3.70~3.72 となり、許容範囲を超えたのは 2 機関（A-10、A-19）であった。誤差率と Zスコアとの両方の許容範囲を超えた検査値を「外れ値」と評価したが、この「外れ値」に該当した機関は 2 機関（A-10、A-19）であった。

(2) 塩化物イオン

31 機関から報告された検査値、変動係数、誤差率及び Zスコアを表 1 に、Zスコアの度数分布を図 3 に示す。機関内変動係数が 10% を超過した機関は存在せず、すべての機関を評価対象とした。「真値」を算出するため、検査値を有意水準 5% で Grubbs の棄却検定を行った。その結果、2 つの検査値が棄却されたため、残りの 29 の検査値を平均した 11.8 mg/L を「真値」とした。「真値」に対する誤差率の許容範囲を超えたのは 1 機関（A-31）であった。一方、Zスコアを求めた結果、Zスコアの範囲は-1.11~10.93 となり、許容範囲を超えたのは 2 機関（A-30、A-31）であった。したがって「外れ値」に該当した機関は 1 機関（A-31）であった。

2-2. フォローアップ調査

(1) 亜硝酸態窒素

① 機関 A-10

機関 A-10 の検査値は 0.0274 mg/L、Zスコアは-3.70、「真値」に対する誤差率は-10.94%であった。

聞き取り調査により、使用していたカラムが使用不能になったが、新しいカラムがなかったため、保管していた古いカラムを使用し測定を行ったことから亜硝酸イオンと塩化物イオンとの分離が不良であったことが明らかとなった。当該機関における「外れ値の原因究明に関する報告書」によると、新しいカラムを用いて、精度管理試料と同程度の濃度の試料を測定したところ、分離がよくなり、回収率も良好であった。

今回のフォローアップの結果、「外れ値」の原因は、劣化したカラムを使用した結果、対象イオンの分離が悪く、正確に定量できていなかったことによるものであった。

② 機関 A-19

機関 A-19 は、検査値は 0.0342 mg/L、Zスコアは 3.72、「真値」に対する誤差率は 11.24%であった。提出された資料をもとに、外れ値となった原因について検討したところ、検量線の濃度範囲が亜硝酸態窒素として 0.00243~0.01216 mg/L であり、試料の濃度を外挿して算出していたことが明らかとなった。そこで、上記の点に注意するよう指導後、再調査を実施した。再調査は、新たに試料を配布し実施した。新しく設定した検量線の濃度範囲は亜硝酸態窒素として 0.004~0.08 mg/L であり、設定濃度 0.0300 mg/L に対し、検査値 0.0298 mg/L 変動係数 1.6%、誤差率-0.5%であり、良好な結果となった。

今回のフォローアップの結果、「外れ値」の原因は不適切な濃度範囲の検量線を用いて、外挿して定量していたことによるものであった。

(2) 塩化物イオン

機関 A-31 の検査値は 15.0 mg/L、Zスコアは 10.93、「真値」に対する誤差率は 26.74%であった。当該機関の測定方法は滴定法であった。提出された資料をもとに外れ値となった原因について検討したところ、次の 2 点の問題があった。

表1 各機関の結果

機関番号	亜硝酸態窒素				塩化物イオン			
	検査値 (mg/L)	変動係数* (%)	誤差率* (%)	Zスコア*	検査値 (mg/L)	変動係数* (%)	誤差率* (%)	Zスコア*
A-1	0.0317	7.70	2.98	0.96	11.5	0.39	-2.74	-1.11
A-2	-	-	-	-	11.5	2.17	-2.74	-1.11
A-3	0.0314	1.11	2.20	0.70	11.5	0.61	-2.57	-1.04
A-4	0.0300	0.49	-2.35	-0.83	11.5	0.00	-2.57	-1.04
A-5	0.0317	2.14	3.11	1.00	11.5	1.31	-2.24	-0.90
A-6	0.0288	2.79	-6.32	-2.15	11.5	1.16	-2.24	-0.90
A-7	0.0308	0.93	0.12	0.00	11.6	0.00	-1.73	-0.69
A-8	0.0311	0.74	1.03	0.30	11.6	0.86	-1.73	-0.69
A-9	0.0328	1.25	6.62	2.18	11.6	0.38	-1.56	-0.62
A-10	0.0274	3.07	-10.94	-3.70	11.6	0.72	-1.56	-0.62
A-11	0.0297	1.74	-3.46	-1.20	11.6	1.30	-1.39	-0.55
A-12	0.0306	0.49	-0.34	-0.15	11.7	0.47	-0.54	-0.21
A-13	0.0313	0.29	1.68	0.52	11.7	0.47	-0.54	-0.21
A-14	0.0302	1.89	-1.83	-0.65	11.8	0.00	-0.03	0.00
A-15	0.0308	0.56	0.18	0.02	11.8	0.00	-0.03	0.00
A-16	0.0304	0.18	-0.99	-0.37	11.8	0.00	-0.03	0.00
A-17	0.0306	2.79	-0.53	-0.22	11.8	0.38	0.14	0.07
A-18	0.0311	0.42	1.22	0.37	11.9	0.38	0.98	0.42
A-19	0.0342	2.09	11.24	3.72	11.9	0.46	1.15	0.48
A-20	0.0305	0.29	-0.66	-0.26	11.9	0.46	1.15	0.48
A-21	0.0280	0.93	-8.79	-2.98	12.0	0.37	1.49	0.62
A-22	0.0309	0.00	0.51	0.13	12.0	0.00	1.66	0.69
A-23	0.0302	0.15	-1.70	-0.61	12.0	0.00	1.66	0.69
A-24	0.0321	1.47	4.54	1.48	12.0	0.00	1.66	0.69
A-25	0.0304	1.26	-0.99	-0.37	12.0	0.91	1.83	0.76
A-26	0.0317	0.76	3.24	1.04	12.0	0.45	2.00	0.83
A-27	0.0314	1.18	2.07	0.65	12.1	0.00	2.51	1.04
A-28	0.0302	1.42	-1.90	-0.67	12.2	1.53	3.36	1.38
A-29	0.0324	1.92	5.52	1.81	12.4	0.72	4.71	1.94
A-30	0.0291	1.29	-5.35	-1.83	12.7	2.03	7.76	3.18
A-31	-	-	-	-	15.0	0.90	26.74	10.93
平均値	0.0307				11.9			
最大値	0.0342				15.0			
最小値	0.0274				11.5			
標準偏差	0.00137				0.628			
変動係数(%)	4.5				5.3			
n	29				31			

-: 不参加

真値: 0.0307 mg/L (亜硝酸態窒素), 11.8 mg/L (塩化物イオン)

* 検査値(n=5の平均値)を丸めずに算出

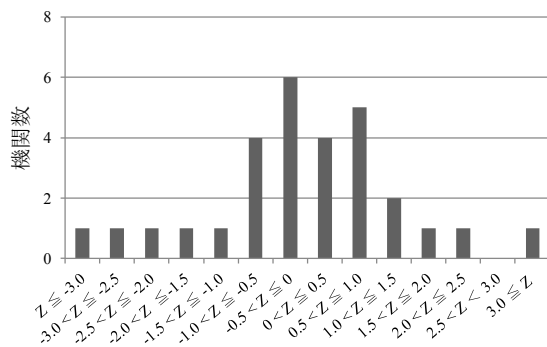


図2 Zスコアの度数分布（亜硝酸態窒素）

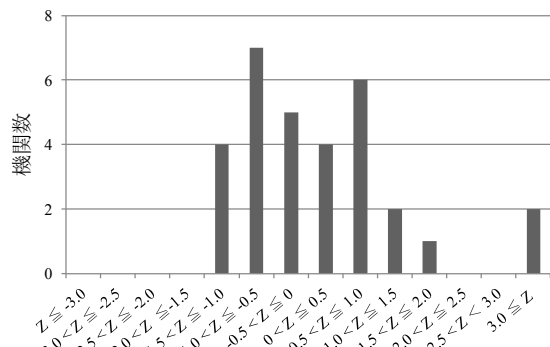


図3 Zスコアの度数分布（塩化物イオン）

- ・0.01 mol/L 硝酸銀溶液のファクターを求めている。
- ・精製水を用いた補正を実施していない。

そこで、聞き取り調査を実施し、前述の2点を実施するよう指導した。その後、水道水を用いて複数回測定し、操作に問題がないことを確認した後、再調査を実施した。

再調査は、新たに試料を配布し実施した。設定値 11.5 mg/L に対し、検査値 10.5 mg/L、変動係数 2.1%、誤差率 9.0%であった。

今回のフォローアップの結果、外れ値の原因は告示法通りに検査を実施していなかったこと、すなわち、ファクターを求めていなかったこと及び補正を行っていないことに起因していることが明らかとなった。今回の結果を受けて、機関 A-31 において、告示法に準拠した標準作業手順書（SOP）に改定された。

2-3. 全体的な留意点

2-3.1 検量線

(1) 亜硝酸態窒素

告示では別表に記載された濃度範囲内で4段階以上の標準液を用いて検量線を作成するように記載されている⁷⁾。イオンクロマトグラフ法における亜硝酸態窒素の濃度範囲は 0.004~0.4 mg/L である。今回、すべての機関において、検量点を4点以上用いて検量線を作成していた。一方、検量点に 0 mg/L を用いていた機関が1機関（A-21）あった。また、最も高濃度の検量点が告示の範囲を超えている機関はなかった。告示では空試験の判定の際、空試験の値が検量線の下限値を下回る必要があると記載されている。

亜硝酸態窒素は基準値が 0.04 mg/L であり、その 1/10 値の 0.004 mg/L まで測定することが求められる。したがって、0.004 mg/L を検量点に含める必要がある。しかし A-5、A-6 及び A-20 の機関では検量線の下限值が 0.01 mg/L 以上であった。ただし、A-6 においては、別途 0.004 mg/L の点を確認しているという記載があった。残りの2機関については、検量線の最小点を 0.004 mg/L 以下に設定し、空試験の評価を行う必要がある。所定の是正措置を講じたにもかかわらず、空試験の値が検量線の下限値を下回ることができなかった場合に限り、定量下限値の見直しを行った後、空試験の判定基準の見直しを行うこととされている^{8,9)}。一方、すべての機関で1次式を用いて検量線を算出しており、原点強制通過を行った機関が1機関（A-6）あった。また、寄与率（ R^2 ）の範囲は、0.9910~1.0000 であった。

(2) 塩化物イオン

イオンクロマトグラフ法における塩化物イオンの濃度範囲は 0.2~20 mg/L である。今回、すべての機関において、検量点を4点以上用いて検量線を作成していた。一方、検量点に 0 mg/L を用いていた機関が1機関（A-21）あった。最も高濃度の検量点が告示の範囲を超えている機関が1機関（A-19）あった。

各機関の定量下限値が、検量線の下限値より低い機関が10機関あり、空試験の判定ができていないと考えられたが、3機関（A-8、A-23、A-24）においては、別途 0.2~2.0 mg/L の検量線を用いて、空試験の判定をしていた。残りの機関は、設定の検量線濃度範囲では定量下限及び空試験を判定することが不可能であるため、

改善が必要であると考えられた。

一方、すべての機関で1次式を用いて検量線を算出しており、原点強制通過を行った機関が1機関(A-6)あった。また、寄与率(R^2)の範囲は、0.9960~1.0000であった。

2-3.2 前処理及び標準液

(1)亜硝酸態窒素

①前処理

エチレンジアミン溶液の添加は別表13では亜硝酸態窒素を測定しない、かつ残留塩素がない場合に省略可能であるが、別表16の2では省略不可である。本調査では、別表16の2を用いている4機関のうち2機関(A-3、A-30)で、残留塩素が入っていないことを理由に省略していた。また前処理として、ろ過操作を行うこととされているが、4機関(A-3、A-5、A-6及びA-7)において、実施されていなかった。ろ過操作は省略不可であるため、SOPの改善が必要である。また、ろ過時の最初の廃液量が告示の約10 mLを下回っている機関が2機関(A-16、A-19)あった。

②標準液

すべての機関で市販標準液を使用し、1機関のみ告示における調製可能標準液に該当する混合標準液を使用していた。また、1機関(A-5)で保証期限が過ぎた標準液を使用していた。標準系列について、用時調製することとされているが、1機関(A-20)のみ調製時期が1週間以内であった。

(2)塩化物イオン

①前処理(イオンクロマトグラフ法)

別表16の2を用いている2機関とも、エチレンジアミン溶液は適切に添加されていた。

②標準液(イオンクロマトグラフ法)

今調査ではすべての機関で市販標準液(1000 mg/L、認証付き)を使用し、1機関のみ混合標準溶液を使用していた。1機関(A-5)で保証期限が過ぎた標準原液を使用していた。標準系列について、用時調製することとされているが、1機関(A-20)のみ調製時期が1週間以内であった。

2-3.3 妥当性評価

平成24年9月6日付で厚生労働省より水道

水質検査における妥当性ガイドラインについて通知され、標準検査方法については、妥当性試験を行うこととされている⁸⁾。本調査では亜硝酸態窒素では6機関、塩化物イオンでは4機関が実施していなかった。

ま と め

大阪府の水道水質検査外部精度管理として、検査結果を「真値」に対する誤差率 $\pm 10\%$ とZスコアの絶対値3未満を許容範囲とする2つの方法で評価を行った。

亜硝酸態窒素では、報告された29検査のうち、変動係数が10%を超えた機関は存在しなかった。29検査値のうち、「真値」に対する誤差率 $\pm 10\%$ を超えたのは2機関であった。また、Zスコアの絶対値が3以上となったのは2機関であった。両方法で許容範囲を超えた検査値を「外れ値」と評価したが、この「外れ値」に該当したのは2機関であった。「外れ値」の存在率は、6.9%(2/29)であり、亜硝酸態窒素に関する外部精度管理は概ね良好な結果であったと考えられた。

一方、塩化物イオンでは、報告された31検査値のうち、変動係数が10%を超えた機関は存在しなかった。31検査値のうち、「真値」に対する誤差率 $\pm 10\%$ を超えたのは1機関であった。また、Zスコアの絶対値が3以上となったのは2機関であった。両方法で許容範囲を超えた検査値を「外れ値」と評価したが、この「外れ値」に該当したのは1機関であった。「外れ値」の存在率は3.2%(1/31)であり、塩化物イオンに関する外部精度管理は概ね良好な結果であったと考えられた。

なお、「外れ値」等の原因および報告書の添付資料を検証した結果、検査精度を維持・向上する上で、次の留意点が考えられた。

- 1) イオンクロマトグラフ法においては、前処理(試薬の添加、ろ過操作)および検量線の濃度範囲等、告示から逸脱しない方法でSOPを整備すること。またカラム等の消耗品は予備を備えておくこと。
- 2) 滴定法においては、精製水による補正等、告示から逸脱しない方法でSOPを整備すること。

謝 辞

本研究は「平成 28 年度大阪府水道水質検査外部精度管理」により実施された。研究実施にあたり協力していただいた大阪府環境衛生課の各位に感謝いたします。

利 益 相 反

開示すべき利益相反はない

文 献

- 1) 安達史恵, 吉田仁, 高木総吉, 小泉義彦, 中島孝江, 田中榮次, 山本友梨子, 廣瀬正晃, 島野元伸, 土屋誠, 足立伸一.大阪府における精度管理基礎研修の実施. *水道協会雑誌* 2016; **85**(11): 10-16.
- 2) 小泉義彦, 木村明生. 大阪府水道水質検査外部精度管理結果と分析の留意点-ジクロロメタン (平成 27 年度) -, *大阪府立公衆衛生研究所研究報告* 2016; **54**: 59-63.
- 3) 上水試験方法解説編 2001 年版.日本水道協会; 2001. 278-282.
- 4) 厚生労働省.「水質基準に関する省令等の一部を改正する省令」(平成 26 年 2 月 28 日厚生労働省令第 15 号)
- 5) 上水試験方法解説編 2001 年版. 日本水道協会; 2001. 258-260.
- 6) 藤井賢三. 試験所認定制度における技能試験 (1). *環境と測定技術* 2000; **27**(2): 51-56.
- 7) 厚生労働省.「水質基準に関する省令の規定に基づき厚生労働大臣が定める方法」(平成 15 年 7 月 22 日厚生労働省告示第 261 号 (最終改正平成 30 年 3 月 28 日))
- 8) 厚生労働省. 水道水質検査方法の妥当性評価ガイドライン. (平成 24 年 9 月 6 日付健水発 0906 第 1 号 (最終改正平成 29 年 10 月 18 日付薬生水発 1018 第 1 号))
- 9) 厚生労働省. 検査方法告示における空試験取扱について. (事務連絡,平成 25 年 3 月 6 日)

**Results of External Quality Control on the Analytical Measures for Nitrite nitrogen and Chloride ion
in Tap Water, Performed in 2016 in Osaka Prefecture**

Fumie ADACHI and Sokichi TAKAGI

In Osaka Prefecture, external quality control on the analytical measures for tap water has been implemented since 1993, collaborated with water supply corporations, public health centers and institutes of public health. Thirty-one facilities participated in the external quality control on analytical measure in 2016. As a result, two facilities (for Nitrite nitrogen) and one facility (for Chloride ion) were evaluated as outliers. After executing the follow up survey for these facilities, retests were also performed. In conclusion, these facilities obtained accurate results.

Key words: external quality control, tap water, nitrite nitrogen, chloride ion

水質検査における外部精度管理 (2017 年度)

—大阪府建築物飲料水水質検査業—

中島孝江, 安達史恵, 小泉義彦

当所では 2015 年度より (一社) 大阪ビルメンテナンス協会からの受託研究により、大阪府において建築物飲料水水質検査業の登録を受けている事業所を対象に外部精度管理を実施している。2017 年度の対象項目は無機項目として「鉛およびその化合物」、有機項目として「有機物 (全有機炭素 (TOC) の量)」を選定した。それぞれ 18 機関および 16 機関の参加を得て実施した結果、それぞれ 3 及び 2 機関が「外れ値」となった。「外れ値」となった機関についてフォローアップ調査を行い、鉛ではガラス容器への吸着による濃度低下や前処理での硝酸添加忘れ、TOC では精製水の濃度が高いことや不適切な定量計算方法が原因であることが判った。

キーワード：水道水、外部精度管理、鉛、TOC、建築物飲料水水質検査業

当所では 2015 年度より「建築物における衛生的環境の確保に関する法律」第 12 条の 2 第 1 項に規定の「建築物飲料水水質検査業」の大阪府知事登録を受けている事業所を対象に、検査精度の向上と信頼性及び安全性のより一層の確保を目的として、(一社) 大阪ビルメンテナンス協会からの受託研究により、外部精度管理を実施している¹⁾。

2017 年度の対象項目は無機項目として「鉛およびその化合物」、有機項目として「有機物 (全有機炭素 (TOC) の量)」を選定した。

鉛は、地質、工場排水、鉱山廃水に由来して河川中に溶存することがある。また、種々の工業製品中に添加物、不純物として含まれているため、環境中に広く分布している^{2,3)}。水道水中に検出される鉛は、軟水や pH 値の低い水において、使用している鉛管からの溶出に由来する場合がほとんどであるが、給水栓水中の鉛濃度は、鉛管が使用されている場合であっても、滞留水でなく流水であれば 0.05 mg/L を超えることはほとんどない³⁾。

ヒトの健康影響については、鉛の標的組織は、中枢及び末梢の神経組織と腎臓で、血液中の鉛

濃度 50~80 µg/dl 程度で疲労感、不眠、頭痛、関節痛や消化管障害の症状がみられ、100~200 µg/dl 程度で脳炎、腎臓障害が起こる^{3,4)}。発がん性評価は国際がん研究機構では 2B (ヒトに対する発癌性が疑われる) に分類されている³⁾。

水質基準について、世界保健機構は、子供に対する影響や各種の条件と安全性を考慮して、ガイドライン値 0.01 mg/L を勧告している^{3,4)}。わが国の基準値は 2003 年に 0.05 mg/L 以下から 0.01 mg/L 以下に改められ、以降変更されていない^{3,4)}。

TOC は、環境水中に含まれる有機物質濃度の指標であるが、これは主に土壌に由来するフミン質、し尿・下水及び工場排水の流入、湖沼におけるプランクトンの異常増殖等に影響され、その上昇は水道水における異臭味問題や消毒副生成物量増加等の水質悪化の要因とされている。

水中の有機物質量の指標として長年にわたり過マンガン酸カリウム消費量が用いられてきた。しかし、水中に存在する有機炭素化合物の被酸化性により変動する等、有機物質を正しく評価できていない、個人差が大きい、あるいは

大阪健康安全基盤研究所衛生化学部生活環境課

精度が悪い等の観点から不適切であるとされ、見直しが図られた⁵⁾。その結果、2004年4月に水道水質基準として過マンガン酸カリウム消費量に代わり、全有機炭素（TOC）の量として「5 mg/L 以下」が施行された⁶⁾。

その後、第6回厚生科学審議会生活環境水道部会において、過マンガン酸カリウム消費量 10 mg/L に対応する TOC の量は 3~4 mg/L 程度であること、トリハロメタン対策の観点から 3 mg/L 程度以下にすることが必要とされたことから、2009年4月より TOC の量で「3 mg/L 以下」に基準値が強化された⁷⁾。

調査方法

1. 実施項目

無機項目として「鉛およびその化合物」（鉛）、有機項目として「有機物（全有機炭素（TOC）の量）」を選定した。

2. 参加機関

参加した登録水質検査業者は、鉛が 18 機関、TOC が 16 機関であった。

3. 精度管理試料の調製方法

(1) 鉛

2017年9月11日から9月15日にかけて精製水約 100 L をポリタンクに採水した後、硝酸濃度が 1% になるように硝酸（和光純薬、超微量金属測定用）を添加した。9月25日に鉛標準液（和光純薬：1003 mg/L）を 400 μL 添加した後に攪拌し、1L のポリエチレン瓶に分注した。なお、標準液添加前の精製水中の鉛は 0.0002 mg/L 未満で試料調製用の精製水として問題なかった。

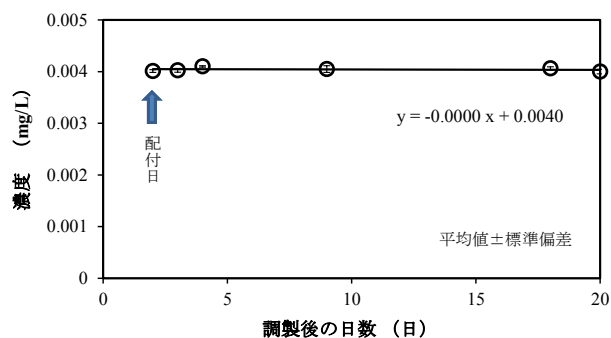


図1 精度管理試料の経時変化（鉛）

(2) TOC

2017年9月21日に精製水約 30 L をステンレスタンクに採水し、フタル酸水素カリウム（和光純薬、容量分析用標準物質）を用いて調製した TOC 標準原液（1000 mg/L）を 36 mL 添加した後に攪拌し、500 mL のポリエチレン瓶に分注した。なお、標準原液添加前の精製水中の TOC は 0.1 mg/L 未満で試料調製用の精製水として問題なかった。

4. 精度管理試料の均一性及び安定性

精度管理試料のばらつきを把握するため、以下の検討を行った。なお、各項目の分析は、水質基準に関する省令の規定に基づき厚生労働大臣が定める方法⁸⁾（告示法）に従い、鉛は誘導結合プラズマ質量分析装置による一斉分析法（ICP-MS）、TOC は全有機炭素計測定法で行った。

(1) 均一性

精度管理試料を分注順に等間隔で 5 本抜き取って測定し、変動係数を求め、均一性を評価したところ、5 試料の試料間の変動係数は、鉛では 1.29 %、TOC では 2.48 %であった。

(2) 安定性

告示法では試料を速やかに試験できない場合、冷暗所に保存し、鉛では 2 週間以内に、TOC では 72 時間以内に試験することとしている。そこで、冷暗所に保存していた試料を、鉛は調製後 20 日までに 6 回、TOC は調製後 11 日までに 7 回、1 本抜き取り、毎回 5 回測定し、平均値の近似直線を求め、安定性を評価した。

その結果、鉛では近似直線の傾きは -0.0000（図1）、TOC では 0.0018 となり（図2）、いずれもほぼ 0 で安定性に問題がないことが確認された。

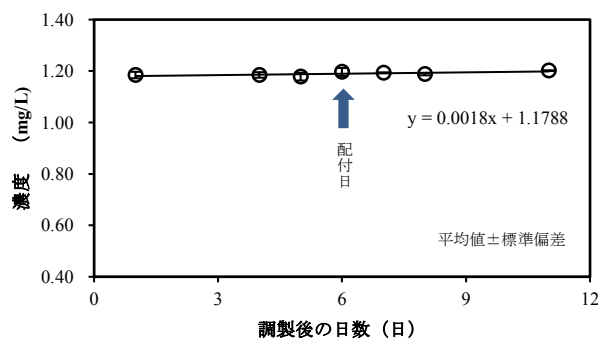


図2 精度管理試料の経時変化（TOC）

5. 実施方法

(1) 配付方法

2017年9月27日に大阪健康安全基盤研究所上水試験室において参加機関に配付した。

(2) 分析方法

鉛は告示法のフレームレス原子吸光光度計による一斉分析法 (FLAA 法) (別表第3)、誘導結合プラズマ発光分光分析装置による一斉分析法 (ICP-AES 法) (別表第5) および ICP-MS 法 (別表第6)、TOC は全有機炭素計測定法 (別表第30) とした。

配付試料については前処理を含めて5回の測定を行うこととした。

(3) 報告書等の提出

5回の測定値の平均を検査値とし、結果を「外部精度管理検査結果報告書」にて報告し、標準作業手順書 (SOP)、分析チャート、検量線、分析に係るメモ等の資料も合わせて提出することとした。

(4) 評価の検証方法

報告された検査値 (n=5) の変動係数は鉛では10%を、TOCでは20%を許容範囲⁹⁾とし、許容範囲を超えたものについては外部精度管理の評価の対象外とした。

検査結果は「真値」に対する誤差率とZスコアの2つの方法で評価し、両方法で許容範囲を超えた検査値を「外れ値」とした。

「真値」は、各機関からの検査値を用いて、有意水準を5%として Grubbs の棄却検定¹⁰⁾を行い、棄却された検査値を除いた検査値から平均を求め、これを「真値」とした。

誤差率は、以下の式から算出し、鉛は±10%を、TOCは±20%を許容範囲とした。

$$\text{誤差率(\%)} = (\text{各機関の検査値} - \text{真値}) / \text{真値} \times 100$$

Zスコアは四分位数法¹¹⁾で算出し、Zスコアの絶対値3未満を許容範囲とした。

(5) フォローアップ調査

「外れ値」の原因の把握と分析精度の改善を目的に、該当した機関に対してフォローアップ調査を実施した。調査は、「外部精度管理に係る外れ値等に関する報告書」の提出後、すでに提出された「外部精度管理検査結果報告書」やその他の資料を精査し、電話あるいはメール

による聞き取り等によって行った。

結果 および 考察

1. 検査結果の検証

(1) 鉛

① 誤差率、Zスコア及び「外れ値」

各検査機関の検査値、変動係数、誤差率及びZスコアを表1に示す。また、分析法別の検査値の度数分布を図3に示す。

5つの検査値の変動係数が10%を超えた機関は存在しなかったため、18検査値を用いて評価を行った。検査値を有意水準5%で Grubbs の棄却検定を行った結果、棄却された機関は存在しなかったため、18検査値を平均した0.00439 mg/Lを「真値」とした。「真値」に対する誤差率の範囲は-11.7~30.2%となり、許容範囲を超えたのは

表1 検査機関の測定結果 (鉛)

機関番号	検査値 (mg/L)	変動係数 (%)	真値に対する誤差率 (%)	Zスコア	
A-1	*	0.00388	3.36	-11.7	-0.77
A-2		0.00400	1.14	-9.05	-0.42
A-3		0.00400	5.86	-8.96	-0.41
A-4		0.00400	3.06	-8.96	-0.41
A-5		0.00407	2.46	-7.45	-0.20
A-6		0.00407	1.46	-7.32	-0.19
A-7		0.00409	0.204	-6.86	-0.12
A-8		0.00410	0.588	-6.77	-0.11
A-9		0.00411	1.23	-6.41	-0.06
A-10		0.00415	5.17	-5.45	0.06
A-11		0.00418	2.20	-4.81	0.15
A-12		0.00420	1.30	-4.45	0.20
A-13		0.00430	0.465	-2.13	0.51
A-14		0.00458	1.32	4.25	1.36
A-15		0.00482	6.47	9.71	2.09
A-16	**	0.00533	3.94	21.4	3.66
A-17	**	0.00548	2.38	24.7	4.11
A-18	**	0.00572	1.72	30.2	4.84
平均値		0.00439			
最大値		0.00572			
最小値		0.00388			
標準偏差		0.000563			
変動係数 (%)		12.8			
n		18			

真値：0.00439 mg/L

*：真値に対する誤差率が±10%を超えた機関

**：真値に対する誤差率が±10%を超え、かつZスコアの絶対値が3以上の機関 (外れ値)

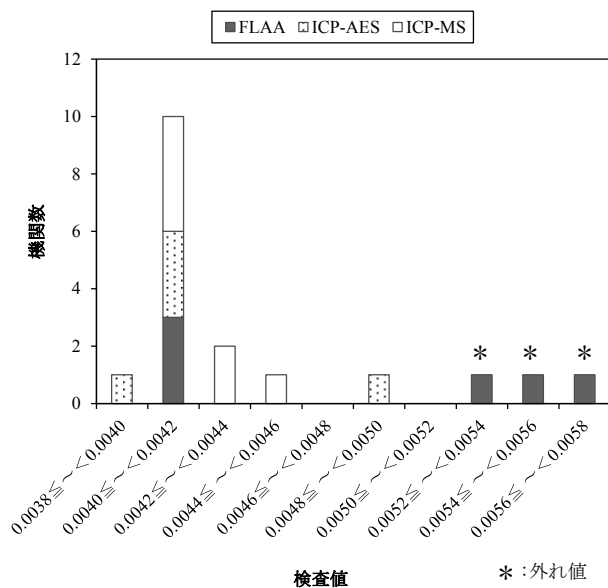


図3 検査値の度数分布 (鉛)

4 機関 (A-1、A-16、A-17、A-18) であった。一方、18 検査値を用いて Z スコアを求めた結果、Z スコアの範囲は-0.77~4.84 となり、Z スコアが許容範囲を超えたのは 3 機関 (A-16、A-17、A-18) であった。

以上の結果、誤差率及び Z スコアの両方の許容範囲を超えた「外れ値」に該当する機関は 3 機関で、全体の 17% となった。「外れ値」となった 3 機関 (A-16、A-17、A-18) に対してフォローアップ調査を行った。

② フォローアップ調査

機関 A-16

機関 A-16 は、FLAA 法を用いており、検査値 0.00533 mg/L、誤差率 21.4%、Z スコア 3.66 であった。標準液の吸光度が測定日によって大きく異なっていることが聞き取り調査で分かった。この原因として鉛にはガラスに吸着しやすい性質があるため¹²⁾、標準液調製過程におけるガラス容器への吸着が疑われた。吸着防止のため、容器をポリプロピレン製に変更し、希釈に 1% 硝酸溶液を使用して標準液を調製し、1 週間に 3 回測定したところ、吸光度に大きな変動はみられなくなった。そこで、精度管理試料の再測定を行ったところ、検査値は 0.00425 mg/L と真値に近い値となり、問題のない検査値となった。

したがって「外れ値」の原因は、希釈段階で容器に鉛が吸着し標準液の濃度が設定値より低

くなったことであるとわかった。

機関 A-17

機関 A-17 は、FLAA 法を用いており、検査値 0.00548 mg/L、誤差率 24.7%、Z スコア 4.11 であった。提出資料によると、標準液 (0.01 mg/L) の硝酸濃度が 0.001% となっており、標準液の硝酸濃度が低いことによる容器への鉛の吸着がおきている可能性が考えられた。標準液の硝酸濃度を 1% に変更して測定したところ、検査値は 0.00399 mg/L と真値に近い値となり、問題のない検査値となった。

「外れ値」の原因は、標準液の硝酸濃度が不十分であったため鉛の容器への吸着が起り、濃度が設定値より低くなったことであるとわかった。

機関 A-18

機関 A-18 は、FLAA 法を用いており、検査値 0.00572 mg/L、誤差率 30.2%、Z スコア 4.84 であった。「外れ値」の報告書によると、試料の前処理時に硝酸を添加し忘れたことが原因として考えられるとのことであった。硝酸を告示法で定められている 10% になるように添加して前処理を行って測定し、検査値は 0.00417 mg/L と真値に近い値となり、問題のない検査値となった。

このことより、「外れ値」の原因は試料と標準液の硝酸濃度が異なっていたことであるとわかった。

(2) TOC

① 誤差率、Z スコア及び「外れ値」

各検査機関の検査値、変動係数、誤差率及び Z スコアを表 2 に示す。また、検査値の度数分布を図 4 に示す。

16 の検査値のうち、変動係数が 20% を超えた機関は存在しなかったため、検査値を有意水準 5% で Grubbs の棄却検定を行った。その結果、棄却された機関は存在せず、16 の検査値を平均して「真値」を求めたところ、「真値」は 1.20 mg/L となった。「真値」に対する誤差率は-23.4%~26.7% であり、許容範囲を超えた機関は 2 機関であった。また、Z スコアを求めた結果、Z スコアの範囲は-4.70~4.75 となり、許容範囲を超えた機関は 3 機関であった。

以上の結果、検証方法で示した誤差率および Z スコアの両方の許容範囲を超えた「外れ値」に

表 2 検査機関の測定結果 (TOC)

機関番号	検査値 (mg/L)	変動係数 (%)	真値に対する誤差率 (%)	Zスコア
B-1 *	0.92	1.93	-23.4	-4.70
B-2	1.00	2.71	-16.2	-3.35
B-3	1.13	0.63	-5.54	-1.34
B-4	1.13	0.48	-5.20	-1.28
B-5	1.16	1.12	-2.86	-0.84
B-6	1.18	0.71	-1.19	-0.52
B-7	1.20	0.70	0.48	-0.21
B-8	1.21	0.74	1.49	-0.02
B-9	1.22	0.74	1.65	0.02
B-10	1.22	2.88	1.65	0.02
B-11	1.23	1.57	2.66	0.21
B-12	1.24	0.36	3.49	0.36
B-13	1.25	1.74	4.33	0.52
B-14	1.25	0.57	4.50	0.55
B-15	1.28	0.43	7.34	1.09
B-16 *	1.52	5.87	26.7	4.75
平均値	1.20			
最大値	1.52			
最小値	0.92			
標準偏差	0.13			
変動係数 (%)	10.7			
n	16			

真値: 1.20 mg/L

*: 真値に対する誤差率が±20%を超え、かつZスコアの絶対値が3以上の機関(外れ値)

該当する機関は 2 機関であり、概ね良好な外部精度管理結果であったと考えられた。「外れ値」となった機関 (B-1、B-16) に対してフォローアップ調査を行った。

② フォローアップ調査

機関 B-1

機関 B-1 は、水道水の TOC の測定で一般的である前処理方式 (酸を添加し無機炭素を除去後、TOC を測定する方法) ではなく、差し引き方式 (全炭素 (TC) と無機炭素 (IC) を別々に測定し、TC-IC で TOC を測定する方法) を採用していた。試料の IC の面積値は 0 mg/L の面積値とほとんど同値であったが、これを IC の検量線の回帰式を用いて 0.24 mg/L (n=5) という値を算出し、TC から差し引いていたため、TOC は 0.917 mg/L となり、真値 (1.20 mg/L) と比較すると誤差率-23.4%、Zスコア-4.70 と低値となった。

上記に対する対策として、TC および IC に定量下限値を設定し、正確に定量計算するように SOP を変更することが考えられる。また、低濃

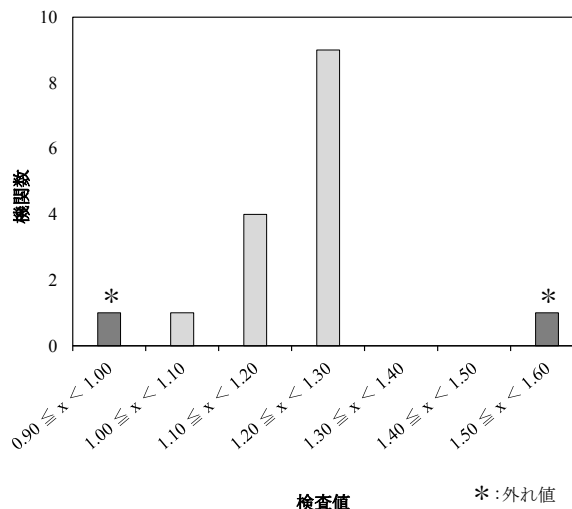


図 4 検査値の度数分布 (TOC)

度の TOC に対しては TC-IC 方式を用いると誤差が生じやすいとメーカーも認めていることから、注意が必要である。当該機関からは、今後正確な定量計算方法を検討するとの回答を得た。

機関 B-16

機関 B-16 は、検査値 1.52 mg/L、誤差率 26.7%、Zスコア 4.75 であった。報告書によると、精製水の TOC 値が 0.582 mg/L とかなり高い値であった。告示法では、用いる精製水の TOC 濃度が「0.1 mg/L 以下のもの、または同等以上の品質を有するもの」とある。当該機関では、精製水製造装置の経路を洗浄後、TOC 値はある程度は低下したが、依然として不十分であるとし、現在のところ、さらに洗浄等を実施するなどして様子を見る予定である。

2. 全体的な留意点

(1) 鉛

① 分析方法による比較

分析法別の検査値の度数分布を図 3 に示した。高値側で外れ値となった 3 機関は FLAA 法であったが、他の FLAA 法を用いていた機関の検査値はいずれも真値に近い値であり、FLAA 法で高値になる傾向があるとは言えないと考えられ、分析方法が検査値に与える影響はとくに認められなかった。

② SOP

SOP の提出がなかった機関が 1 機関、機器の操作手順書、あるいはフロー図のみといった

SOP の体をなしておらず、未整備と分類したのが 9 機関、また、必要な記載が欠けているなど、不十分と分類したのが 4 機関であった。SOP は試験実施のため必ず整備しなければならない文書である。一方、4 機関は適切な SOP を作成しており、SOP の整備状況については検査機関により大きく異なっていた。

③ 分析開始までの時間

告示法では分析開始までの時間は 2 週間以内と定められているが、5 機関が 2 週間以内に開始していなかった。最も遅い機関で配付から約 1 ヶ月後の 10 月 26 日に開始していた。速やかに分析できない場合、告示法に従い、冷暗所に保管し 2 週間以内に前処理しなければならない。また、SOP にも分析開始までの時間を明記し、それに従って分析する必要がある。

④ 前処理

告示法では前処理操作で加熱を行うこととされているが、2 機関では加熱操作を行っていないため、改善が必要である。

また、試料中および標準液中の硝酸濃度は、ICP-MS 法では 1%、それ以外の方法では 10%と告示法に記載されている。ICP-MS 法で分析した機関においては、1 機関が 4%で調製しており、ICP-AES 法では 1%と 1.5%と 2%が各 1 機関あり、FLAA 法では 3 機関が 1%で調製しており、改善が必要である。

⑤ 検量線の検証

告示法では別表に記載された検水の濃度範囲内で 4 段階以上の標準液を用いて検量線を作成するように記載されている。濃度範囲は分析方法によって異なり、FLAA 法と ICP-AES 法では 0.001~0.1 mg/L、ICP-MS 法では 0.0002~0.02 mg/L である。

本調査では原点を強制的に通過させていた機関が 3 機関、0 mg/L を検量点としていた機関が 6 機関、0 mg/L を除いた検量点数が 4 点未満だった機関が 2 機関、最大濃度が検水の濃度範囲を超えていた機関が 4 機関あり、SOP を改定する必要がある。

また鉛の基準値は 0.01 mg/L であり、1/10 の 0.001 mg/L まで定量することが求められているが、0 mg/L を除く最小検量点濃度が 0.001 mg/L より高かった機関が 6 機関あり、改善が必要である。

また、ICP-AES 法では内部標準物質との発光強度比を用いて検量線を作成することになっているが、内部標準物質を使用していなかった機関が 1 機関あり改善が必要である。

⑥ 標準液

告示法では、「標準原液、標準液または混合標準液は原体から自己調製したもの、もしくは計量法（平成 4 年法律第 51 号）第 136 条若しくは第 144 条の規定に基づく証明書又はこれらに相当する証明書が添付され、かつ、告示法の標準原液と同濃度のもの又は告示法の標準液若しくは混合標準液と同濃度のもの」の使用が認められている。なお、告示法の標準液若しくは混合標準液と同濃度のものは「開封後速やかに使用することとし、開封後保存したものを使用してはならない。」ただし、ICP-AES 法および ICP-MS 法では当該保存方法によれば、開封後保存したものについても使用できる。

本調査ではすべての機関で市販の標準原液を使用していたが、証明書がついていない市販の標準原液を使用していた機関が 2 機関あった。また、1 機関において保証期限が過ぎた標準原液を使用していた。市販の標準液を使用する場合は、証明書が付いたものを保証期限内に使用しなければならない。

また、標準系列の調製日については、8 機関は用時調製していたが、2 機関は未記入で、5 機関は調製時期を 1 週間以上前と記載し、3 機関は調製時期を 1 週間以内と記載していた。標準系列は用時調製が望ましい。

⑦ 空試験

告示法では、精製水を検水と同様に前処理し、空試験を実施することになっており、検量線の濃度範囲の下限值（基準値の 1/10 以下）を下回ることを確認する必要がある。しかし、報告された検量点の最小濃度が検量線の濃度範囲の下限值より高く、空試験の判定ができない機関が 6 機関あった。これらの機関は今回の外部精度管理試料を定量するには問題のない検量線の濃度範囲であったが、告示法が求める空試験値を判定するには不十分であった。したがって、空試験の判定を考慮した検量線の濃度範囲を設定する必要がある。また、空試験を実施していない機関が 3 機関あった。空試験は検査時の汚染を把握するためにも必ず実施しなければならない。

い。

⑧ 妥当性試験

ガイドラインに基づく妥当性評価は自社の検査法が正しく水道水質基準に基づく判定値をだせるかを評価するものである。しかし、妥当性評価を実施していた機関は 6 機関であり、参加機関の 1/3 であった。

(2) TOC

① SOP

SOP が未提出の機関はなかったが、機器の操作手順書、あるいはフロー図のみといった SOP の体をなしておらず、未整備と分類したのが 9 機関、また、必要な記載が欠けているなど、不十分と分類したのが 3 機関であった。SOP は試験実施のため必ず整備しなければならない文書である。一方、4 機関においては適切な SOP が整備されており、さらに、ガイドラインに基づく妥当性評価を実施していた。妥当性評価は自社の検査法が正しく水道水質基準に基づく判定値をだせるかを評価するものであるので、実施することが望ましい。

② 分析開始までの時間

告示法では、分析開始までの時間は 72 時間以内と定められているが、参加機関の約半数の 7 機関が 72 時間以内に開始していなかった。最も遅い機関で配付から約 1 ヶ月後の 10 月 26 日に開始していた。速やかに分析できない場合は、告示法に従い、冷暗所に保管し 72 時間以内に分析しなければならない。また、SOP にも検査開始までの時間を明記し、それに従って分析する必要がある。

③ 精製水

告示法では、用いる精製水の TOC 濃度が「0.1 mg/L 以下のもの、または同等以上の品質を有するもの」とある。今回、精製水の TOC 値が報告書に未記載であった機関が 4 機関あり、また 1 機関では 0.582 mg/L とかなり高い値であった。TOC の精製水の値は定量計算に大きく影響を与えることから、十分に注意が必要である。

④ 検量線

告示法では、0 mg/L を含まない 4 点以上の検量点で検量線を作成することとなっている。今回各機関で用いられた検量点数の範囲は 4~6 点であった。検量点が 0 mg/L を除き 4 点未満であった機関は 3 機関であった。また、0 mg/L を検

量点とした機関が 13 機関存在した。検量線を原点移動し、補正していた機関は 8 機関であった。検量点の最小点が基準値の 3 mg/L の 1/10 の 0.3 mg/L より高い機関が 6 機関あった。検量線の次数は、すべての機関で 1 次式を用いていた。

⑤ 標準原液および標準液

告示法では、「標準原液、標準液または混合標準液は原体から自己調製したもの、もしくは計量法（平成 4 年法律第 51 号）第 136 条若しくは第 144 条の規定に基づく証明書又はこれらに相当する証明書が添付され、かつ、告示法の標準原液と同濃度のもの又は告示法の標準液若しくは混合標準液と同濃度のもの」の使用が認められている。ただし、告示法の標準液若しくは混合標準液と同濃度のものは「開封後速やかに使用することとし、開封後保存したものを使用してはならない」とされている。

標準原液を自己調製していた機関が 12 機関あり、証明書がついていない市販の標準液を使用していた機関が 4 機関あった。

ま と め

2017 年度建築物飲料水水質検査業外部精度管理の無機項目に鉛、有機項目に TOC を選定し、検査結果を「真値」に対する誤差率と Z スコアの 2 つの方法で評価した。

鉛では、報告された 18 検査値のうち、変動係数が 10% を超えた機関は存在せず、Grubbs の棄却検定で棄却された機関はなかった。「真値」に対する誤差率±10% を超えたのは 4 機関、Z スコアの絶対値が 3 以上であったのは 3 機関であった。両方法で許容範囲を超えた「外れ値」に該当したのは 3 機関であった。

なお、「外れ値」等の原因および添付資料を検証した結果、検査精度を維持、向上する上で、次の留意点が考えられた。

- 1) 告示法に準拠した SOP を整備する。
- 2) SOP から逸脱しないようにする。
- 3) 前処理方法は、告示の方法に遵守して行う。
- 4) 原点を強制通過させない、検量点数は 4 点以上、告示法に準拠した検量線濃度範囲など適切な検量線を作成する。
- 5) 空試験を必ず実施する。
- 6) 標準原液、混合標準液について、証明書、濃

度、保証期限等を確認する。

- 7) 鉛はガラスに吸着しやすいのでガラス容器を用いない。

TOCでは検査が実施された16機関のうち変動係数が20%を超えた機関はなかった。Grubbsの棄却検定で棄却された機関はなかった。「真値」に対する誤差率が許容範囲を超えた機関は2機関、Zスコアが許容範囲を超えた機関は3機関であった。以上のことから、誤差率とZスコアの両方の許容範囲を超えた「外れ値」に該当する機関は2機関であった。

なお、「外れ値」等の原因および添付資料を検証した結果、検査精度を維持、向上する上で、次の留意点が考えられた。

- 1) 告示法に準拠したSOPを整備する。
- 2) SOPから逸脱しないようにする。
- 3) 検量点数は4点以上、適切な濃度範囲の検量線を作成し、定量計算する。
- 4) 分析開始までの時間を72時間以内にする。
- 5) 低濃度のTOCを測定する際は、前処理方式を用いる、あるいはTC、ICに定量下限値を設定し、正確に定量計算する。
- 6) 精製水のTOC値を確認する。

謝 辞

本研究は「平成29年度大阪府建築物飲料水水質検査業外部精度管理」により実施された。研究実施にあたり協力していただいた大阪府環境衛生課ならびに（一社）大阪ビルメンテナンス協会の各位に感謝いたします。

利 益 相 反

開示すべき利益相反はない。

文 献

- 1) 吉田仁, 木村明生. 水質検査における外部精度管理(2015年度)ー銅及びその化合物ー. 大阪健康安全基盤研究所研究年報 2017; 1: 15-33.
- 2) 水道水質ハンドブック. 日本水道新聞社; 1994. 12-14.

- 3) 上水試験方法解説編 2001年版. 日本水道協会; 2001. 439-440.
- 4) 上水試験方法資料編 2011年版. 日本水道協会; 2011.72-74.
- 5) 上水試験方法理化学編 2011年版. 日本水道協会; 2011. 140.
- 6) 厚生労働省. 「水質基準に関する省令」(平成15年5月30日厚生労働省令第101号)
- 7) 厚生労働省. 第6回厚生科学審議会生活環境水道部会資料.
<http://www.mhlw.go.jp/shingi/2007/10/s1026-15.html>. WEBサイトの内容は2018年3月7日に確認した
- 8) 厚生労働省. 「水質基準に関する省令の規定に基づき厚生労働大臣が定める方法」(平成15年7月22日付け厚生労働省告示第261号〔一分改正 平成29年3月28日付け厚生労働省告示第87号〕)
- 9) 厚生労働省. 「水質基準項目の測定精度」(平成15年10月10日健水発第1010001号厚生労働省健康局水道課長通知別添5)
- 10) JIS Z8402-2. 測定方法及び測定結果の精確さ(真度及び精度)-第2部: 標準測定方法の併行精度及び再現性を求めるための基本的な方法. 日本規格協会; 1999. 7-27.
- 11) 藤井賢三. 試験所認定制度における技能試験(1). 環境と測定技術 2000; 27(2): 51-56.
- 12) 錫谷徹. 分析用機材に依る吸着に基づく無機微量定量誤差に就いて. ポーラログラフイーの研究 1955; 2(4): 169-177.

Results of external quality control on the analytical measures for lead and organic substances (total organic carbon) in drinking water, performed in 2017 in Osaka Prefecture

Takae NAKAJIMA , Fumie ADACHI and Yoshihiko KOIZUMI

From 2015, by request of Osaka Building Maintenance Association, we started to implement the quality control program for building inspection contractors. In 2017, 18 building inspection contractors participated in the external quality control on analytical measure of lead and its compound and 16 contractors participated in that of organic substances. As a result, each 3 and 2 building inspection contractors were evaluated as outliers. We executed the follow up survey for these five facilities and retesting was performed. Finally, all facilities obtained the accurate results in retesting after unfolding and correcting the causes.

Key words : drinking water, external quality, lead, organic substances, building inspection contractors.

大阪府における環境および食品中放射能調査 (平成 29 年度報告)

大山正幸, 肥塚利江, 木村明生

平成 29 年度の原子力規制庁委託により実施した、大阪府における環境および各種食品中放射能調査結果を報告する。調査は、降水中の全ベータ放射能測定、環境試料（降下物、大気浮遊じん、上水、海水、土壌、海底土）および各種食品試料中のガンマ線放出核種分析および空間放射線量率（モニタリングポスト）について実施した。

また、平成 22 年度より行っている福島第 1 原子力発電所の事故を受けたモニタリングの強化を引き続き行った。さらに、平成 29 年 9 月 3 日に北朝鮮が 6 回目となる地下核実験を行ったことを受け、当日から 9 月 12 日まで原子力規制庁の指示によりモニタリングの強化を行った。

キーワード：環境放射能、全ベータ放射能、核種分析、空間放射線量率

当所では、昭和 35 年（1960 年）度より大阪府における環境および食品中の放射能測定調査を実施している。この調査は、人工放射性降下物および原子力施設等からの放射性物質の漏洩による環境汚染の有無およびそのレベルを明らかにする目的で行っており、主として原子力規制庁の委託によるものである。

降水（雨水）については全ベータ放射能測定、その他の環境試料および食品試料についてはガンマ線核種分析 [セシウム 134 (^{134}Cs)、セシウム 137 (^{137}Cs)、ヨウ素 131 (^{131}I)、カリウム 40 (^{40}K) 等] を行った。

また、モニタリングポストに関しては、平成 23 年 3 月 11 日の東北地方太平洋沖地震により発生した福島第 1 原子力発電所の事故を受けて平成 24 年度より増設された 5 ヶ所（茨木市、寝屋川市、東大阪市、富田林市、泉佐野市）に既設の大阪市を加えた 6 ヶ所において調査を行っている。

ガンマ線核種分析に関しては、測定値の信頼性確保のため、(公財)日本分析センターとの間で、既知量の放射性核種を添加した試料 7 検体について、クロスチェック（標準試料法による相互比較分析）を行った。

さらに、福島第 1 原子力発電所の事故を受け、毎月第 2 週の水曜日にサーベイメータによる地上 1m の高さにおける空間放射線量率調査を行った。

また、平成 29 年 9 月 3 日に北朝鮮が地下核実験を行ったことによる大阪府内への影響の有無を調査するため、当日から 9 月 12 日までモニタリングの強化を行い、連日、降下物（定時降下物）および大気浮遊じんのガンマ線核種分析を行った。

本報告では、平成 29 年度に実施した上記の放射能調査結果を、過去の測定結果との比較も含め報告する。

表 1 放射能調査項目および試料等

調査項目	試料名	種別	採取場所	採取回数等	件数
全ベータ放射能	定時降水	雨水	大阪市東成区 当所屋上	降雨毎	75
ガンマ線核種分析	大気浮遊じん		大阪市東成区 当所屋上	3ヶ月毎	4
	降下物	雨水・ちり	大阪市東成区 当所屋上	毎月	12
	上水	原水	守口市大庭町 庭窪浄水場	年1回(平成29年6月)	1
		蛇口水	大阪市東成区 当所本館1F	年1回(平成29年6月)	1
	海水	表面水	大阪港入口	年1回(平成29年7月)	1
	海底土	表層	大阪港入口	年1回(平成29年7月)	1
	土壌	0~5cm	大阪市中央区 大阪城公園内	年1回(平成29年8月)	1
		5~20cm	大阪市中央区 大阪城公園内	年1回(平成29年8月)	1
	牛乳	原乳(生産地)	大阪府羽曳野市	年1回(平成29年8月)	1
	野菜	タマネギ(生産地)	大阪府泉南郡熊取町	年1回(平成29年6月)	1
		キャベツ(生産地)	大阪府泉南郡熊取町	年1回(平成29年12月)	1
	相互比較分析試料 (標準試料)	模擬牛乳	(公財) 日本分析センターで調製	年1回(平成29年8月)	1
		模擬土壌	(公財) 日本分析センターで調製	年1回(平成29年8月)	1
	寒天	(公財) 日本分析センターで調製	年1回(平成29年8月)	5	
モニタリング強化 (北朝鮮核実験)	大気浮遊じん		大阪市東成区 当所屋上	平成29年9月3~12日	8
	降下物	雨水・ちり	大阪市東成区 当所屋上	平成29年9月3~12日	8
空間線量率	モニタリングポスト		大阪市東成区 当所屋上	毎日/年間	365
			茨木市大住町 茨木保健所	毎日/年間	365
			寝屋川市八坂町 寝屋川保健所	毎日/年間	365
			東大阪市西岩田 東大阪市環境衛生検査センター	毎日/年間	365
			富田林市寿町 富田林保健所	毎日/年間	365
			泉佐野市羽倉崎 市立佐野中学校	毎日/年間	365
	モニタリング強化 (福島第1原発事故)	サーベイメータ		大阪市東成区 当所中庭	毎月

実験方法

試料の採取、処理および測定は、「環境放射能水準調査委託実施計画書(平成29年度)」¹⁾に基づいて行った。表1に調査項目および試料等を示す。

1. 全ベータ放射能測定

1-1 降水(雨水)試料

当所(大阪市東成区)観測室屋上(地上約20m)に設置したデポジットゲージ(表面積1000cm²)で雨水を集めた。毎朝9時30分に採取し、100mL(1mm)以上の降水があった場合には100mLを測定試料とした。

1-2 測定方法

蒸発皿に試料100mLとヨウ素担体(1mg I/mL)1mL、0.1mol/L硝酸銀1mLおよび10%硝酸1mLを加えて加熱濃縮させた。濃縮物を直径25mmのステンレス製試料皿に移して蒸発乾固させ、測定用試料とした。測定は低バックグラウンド放射能自動測定装置(日立製作所製LBC450)で行った。比較試料は、酸化ウラン(U₃O₈:日本アイソトープ協会製、35.3dps)を用いた。測定は試料採取から6時間後に行った。測定時間は、比較試料5分、降水試料30分とした。

2. 核種分析

2-1 測定試料

(1) 大気浮遊じん: 当所観測室屋上(地上約20m)に設置したハイボリウム・エアサンプラー(柴田科学株式会社製、HV-1000R)を用いて、ろ紙(東洋濾紙、HE-40T)上に大気浮遊じんを捕集した。毎月3回、午前10時から翌日の午前10時までの24時間捕集を行った。3ヶ月分のろ紙試料(測定に供した吸引量:約10000m³)をカッターで円形(直径50mm)に切り取り、ポリプロピレン製容器(U-8容器)に詰め測定用試料とした。

(2) 降下物(雨水・ちり): 当所観測室屋上(地上約20m)に設置した水盤(表面積5000cm²)に降下した雨水およびちりを1ヶ月間採取し、採取した試料全量を、上水自動濃縮装置(柴田理化工機製)を用いて蒸発濃縮させた。濃縮物を蒸発皿に移して蒸発乾固させた後、残留物をU-8容器に移し測定用試料とした。

(3) 上水: 原水(淀川河川水)は大阪広域水道企業団庭窪浄水場(守口市)原水取水口から、蛇口水は当所本館1階の実験室内蛇口から採取した。採取試料各100Lを、上水自動濃縮装置を用いて蒸発濃縮させた。濃縮物を蒸発皿に移して蒸発乾固させた後、残留物をそれぞれU-8容器に移し測定用試料とした(時期および測定数は表1を参照)。

(4) 食品：牛乳（原乳）は、2L をマリネリビーカー（2L 容）に入れ、測定用試料とした。野菜類（タマネギおよびキャベツ）は、食用部約 4kg を 65℃ の乾燥器（Panasonic 社製、MOV-212-PJ）で乾燥させた後に、石英製容器に移して電気マッフル炉（ADVANTEC 社製、FUW263PA）で 450℃、24 時間灰化した。それぞれの灰試料は 0.35mm メッシュのふるいを通し、U-8 容器に移して測定用試料とした（試料採取場所、時期および測定数は表 1 を参照）。

(5) 海水、土壌、海底土：海水は 2L をマリネリビーカー（2L 容）に入れ、測定用試料とした。土壌および海底土は、採取後に 105℃ の乾燥器で乾燥させた後、2mm メッシュのふるいを通して得られた乾燥細土約 100g を U-8 容器に入れ、測定用試料とした（試料採取場所、時期および測定数は表 1 を参照）。

(6) 標準試料法による相互比較分析：（公財）日本分析センターが数核種を添加して調製した放射能標準容積線源（寒天）（以下「寒天」という）および放射能標準容積線源（模擬土壌（アルミナ）（以下「模擬土壌」という））ならびに分析比較試料（模擬牛乳）（以下「模擬牛乳」という）について、寒天（U-8 容器：5 試料）および模擬土壌（U-8 容器：1 試料）は U-8 容器のまま、模擬牛乳（1 試料）は全量（2L）をマリネリビーカー（2L 容）に入れ測定を行った。

測定結果については、（公財）日本分析センターにおいて基準値（添加値）と比較し評価を行った。評価は、当所（分析機関）の分析値と基準値の拡張不確かさ（ U ）から En 数を算出し、 $|En| \leq 1$ を基準値内（基準値と一致）とした。なお、 En 数は下記の式により求められる。

$$En \text{ 数} = \frac{(\text{分析値}_{\text{分析機関}} - \text{基準値})}{\sqrt{U^2_{\text{分析機関}} + U^2_{\text{基準値}}}}$$

2-2 測定方法

あらかじめエネルギーの異なる核種を含んだ標準線源を用いてエネルギー校正および検出効率校正を行ったゲルマニウム半導体検出器（キャンベラ製、GC2018）を用い、試料中の核種より放出されるガンマ線量を測定した。測定時間は原則 80000 秒とし、寒天のみ 20000 秒から 80000 秒と

した。得られた計測結果をバックグラウンド補正した後、エネルギー補正および検出効率補正を行ない、測定試料中の核種（ ^{134}Cs 、 ^{137}Cs 、 ^{131}I および ^{40}K 等）の定性定量分析を行った。

3. 空間放射線量率測定

モニタリングポスト（NaI シンチレーション式、エネルギー補償型、アロカ製 MAR-22 型）による空間放射線量率の測定は、当所観測室屋上に設置したモニタリングポスト（地上約 20m）に、茨木市、寝屋川市、東大阪市、富田林市、泉佐野市に設置した 5 基（地上 1m）を加えた 6 基で連続測定を行った（設置場所は表 1 を参照）。結果は 1 時間平均値による 1 日の変動をメモリーカードから読み取った。

なお、モニタリングポスト 6 基の測定結果は、自動測定・配信システムにより 10 分間の平均値が原子力規制委員会のホームページにリアルタイムで公表されている²⁾。

4. 福島第 1 原子力発電所の事故によるモニタリング強化

毎月第 2 週の水曜日の午前 10 時に当所中庭においてサーベイメータ（NaI シンチレーション式、アロカ製 TCS-171B 型）で空間放射線量率を測定した。測定は、「環境放射能水準調査委託実施計画書（平成 20 年 7 月）」³⁾ に準じて行った。測定器の時定数を 30 秒とし、地表 1m の高さにおけるサーベイメータの指示値を 30 秒間隔で 5 回以上読み取り、平均値を算出した。但し、原子力規制庁の指示により上記計画書で加えることとなっている宇宙線による線量率 30 nGy/h は、加えていない。

5. 北朝鮮核実験によるモニタリング強化

平成 29 年 9 月 3 日に北朝鮮が地下核実験を行ったことを受け、原子力規制庁から「国外における原子力関係事象発生時の対応について」の協力依頼があり、当日から 9 月 12 日までモニタリングの強化を行い、連日、降下物（定時降下物）および大気浮遊じんのガンマ線核種分析を行った。

5-1 測定試料

(1) 降下物（定時降下物）

前日 15 時から当日 15 時までの 24 時間に降水用デポジットゲージ（表面積 1000 cm²）で採取

された降水、降水がなければ 160 mL の精製水でデポジットゲージについたちりを洗い流して採取し、80mL を U-8 容器に入れ、測定試料とした。

(2) 大気浮遊じん

上記の大気浮遊じんと同様の方法[2-1(1)参照]で前日 9 時から当日 9 時までの 24 時間捕集を行った。1 日分のろ紙試料を円形 (50mm φ) に切り取り、U-8 容器に詰め、測定試料とした。

5-2 測定方法

2-2 と同様の方法でガンマ線核種分析を行った。測定時間は 20000 秒とした。降水物データは翌日 10 時まで、大気浮遊じんデータは当日 17 時までに原子力規制庁へ報告した。

結果 および 考察

1. 全ベータ放射能

表 2 に降水中の全ベータ放射能測定値を示す。降水中の全ベータ放射能は、75 試料中 33 例から検出されたが、異常値は検出されなかった。

表2 降水中全ベータ放射能測定結果

年 月	降水量 mm	件数 (検出数)	濃度 Bq/L	月間降下量 MBq/km ²
平成29年 4月	104	7 (5)	ND~0.58	29.36
平成29年 5月	90	3 (1)	ND~0.36	10.78
平成29年 6月	171	9 (4)	ND~1.46	52.17
平成29年 7月	64	6 (3)	ND~0.93	2.89
平成29年 8月	119	7 (3)	ND~0.73	4.67
平成29年 9月	122	4 (0)	ND	ND
平成29年 10月	420	11 (3)	ND~0.61	11.72
平成29年 11月	57	9 (6)	ND~0.60	12.09
平成29年 12月	28	3 (2)	ND~0.40	10.31
平成30年 1月	51	4 (0)	ND	ND
平成30年 2月	29	4 (3)	ND~0.81	2.64
平成30年 3月	125	8 (3)	ND~0.59	10.87
平成29年度 ¹⁾	1380	75 (33)	ND~1.46	147.5
過去3年間の値				
平成26年度	1270	85 (20)	ND~1.1	41.0
平成27年度 ²⁾	1584	95 (8)	ND~1.27	10.3
平成28年度 ³⁾	1257	83 (22)	ND~0.75	67.9

ND: 計数値がその計数誤差の3倍を下回るもの

1): 北朝鮮核実験に伴うモニタリング強化のため、平成29年9月 3日~12日まで休止。

2): 北朝鮮核実験に伴うモニタリング強化のため、平成28年1月 7日~14日まで休止。

3): 北朝鮮核実験に伴うモニタリング強化のため、平成28年9月10日~16日まで休止。

2. 核種分析

環境試料および食品試料中の ¹³⁴Cs、¹³⁷Cs、¹³¹I および ⁴⁰K の分析結果を表 3 に示す。

(1) ¹³⁴Cs および ¹³⁷Cs: 今年度も例年同様、¹³⁷Cs が土壌、海底土の各試料から検出されたが、そのレベルは過去の値と同程度であった。¹³⁴Cs は、どの試料からも検出されなかった。

(2) ¹³¹I: ¹³¹I は、上水原水試料と蛇口水試料から微量 (それぞれ 3.4 および 0.53 mBq/L) 検出された。他の環境試料および食品試料からは検出されなかった。上水中の ¹³¹I については、原水が平成元年度から、蛇口水が平成 2 年度から検出されており、そのレベルも過去の値 (原水: 0.4~4.9、蛇口水: 0.4~1.4 mBq/L) ⁴⁾ と同程度であることや他の環境試料等から検出されていないこと、半減期が 8 日と短いことなどから、既報 ⁵⁾ に述べたように、その起源は医学利用によるものであろうと推定される。

上水中に存在する ¹³¹I による府民への健康影響については、既報 ⁵⁾ でも論じたように、そのレベルは飲食物摂取制限の基準 ⁶⁾ (飲料水中の放射性ヨウ素: 300Bq/kg) の 30 万分の 1 程度の低値であり、問題はないと考えられる。

(3) ⁴⁰K: 天然放射性核種である ⁴⁰K レベルは過去の値と同程度であり、特に異常値は認められなかった。

(4) 標準試料法による相互比較分析: (公財) 日本分析センターの報告書によると、当所の分析結果は基準値 (添加値) とよく一致しており、かつ、En 数も「1」以下であり、ガンマ線核種分析の精度は確保されていることが認められた。

表3 環境および食品試料中の¹³⁴Cs、¹³⁷Cs、¹³¹Iおよび⁴⁰K濃度

試料	採取年月日	単位	¹³⁴ Cs	¹³⁷ Cs	¹³¹ I	⁴⁰ K
大気浮遊じん						
平成29年 4月～6月	H29.4.5 ～H29.6.23	mBq/m ³	ND	ND	ND	ND
7月～9月	H29.7.6 ～H29.9.26	〃	ND	ND	ND	ND
10月～12月	H29.10.4 ～H29.12.19	〃	ND	ND	ND	0.15±0.038
平成30年 1月～3月	H30.1.9 ～H30.3.20	〃	ND	ND	ND	0.16±0.036
平成29年度		mBq/m ³	ND	ND	ND	ND～0.16
過去3年間の値		mBq/m ³	ND	ND	ND	0.14～0.37
降下物						
平成29年 4月	H29.3.31 ～H29.4.28	MBq/km ²	ND	ND	ND	1.0±0.20
5月	H29.4.28 ～H29.6.1	〃	ND	ND	ND	1.1±0.20
6月	H29.6.1 ～H29.6.29	〃	ND	ND	ND	0.66±0.18
7月	H29.6.29 ～H29.7.31	〃	ND	ND	ND	ND
8月	H29.7.31 ～H29.8.31	〃	ND	ND	ND	0.55±0.17
9月	H29.8.31 ～H29.10.3	〃	ND	ND	ND	ND
10月	H29.10.3 ～H29.10.31	〃	ND	ND	ND	ND
11月	H29.10.31 ～H29.12.1	〃	ND	ND	ND	0.74±0.19
12月	H29.12.1 ～H30.1.4	〃	ND	ND	ND	ND
平成30年 1月	H30.1.4 ～H30.1.31	〃	ND	ND	ND	1.0±0.20
2月	H30.1.31 ～H30.2.28	〃	ND	ND	ND	ND
3月	H30.2.28 ～H30.3.29	〃	ND	ND	ND	0.71±0.19
平成29年度		MBq/km ²	ND	ND	ND	ND～1.1
過去3年間の値		MBq/km ²	ND	ND	ND	ND～1.1
上水・原水	H29.6.14	mBq/L	ND	ND	3.4±0.17	75±2.4
過去3年間の値		mBq/L	ND	ND	0.65～2.7	64～83
上水・蛇口水	H29.6.20	mBq/L	ND	ND	0.53±0.098	78±2.5
過去3年間の値		mBq/L	ND	ND	ND～1.4	80～90
海水	H29.7.6	Bq/L	ND	ND	ND	3.2±0.32
過去3年間の値		Bq/L	ND	ND	ND	2.9～6.8
海底土	H29.7.6	Bq/kg dry	ND	2.4±0.24	ND	650±11
過去3年間の値		Bq/kg dry	ND	1.3～2.6	ND	630～670
土壌 0～5cm層	H29.8.3	Bq/kg dry (MBq/km ²)	ND (ND)	2.0±0.21 (110±12)	ND (ND)	660±9.8 (37000±540)
過去3年間の値		Bq/kg dry (MBq/km ²)	ND (ND)	1.9～1.9 (89～96)	ND (ND)	690～730 (33000～35000)
土壌 5～20cm層	H29.8.3	Bq/kg dry (MBq/km ²)	ND (ND)	2.9±0.21 (490±36)	ND (ND)	680±9.6 (110000±1600)
過去3年間の値		Bq/kg dry (MBq/km ²)	ND (ND)	2.8～3.9 (380～580)	ND (ND)	670～680 (91000～100000)
牛乳 原乳	H29.8.23	Bq/L	ND	ND	ND	44±0.90
過去3年間の値		Bq/L	ND	ND	ND	48～52
農産物 タマネギ	H29.6.12	Bq/kg生	ND	ND	ND	51±0.32
過去3年間の値		Bq/kg生	ND	ND	ND	45～46
農産物 キャベツ	H29.12.11	Bq/kg生	ND	ND	ND	70±0.46
過去3年間の値		Bq/kg生	ND	ND	ND	58～71

ND:計数値がその計数誤差の3倍を下回るもの

3. 空間放射線量率

モニタリングポストによる空間放射線量率調査結果（1時間平均値に基づく変動範囲を1月毎にまとめたもの）を表4-1から表4-6に示す。

表4-1に示す大阪市の空間放射線量率値の1時間平均値に基づく一日の変動は、年間を通じて40～67 nGy/hの範囲で、平常値の範囲であり、過去3年間の結果と同程度であった。

表4-1 モニタリングポストによる空間放射線量率
(大阪市 大阪健康安全基盤研究所：地上20m)

測定年月	測定回数	モニタリングポスト(nGy/h) (所在地：大阪市)		
		最高値	最低値	平均値
平成29年 4月	30	52	40	42
同 5月	31	49	40	42
同 6月	30	58	41	42
同 7月	31	48	40	41
同 8月	31	67	40	42
同 9月	30	59	41	42
同 10月	31	54	41	43
同 11月	30	55	41	42
同 12月	31	50	41	42
平成30年 1月	31	53	41	42
同 2月	28	51	41	42
同 3月	31	59	40	42
平成29年度	365	67	40	42
過去3年間の値				
平成26年度	365	62	40	42
平成27年度	366	65	40	42
平成28年度	365	82	39	42

表4-2に示す茨木市の空間放射線量率値の1時間平均値に基づく一日の変動は、年間を通じて52～85 nGy/hの範囲であった。

表4-2 モニタリングポストによる空間放射線量率
(茨木市 茨木保健所：地上1m)

測定年月	測定回数	モニタリングポスト(nGy/h) (所在地：茨木市)		
		最高値	最低値	平均値
平成29年 4月	30	71	54	56
同 5月	31	67	54	57
同 6月	30	85	52	57
同 7月	31	80	52	55
同 8月	31	79	53	56
同 9月	30	80	53	56
同 10月	31	70	53	56
同 11月	30	73	54	56
同 12月	31	64	54	56
平成30年 1月	31	70	53	56
同 2月	28	65	54	55
同 3月	31	71	53	56
平成29年度	365	85	52	56
過去3年間の値				
平成26年度	365	92	53	57
平成27年度	366	91	51	56
平成28年度	365	92	52	56

表4-3に示す寝屋川市の空間放射線量率値の1時間平均値に基づく一日の変動は、年間を通じて69～95 nGy/hの範囲であった。

表4-3 モニタリングポストによる空間放射線量率
(寝屋川市 寝屋川保健所：地上1m)

測定年月	測定回数	モニタリングポスト(nGy/h) (所在地：寝屋川市)		
		最高値	最低値	平均値
平成29年 4月	30	91	69	71
同 5月	31	81	70	71
同 6月	30	95	69	71
同 7月	31	89	69	71
同 8月	31	95	69	71
同 9月	30	93	69	71
同 10月	31	87	69	72
同 11月	30	89	70	71
同 12月	31	79	69	71
平成30年 1月	31	83	69	71
同 2月	28	82	69	71
同 3月	31	84	69	71
平成29年度	365	95	69	71
過去3年間の値				
平成26年度	365	103	70	72
平成27年度	366	111	70	72
平成28年度	365	117	69	72

表4-4に示す東大阪市の空間放射線量率値の1時間平均値に基づく一日の変動は、年間を通じて75～103 nGy/hの範囲であった。

表4-4 モニタリングポストによる空間放射線量率
(東大阪市 東大阪市環境衛生検査センター：地上1m)

測定年月	測定回数	モニタリングポスト(nGy/h) (所在地：東大阪市)		
		最高値	最低値	平均値
平成29年 4月	30	92	75	78
同 5月	31	88	75	78
同 6月	30	103	75	78
同 7月	31	100	75	77
同 8月	31	101	75	79
同 9月	30	102	75	78
同 10月	31	94	75	78
同 11月	30	94	76	78
同 12月	31	89	76	78
平成30年 1月	31	93	76	78
同 2月	28	87	76	77
同 3月	31	96	75	77
平成29年度	365	103	75	78
過去3年間の値				
平成26年度	365	103	75	78
平成27年度	366	113	74	78
平成28年度	365	124	74	78

表4-5に示す富田林市の空間放射線量率値の1時間平均値に基づく一日の変動は、年間を通じて60～82 nGy/hの範囲であった。

表4-5 モニタリングポストによる空間放射線量率
(富田林市 富田林保健所：地上1m)

測定年月	測定回数	モニタリングポスト(nGy/h) (所在地：富田林市)		
		最高値	最低値	平均値
平成29年 4月	30	76	61	62
同 5月	31	73	61	63
同 6月	30	75	61	63
同 7月	31	73	60	62
同 8月	31	81	61	63
同 9月	30	78	61	63
同 10月	31	79	61	63
同 11月	30	82	61	63
同 12月	31	72	61	62
平成30年 1月	31	80	61	63
同 2月	28	71	61	62
同 3月	31	81	61	63
平成29年度	365	82	60	63
過去3年間の値				
平成26年度	365	87	61	63
平成27年度	366	86	60	63
平成28年度	365	97	61	63

表 4-6 に示す泉佐野市の空間放射線量率値の 1 時間平均値に基づく一日の変動は、年間を通じて 49～90 nGy/h の範囲であった。

表4-6 モニタリングポストによる空間放射線量率
(泉佐野市 佐野中学校：地上1m)

測定年月	測定回数	モニタリングポスト(nGy/h) (所在地：泉佐野市)		
		最高値	最低値	平均値
平成29年 4月	30	77	49	51
同 5月	31	62	49	52
同 6月	30	83	49	52
同 7月	31	90	49	51
同 8月	31	87	49	52
同 9月	30	76	50	52
同 10月	31	76	49	52
同 11月	30	76	49	51
同 12月	31	66	50	51
平成30年 1月	31	76	49	51
同 2月	28	69	50	51
同 3月	31	88	49	52
平成29年度	365	90	49	52
過去3年間の値				
平成26年度	365	105	48	51
平成27年度	366	85	48	51
平成28年度	365	133	48	51

4. 福島第 1 原子力発電所の事故によるモニタリング強化

当所中庭で行ったサーベイメータによる空間放射線量率の測定結果を表 5 に示す。

当所中庭での値は、測定期間中 72～83 nGy/h の範囲であり、過去 3 年間の値や同じ場所で測定していた過去の値（平成 8 年度～20 年度：77

表5 サーベイメータによる空間放射線量率
(地上1m、当所中庭)

測定年月	サーベイメータ (nGy/h)	
	測定回数	測定値
平成29年 4月	1	77
同 5月	1	77
同 6月	1	83
同 7月	1	72
同 8月	1	73
同 9月	1	79
同 10月	1	78
同 11月	1	74
同 12月	1	77
平成30年 1月	1	75
同 2月	1	77
同 3月	1	78
平成29年度	12	72～83(平均:77)
過去3年間の値		
平成26年度	12	66～80(平均:75)
平成27年度	12	63～81(平均:74)
平成28年度	12	71～83(平均:76)

～108 nGy/h) から見て平常値の範囲内であった。

5. 北朝鮮核実験によるモニタリング強化

ゲルマニウム半導体検出器を用いた核種分析の結果、モニタリングの強化期間中、降下物（定時降下物）および大気浮遊じんから人工放射性核種は検出されなかった。

ま と め

核種分析により人工放射性核種である ^{131}I および ^{137}Cs が検出された。医学利用等に由来すると考えられる ^{131}I は上水（原水および蛇口水）に極低レベルで検出された。 ^{137}Cs は土壌や海底土から例年と同様に検出されたが、そのレベルは低値であった。なお、他の人工放射性核種はいずれの試料からも検出されなかった。また、空間放射線量率値にも異常値は検出されなかった。

福島第 1 原子力発電所事故によるモニタリング強化で実施されたサーベイメータによる空間放射線量率調査結果は、過去 3 年間の値の範囲内であった。

また、北朝鮮核実験時のモニタリング強化で実施された、ゲルマニウム半導体検出器を用いた核種分析調査の結果でも異常値は認められず、大阪府内への影響は認められなかった。

謝 辞

本調査の遂行にあたり、調査試料の採取にご協力いただきました大阪城パークセンター、熊取町役場、大阪府環境農林水産総合研究所、大阪広域水道企業団庭窪浄水場の各機関に感謝致します。また、調査実施にあたり、ご指導をいただきました原子力規制庁監視情報課放射線環境対策室、日本分析センターの皆様に謝意を表します。

注：本報告は、電源開発促進対策特別会計法に基づく原子力規制庁からの受託事業として、大阪健康安全基盤研究所が実施した平成 29 年度「環境放射能水準調査」の成果である。

利 益 相 反

開示すべき利益相反はない。

文 献

- 1) 原子力規制庁. 監視情報課放射線環境対策室. 環境放射能水準調査委託実施計画書. 平成 29 年度.
- 2) 原子力規制委員会. 放射線モニタリング情報全国及び福島県の空間線量測定結果.
<http://radioactivity.nsr.go.jp/map/ja/index.html>
WEB サイトの内容は 2018 年 5 月 10 日に確認した
- 3) 文部科学省科学技術・学術政策局原子力安全課防災環境対策室. 環境放射能水準調査委託実施計画書. 平成 20 年 7 月.
- 4) 肥塚利江, 東恵美子, 足立伸一. 大阪府における環境および食品中放射能調査 (平成 25 年度報告). *大阪府立公衛研所報* 2014; **52**: 67-74.
- 5) 田村幸子, 渡辺功, 布浦雅子. 大阪府における環境および食品中放射能調査 一平成元年 4 月～平成 2 年 3 月一. *大阪府立公衛研所報 公衆衛生編* 1990; **28**: 165-170.
- 6) 原子力規制委員会. 原子力災害対策指針 (平成 24 年 10 月 31 日, 平成 27 年 8 月 26 日改正, 平成 28 年 3 月 1 日部分改正)

**Survey of environmental and food radioactivity in Osaka Prefecture
(Fiscal 2017 Report)**

Masayuki OHYAMA, Toshie HIZUKA and Akio KIMURA

We investigated the radioactivity of environment and foods in Osaka Prefecture by commission from Nuclear Regulatory Agency in 2017 program year. The gross beta radioactivity in precipitation and the gamma ray radiation nuclide of various food samples and environmental samples such as radioactive fallout, airborne dust, tap water, sea water, soil, and seabed soil, were measured. In addition, the air radiation dose rates at several sites in Osaka prefecture were monitored.

We have continued additional monitoring after the accident at Fukushima Daiichi Nuclear Power Plant in 2011. Furthermore, as North Korea conducted the sixth underground nuclear test, the additional monitoring was conducted from 3rd September 2017 to 12th September 2017, according to the instructions of the Nuclear Regulatory Agency.

Key words: environmental radioactivity, gross beta activity, radionuclide analysis, environmental gamma activity

Production of a novel monoclonal antibody applicable for an immunochromatographic assay for *Kudoa septempunctata* spores contaminating the raw olive flounder (*Paralichthys olivaceus*)

M. JINNAI^a, T. KAWAI^b, T. HARADA^b (他 9 名)

International Journal of Food Microbiology, 259, 59-67 (2017)

ヒラメに寄生する粘液胞子虫の 1 種、*Kudoa septempunctata* (ナナホシクドア) は、その寄生ヒラメの生食により食中毒を起こす。ナナホシクドアの寄生は肉眼では観察できないため、寄生の有無を確認するための検鏡法や遺伝子検出法が開発されたが、現行の方法は高価な機器、熟練した検査員および長い検査時間を要した。そこで我々は、食品市場、スーパーマーケットやレストラン等の流通現場で簡単に寄生魚の判別を可能にさせるイムノクロマトグラフィ（イムノクロマト）法の開発を目的に、ナナホシクドア特異的モノクローナル抗体を作出した。

作出した抗体を用いたイムノクロマト法は、15分以内に 2.0×10^4 個以上のナナホシクドアが寄生したヒラメ筋肉を検出した。この検出限界値は、食品衛生法上の規制値 ($>1 \times 10^6$ 個) よりも 50 倍高く、感度的に問題がないことがわかった。一方、特異性試験の結果、*K. lateolabracis* と *K. iwatai* の胞子に弱い交差反応を示したが、前者はヒラメに寄生するもののその寄生魚は筋肉融解を起こすために流通されることは考えにくく、後者はヒラメに寄生しないため、特異性についても問題はないと考えられた。以上の結果、本イムノクロマト法は流通現場での使用が可能であると示唆された。

イムノクロマト法に用いた抗体は、胞子構成細胞のうち、極嚢細胞に主として存在し胞子原形質細胞にも存在する約 24 kDa のタンパクに反応することがわかった。

a 神奈川県衛生研究所

b 大阪健康安全基盤研究所微生物部細菌課

ヒラメに寄生した *Kudoa septempunctata* 胞子を検出するためのイムノクロマトグラフィ法に応用可能な新規モノクローナル抗体の作出

Comparison of listeriolysin O and phospholipases PlcA and PlcB activities, and initial intracellular growth capability among food and clinical strains of *Listeria monocytogenes*

M. KANKI, H. NARUSE and K. KAWATSU

Journal of Applied Microbiology, 124, 899-909 (2018)

ヒト腸管上皮細胞へ侵襲した *Listeria monocytogenes* の一次食胞からの脱出能力において菌株間で差があるかを評価した。食品由来株と臨床由来株について、食胞脱出に関連する病原因子であるリステリオリシン O (LLO)、ホスホリパーゼ PlcA および PlcB のアミノ酸配列と活性を解析し、次いで Caco-2 培養細胞内での各菌株の初期細胞内増殖能を測定した。その結果、LLO 活性に関して食品由来株と臨床由来株、または血清型間で差は見られなかったが、LLO 短縮型変異株による溶血活性および細胞内増殖は認められなかった。血清型 4b/4e と 1/2b 株の PlcA および PlcB 活性は血清型 1/2a と 1/2c 株の活性より有意に低い値を示した。しかしながら、血清型 1/2b 株は 4b/4e および 1/2a 株より有意に高い細胞内増殖能を示した。LLO、PlcA、PlcB の制御因子である PrfA の短縮型変異株は LLO および両ホスホリパーゼ活性、細胞内増殖能のすべてが消失していた。以上のことから、PlcA および PlcB の表現型の違いにより食胞からの脱出能に差が生じるかは不明であるが、LLO および PrfA の変異は本菌の細胞内増殖に大きな影響を与えることが判明した。本研究により、一次食胞からの脱出能が低下した弱毒性リステリア菌は食品には広く分布していないことが推測された。

大阪健康安全基盤研究所微生物部細菌課

食品由来および臨床由来リステリア・モノサイトゲネス株におけるリステリオリシン O およびホスホリパーゼ PlcA と PlcB 活性と初期細胞内増殖能の比較

Prevalence and antimicrobial susceptibility of
Enterobacteriaceae isolated from retail pepper in
Vietnam

T. HARADA^a, R. YAMANE^b, V. C. DANG^c, D. P.
NGUYEN^c, T. A. D. NGUYEN^c, M. JINNAI^a, S.
YONOGI^a, R. KAWAHARA^a, M. KANKI^a, T.
KAWAI^a, K. KAWATSU^a, Y. KUMEDA^a, Y.
ISEGAWA^b and Y. YAMAMOTO^a

Journal of Food Protection, 80(5), 716-724 (2017)

2014年2月から2015年3月にベトナム国内で
小売りされたコショウ 84 検体について腸内細菌
科菌群定性および定量試験、サルモネラ属菌定
性試験および分離株の薬剤感受性試験と薬剤耐
性遺伝子の検出を行った。

ISO 6579 または ISO21528 に準じた方法では、
Salmonella spp.、*Enterobacter cloacae* complex、
Escherichia coli、*Klebsiella pneumoniae*、
Cronobacter sakazakii の検出率は 6.0%、35.7%、
14.3%、42.9%、22.6%であった。ホスホマイシン
(FOM)耐性株は *E. cloacae* complex で 30 株中 11
株、*K. pneumoniae* で 36 株中 18 株、*C. sakazakii*
で 19 株中 11 株であった。

一方、セフトキシム(CTX)耐性大腸菌群のスク
リーニングでは、*E. cloacae* complex、*K.*
pneumoniae、*C. sakazakii* の検出率は 25.0%、9.5%、
1.2%であった。CTX、セフトジジムあるいはセ
フトドキシムに中間以上を示した株は、*E.*
cloacae complex で 23 株中 7 株、*K. pneumoniae*
で 8 株中 7 株であった。また、シプロフロキサ
シンには *E. cloacae* complex の 1 株および *K.*
pneumoniae の 2 株が中間以上を示した。FOM 耐
性株は *E. cloacae* complex で 6 株、*K. pneumoniae*
で 2 株であった。

さらに、分離された薬剤耐性株より、ESBL 遺
伝子、プラスミド性のニューキノロン耐性遺伝
子や FOM 耐性遺伝子が検出された。

a 大阪健康安全基盤研究所微生物部細菌課

b 武庫川女子大学

c ホーチミン公衆衛生医療院

ベトナムで市販されたコショウの腸内細菌科菌群汚
染実態と分離株の薬剤感受性

Development of a rapid immunochromatographic
assay to detect contamination of raw oysters with
enteropathogenic *Vibrio parahaemolyticus*

J. SAKATA^a, T. YONEKITA^b and K. KAWATSU^a

International Journal of Food Microbiology, 264,
16-24 (2018)

食品の病原性腸炎ビブリオ (enteropathogenic
Vibrio parahaemolyticus) 汚染を簡便、迅速に検
出するため、病原性腸炎ビブリオのマーカーで
ある耐熱性溶血毒 (TDH)と TDH 類似溶血毒素
(TRH)を簡易に検出できるイムノクロマトキ
ット (TDH/TRH-イムノクロマト) を開発し、
これを用いた検査法を構築した。

開発した TDH/TRH-イムノクロマトは、TDH
と TRH の各毒素を、15 分以内に高感度 (1
ng/mL) で検出することが可能であった。また、
TDH/TRH-イムノクロマトと新たに考案した増
菌培地である mSPP 培地を併用した検査法を用
いて、病原性株を添加した生カキを検査したと
ころ、カキ 25 g あたり 1.1~22 CFU の感度で病
原性腸炎ビブリオ汚染を検出することが可能
であった。

TDH/TRH-イムノクロマトと mSPP 培地を組
み合わせた検査法は、増菌培養時間を含めて 8.5
時間以内に検査結果が得られることから、水産
食品の病原性腸炎ビブリオ汚染の検出法とし
て有用であると考えられた。

a 大阪健康安全基盤研究所微生物部細菌課

b 日本ハム株式会社中央研究所

水産食品における病原性腸炎ビブリオ汚染の迅速検
査法の開発

Food-borne outbreak of group G streptococcal pharyngitis in a school dormitory in Osaka, Japan

T. YAMAGUCHI^a, R. KAWAHARA^a, C. KATSUKAWA^a, M. KANKI^a, T. HARADA^a, S. YONOGI^a, S. IWASAKI^b, H. UEHARA^c, S. OKAJIMA^b, H. NISHIMURA^a, K. MOTOMURA^a, M. MIYAZONO^d, Y. KUMEDA^c and K. KAWATSU^a

Journal of Clinical Microbiology,

56, 5, e01884-17, doi:10.1128/JCM.018824-17 (2018)

大阪府内にある学校（寮併設）の給食施設において、学生 227 名および教員 2 名のうち、140 名が咽頭痛、発熱、頭痛等を発症し、その内、19 名および調理従事者 1 名、給食残品 2 検体から G 群溶血性レンサ球菌（以下、G 群溶レン菌）が検出されたため、所管保健所は本事例を G 群溶レン菌食中毒であると断定した。給食残品、患者および調理従事者からは 2 種類の G 群溶レン菌が検出された。給食残品、患者および調理従事者から検出された株は、それぞれ同一株であり、原因食品は G 群溶レン菌が検出された「ブロッコリーのおかか和え」と推定された。調理従事者からも G 群溶レン菌が検出されたが、調理従事者もこの原因食品を食べていたことから、調理従事者が汚染源であると特定することはできなかった。

呼吸器症状の集団感染事例においても、食中毒の可能性も含めて調査することが重要であると考えられた。

-
- a 大阪健康安全基盤研究所微生物部細菌課
b 大阪府四條畷保健所
c 大阪府中央卸売市場食品衛生検査所
d 大阪府富田林保健所
e 大阪府立大学研究推進機構微生物制御研究センター

大阪府の学生寮における G 群溶血性レンサ球菌咽頭炎食中毒について

Staphylococcal food poisoning caused by *Staphylococcus argenteus* harboring staphylococcal enterotoxin genes

Y. WAKABAYASHI^a, K. UMEDA^b, S. YONOGI^a, H. NAKAMURA^b, K. YAMAMOTO^b, Y. KUMEDA^c and K. KAWATSU^a

International Journal of Food Microbiology, 265, 23-29 (2018)

ブドウ球菌食中毒は食品中で産生されたブドウ球菌エンテロトキシン (SE) を摂取することで発症する。ほとんどの事例では SE 産生性の *Staphylococcus aureus* が原因となる。2014 年と 2015 年に大阪府で発生した 2 事例のブドウ球菌食中毒では、それぞれ *S. aureus* とは異なる色素非産生ブドウ球菌が主に分離された。患者便検体、調理従事者便検体、食品検体、および調理施設の拭取り液から分離された色素非産生ブドウ球菌のパルスフィールドゲル電気泳動像は各事例内で一致していた。いずれの分離菌株も複数の SE 遺伝子 (*seb*, *seg*, *sei*, *sem*, *sen*, *seo*, *selu2*) を保有しており、逆受身ラテックス凝集試験で SEB を産生することが確認された。この色素非産生ブドウ球菌はコアグラゼ陽性で、生化学性状は *S. aureus* の性状と一致したが、我々は耐熱性ヌクレアーゼ遺伝子の塩基配列解析および多座配列タイピング (MLST) 法の結果から、*S. aureus* に近縁の *S. argenteus* と同定した。以上の結果から、我々はこの食中毒 2 事例は、SE 遺伝子を保有する *S. argenteus* によるブドウ球菌食中毒であったと結論付けた。

-
- a 大阪健康安全基盤研究所微生物部細菌課
b 大阪健康安全基盤研究所微生物部微生物課
c 大阪府立大学 21 世紀科学研究センター
ブドウ球菌エンテロトキシン遺伝子を保有する *Staphylococcus argenteus* によるブドウ球菌食中毒事例

An infant with acute gastroenteritis caused by a secondary infection with a Rotarix-derived strain

N. SAKON^a, R. MIYAMOTO^b and J. KOMANO^c

European Journal of Pediatrics,
179(9), 1275-1278 (2017)

ロタウイルスワクチンはロタウイルスによる重症下痢症を減少させている。ワクチンは生ワクチンで Rotarix と RotaTeq の 2 つが存在し、接種者の腸内で増殖する。このことは、二次的にワクチン未接種者へのワクチン効果をもたらさず。いっぽうで、病原性復帰の危険性も考えなければならない。今回、ロタウイルス非流行期に、基礎疾患のない小児の重症ロタウイルス感染症例を経験した。患者便および培養株の全ゲノムシーケンシングにより、ウイルスゲノムセグメントの全てが、病原性に関連し得るウイルス遺伝子における 5 つのアミノ酸突然変異を除いて、Rotarix 株のものと非常に類似しているウイルスを検出した。胃腸症状は報告されていないが、この患者の兄弟がこの患者の病気の発症前に Rotarix を投与されていた。疫学的データ、接触歴の証拠、およびゲノム解析により、ワクチンウイルスがワクチン接種者から患者に伝達され、下痢症を引き起こした可能性を示した。

ワクチンの病原性復帰マーカーはなく、ワクチン由来の二次感染に起因する急性の重症下痢症の可能性のあることから、ロタウイルス感染の分子サーベイランスは重要である。

High transmissibility of norovirus among infants and school children during the 2016/17 season in Osaka, Japan

N. SAKON^a, J. KOMANO^b, H. L. TESSMER^c
and R. OMORI^c

Eurosurveillance, 23(6),
<https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2018.23.6.18-00029>, 2018

2016/17シーズンの大阪府管内の小学校におけるヒト-ヒト感染による集団胃腸炎患者数 (n = 4,712人) は、2012/13シーズン以降最大であった。本シーズンの流行は、保育所で53事例(1,927人)、幼稚園で18事例(1,086人)、小学校で30事例(1,699人)の合計101事例であった。集団胃腸炎の中で最も優勢な遺伝子型は、GII.P16-GII.2 (57.4% ; 58/101)、次いでGII.P2-GII.2 (8.9% ; 9/101) およびGII.P7-GII.6 (5.9% ; 6/10) であった。過去数年間、主要な遺伝子型であるGII.4は本シーズン、小児の集団胃腸炎からは検出されなかった。

a 大阪健康安全基盤研究所微生物部ウイルス課

b 吹田市民病院小児科

c 名古屋医療センター

ロタウイルスワクチン Rotarix 由来の二次感染による急性胃腸炎症例

a 大阪健康安全基盤研究所微生物部ウイルス課

b 名古屋医療センター

c 北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター

2016/17シーズン、大阪における小児間で流行した高伝播性ノロウイルス

Global spread of norovirus GII.17 Kawasaki 308,
2014-2016

M. C. W. CHAN^a, Y. HU^b, H. CHEN^b,
A. T. PODKOLZIN^c, N. SAKON^d, Y.
POOVORAWAN^e, J. HEWITT^f, J. VINJE^g, X. L.
PANG^h, M. P. G. KOOPMANS^{ij} and P. K. S. CHAN^a
(他 20 名)

Emerging Infectious Diseases, 23(8), 1359-1354
(2017)

世界 13 ヶ国から検出されたノロウイルス GII.17 Kawasaki 308 様株のキャプシド完全長配列の解析を実施した。ノロウイルス GII.17 Kawasaki 308 は世界的に流行したが、2014 年後半に中国において出現した GII.17 株を起源とした単一のハプロタイプであることが明らかになった。新しいサブライン SL2 は世界的に検出され、SL3 は 2016 年に中国で流行する系統であった。

Molecular evolution of the RNA-dependent RNA
polymerase and capsid genes of human norovirus
genotype GII.2 in Japan during 2004-2015

F. MIZUKOSHI^a, K. NAGASAWA^b, Y. H.
DOAN^c, K. HAGA^d, S. YOSHIZUMI^e, Y. UEKI^f,
M. SHINOHARA^g, M. ISHIKAWA^h, N. SAKONⁱ,
N. SHIGEMOTO^j, R. O. NAKAGAWA^k, A. OCHI^l,
K. MURAKAMI^b, A. RYO^m, Y. SUZUKIⁿ, K.
KATAYAMA^d and H. KIMMURA^{b,m}

Frontiers in Microbiology, 8, 705,
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00705>, 2017

2004 年から 2015 年にかけて日本で検出されたノロウイルス GII.2 について、RdRp 領域と VP1 領域の塩基配列を次世代シーケンサーで決定した。Bayesian Markov chain Monte Carlo methods を用いて進化系統樹解析を実施した。GII.2 は GII.P2、GII.P12、GII.P16、GII.Pe の 4 種類の RdRp を持つ 4 系統が存在した。

変異率は 10^{-3} substitutions/site/year と高く、VP1 の変異は RdRp の種類に依存している。GII.2 の進化 (抗原性の変化) には RdRp のリコンビネーションによって維持されているかもしれない。

-
- a 香港中文大学
 - b 復旦大学
 - c 疫学中央リサーチ研究所
 - d 大阪健康安全基盤研究所
 - e チュラーロンコーン大学
 - f 環境科学研究機構
 - g 米国疾病予防管理センター
 - h アルバータ大学
 - i エラスムス医療センター
 - j 国立公衆衛生科学研究所

2014 年から 2016 年におけるノロウイルス GII.17
Kawasaki 308 株の世界的な広まり

-
- a 栃木県保健環境センター
 - b 国立感染症研究所感染症情報センター
 - c 国立感染症研究所ウイルス第二部
 - d 北里大学
 - e 北海道立衛生研究所
 - f 宮城県保健環境センター
 - g 埼玉県衛生研究所
 - h 川崎市健康安全研究所
 - i 大阪健康安全基盤研究所
 - j 広島県立総合技術研究所保健環境センター
 - k 山口県環境保健センター
 - l 愛媛県立衛生環境研究所
 - m 横浜市立大学
 - n 名古屋市立大学

2004 年から 2015 年にかけて日本で検出されたノロ
ウイルス GII.2 の RdRp と VP1 の分子進化解析

核酸精製を必要としない one-step リアルタイム PCR によるノロウイルス検査の有用性

左近直美

食品微生物学会雑誌, 34(2), 135-139 (2017)

ノロウイルスを原因とする食中毒は日本国内で毎年 1 万人以上の患者を出している。ノロウイルスに感染した調理従事者による食品の二次汚染が原因となる。調理従事者の感染は職場内での集団発生へのリスクにもなる。食中毒事例ではしばしば不顕性感染者が存在し、食品汚染の原因となる。そこで、ノロウイルスによる食中毒対策として調理従事者のノロウイルス検査実施に努めることとなっている。そのためには、検査に要する費用、迅速性を考慮しなければならない。そこで、核酸精製が不要な one-step リアルタイム PCR について評価した。

通知法と同等以上の感度を有し、迅速で簡便な方法であったことから、調理従事者のノロウイルス検査がより実施されやすくなることが期待され、その結果、ノロウイルス食中毒の発生リスク軽減に寄与すると考えられた。

Phylogeny and immunoreactivity of norovirus GII.P16-GII.2, Japan, winter 2016-17

K. NAGASAWA^a, Y. MATSUSHIMA^b,
T. MOTOYA^c, F. MIZUKOSHI^d, Y. UEKI^e,
N. SAKON^f, K. MURAKAMI^a, T. SHIMIZU^b,
N. OKABE^b, N. NAGATA^c, K. SHIRABE^g,
H. SHINOMIYA^h, W. SUZUKIⁱ, M. KURODA^a,
T. SEKIZUKA^a, A. RYO^j, K. FUJITA^k, K. OISHI^a,
K. KATAYAMA^l and H. KIMURA^{aj}

Emerging Infectious Diseases, 24(1), 144-148 (2018)

2016から2017年にかけての冬季シーズン、ヒトノロウイルスGII.P16-GII.2 (2016株) が国内で大流行した。分子系統樹解析によって、2016株は、2010-2012年のGII.2を由来としていることが示唆された。また、イムノクロマト反応では2016株と2016年以前のGII.2は同様の反応性を示した。このことから、流行株の抗原性は大きく変化していないことが推察された。

大阪健康安全基盤研究所微生物部ウイルス課
Evaluation of nucleic acid purification-free one-step
real-time PCR kit for norovirus infection

a 国立感染症研究所
b 川崎市健康安全研究所
c 茨城県衛生研究所
d 栃木県保健環境センター
e 宮城県保健環境センター
f 大阪健康安全基盤研究所微生物部ウイルス課
g 山口県環境保健センター
h 愛媛県立衛生環境研究所
i 栄研化学株式会社
j 横浜市立大学
k 群馬パース大学
l 北里大学
2016-17 冬季に日本において検出された GII.P16-GII.2
の分子系統解析と抗原反応

Genetic analysis of human norovirus strains in Japan in 2016-17

K. NAGASAWA^{a,b}, Y. MATSUSHIMA^c,
T. MOTOYA^d, F. MIZUKOSHI^e, Y. UEKI^f,
N. SAKON^g, K. MURAKAMI^a, T. SHIMIZU^c, N.
OKABE^c, N. NAGATA^d, K. SHIRABE^h, H.
SHINOMIYAⁱ, W. SUZUKI^j, M. KURODA^a, T.
SEKIZUKA^a, Y. SUZUKI^k, A. RYO^l, K. FUJITA^m,
K. OISHI^a, K. KATAYAMAⁿ and H. KIMURA^{a,l,m}

Frontiers in Microbiology, 9, 1,
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00001>, 2018

2016 から 2017 年にかけての冬季シーズン、ヒトノロウイルス GII.P16-GII.2 (2016 株) が国内で大流行した。流行要因解析のため VP1 と RdRp 領域について進化系統樹解析を実施した。2016 株の VP1 は 2006 年、RdRp 領域は 1996 年を起源としていた。両領域の変異率は 10^{-3} substitutions/site/year と計算された。P2 ドメインのエピトープ上に存在する 341 番目のアミノ酸は 2016 年以前の株とは異なっていた。ベイジアン・スカイライン・プロット解析では、GII.2 株の VP1 遺伝子の有効集団サイズは 50 年ではほぼ一定であったが、2016 年に NoV GII.2 の患者数は増加した。2016 株は将来、日本や他の地域でのアウトブレイクに関与する可能性がある。

a 国立感染症研究所

b 千葉大学

c 川崎市健康安全研究所ウイルス第二部

d 茨城県衛生研究所北里大学

e 栃木県保健環境センター

f 宮城県保健環境センター

g 大阪健康安全基盤研究所微生物部ウイルス課

h 山口県環境保健センター

i 愛媛県立衛生環境研究所

j 栄研化学株式会社

k 名古屋市立大学

l 横浜市立大学

m 群馬パース大学

n 北里大学

2016-17 冬季に日本において検出されたヒトノロウイルスの分子系統解析

「アストロウイルス科」

左近直美^a, 藤井理津志^b, 大瀬戸光明^c

病原細菌・ウイルス図鑑, 824-829 (2017)

1. 分類・歴史
2. ビリオン
3. ゲノム
4. 物理化学的性状
5. 抗原の性状
6. 培養
7. 増殖
8. 病原性
9. 実験室内診断
10. 疫学
11. 治療
12. 予防

a 大阪健康安全基盤研究所微生物部ウイルス課

b 元岡山県環境保健センター

c 元愛媛県立衛生環境研究所

Family *Astroviridae*

Antiviral activity of acid beta-glucosidase 1 on enterovirus 71, a causative agent of hand, foot and mouth disease

K. NAKATA^a, S. TAKEDA^b, A. TANAKA^c,
J. KWANG^d and J. KOMANO^e

Journal of General Virology, 98(4), 643-651 (2017)

エンテロウイルス 71 (EV71) は手足口病の原因となる。EV71 は発熱、発疹等の症状の他に急性脳炎・脳症や死亡等を引き起こすことがある。現在、EV71 感染に対する治療方法はない。本研究では、cDNA ライブラリースクリーニングを実施し、EV71 耐性因子として β グルコシダーゼ 1 (GBA1) を同定した。遺伝子導入およびノックダウン実験により、GBA1 の抗 EV71 活性を確認した。ゴーシェ病の治療薬で、組換えヒト GBA1 を有効成分とする分子薬物 (セレザイム) は抗 EV71 感染効果を示した。リソソーム内在性膜タンパク質 2 (LIMP-2) として知られるスカベンジャー受容体クラス B メンバー 2 (SCARB2) は外因性 GBA1 細胞表面の発現レベルを抑制した。また、細胞外部の SCARB2 と EV71 の相互作用を阻害した。本研究により GBA1 が EV71 感染の治療のための新規の分子標的であることが示唆された。

海外での感染が疑われた患者からの
EV-D68 家族内感染事例

中田恵子^a, 上林大起^a, 森川佐依子^a, 大塚真紀^a

病原微生物検出情報, 39(1), 9-11 (2018)

エンテロウイルス D68 型 (EV-D68) は、ピコルナウイルス科エンテロウイルス属のエンベロープを持たない RNA ウイルスで、わが国では 2015 年秋頃に EV-D68 が検出された患者報告が相次ぎ、急性弛緩性麻痺、重症呼吸器不全、気管支喘息との関連が疑われた。

今回、わが国が EV-D68 非流行年であると考えられる 2017 年 9 月に帰国直後から上気道炎を発症した成人男性より EV-D68 を検出し、また、その後次々と家族内で感染したと考えられる事例を経験したので報告する。初発患者は 30 代男性、2017 年 9 月 7 日に出国し、9 月 8 日～10 日にかけてインドおよびマレーシアを旅行して 9 月 11 日に帰国した。症例は帰国翌日に発症していることから、国外での感染が疑われた。染が拡大し、1 歳児にも症状が認められた。発症者全員軽症であり、1 歳児が集団保育前であったことから感染が広がることはなかったと考えられる。症例から検出した EV-D68 の分子系統樹解析の結果 CladeB の Subclade3 であった。CladeB の EV-D68 感染は世界中で重症の呼吸器症状のみならず、急性弛緩性麻痺との関連が疑われている。帰国後すぐに症状があっても成人の軽度の呼吸器症状では EV-D68 感染を疑うことは稀である。現在のわが国のサーベイランスシステムでは、このような事例を捕捉することは困難であることから、流行を防ぐためには、軽度の呼吸器症状であったとしても周囲への感染防止対策には細心の注意を払う必要があると考えられた。

a 大阪健康安全基盤研究所微生物部ウイルス課

b 国立感染症研究所エイズ研究センター

c 大阪大学微生物研究所

d シンガポール国立大学テマセック生命科学研究所

e 名古屋医療センター

手足口病の原因となるエンテロウイルス 71 型に対する β グルコシダーゼ 1 の抗ウイルス活性

a 大阪健康安全基盤研究所微生物部ウイルス課

A family cases report of suspected import infection of EV-D68

Surveillance of adenovirus respiratory infections
in children from Osaka, JapanS. HIROI^a, S. MORIKAWA^a, K. NAKATA^a
and T. KASE^{a, b}Japanese Journal of Infectious Diseases,
70, 666-668 (2017)

小児のウイルス性呼吸器感染症の原因のうち、アデノウイルスは3-5%を占めることが知られている。本研究は大阪府の病原体サーベイランスで2008年から2015年の間に139人の小児の呼吸器検体から分離されたアデノウイルスについて、その流行状況を明らかにすることを目的とした。

遺伝子解析の結果、B-E種のアデノウイルスが検出され、B種およびC種が流行の中心であった。分離株数は4-7月と12月に増加する傾向で、B種は夏に、C種は春に検出数が多かった。型別では、B種3型が最も多く分離され、次いでC種2型であった。C種1型と2型の重感染も1例確認された。D種は主に結膜炎の原因ウイルスとして知られており、本研究では37型と53型が1例ずつ検出された。年齢の上昇と共にC種の検出割合が減少し、学童期の小児ではB種の検出割合も減少してE種4型の割合が高くなっていった。患者の年齢は1ヶ月齢から12歳で、1歳が最も多く、5歳以下が全体の91.9%を占めた。性別は男女どちらもほぼ同数で差は認められなかった。

本研究の結果から、年齢によって流行の中心となる種が異なることが明らかとなった。多くの小児は学童期までにB種およびC種に対する免疫を獲得すると考えられる。本研究の例では認められなかったが、同種間の重感染は新たな組み換え型ウイルスを生む可能性があるため注意が必要である。アデノウイルス感染症は重症化することもあるため、今後も継続的なサーベイランスが必要である。

a 大阪健康安全基盤研究所 b 大阪市立大学
大阪府における小児の呼吸器アデノウイルス感染症
サーベイランス

関西国際空港の麻疹事例の検査結果から
得られた知見倉田貴子^a, 本村和嗣^a

臨床とウイルス, 46(1), 5-10 (2018)

大阪府内で発生した関西国際空港事業所を中心とする麻疹の集団発生は、2016年8月中旬から患者発生が見られ、9月29日に終息宣言が出された。この間に33名の空港職員が麻疹を発症した。大阪健康安全基盤研究所の検査では、空港職員の麻疹陽性患者33名中28名を検出した。当所での検査は、2016年8月26日～9月30日までの期間に大阪府内（堺市、大阪市を除く）で麻疹の発生届があった全事例、および関西国際空港での集団発生の健康観察者で微熱や不明瞭な発疹など非特異的な症状を呈した事例も対象とした。検査には血液、咽頭拭い液、尿の3点を用い、病原体検出マニュアルに従ってPCR検査を行った。当該期間に定量PCRを行った184症例のうち空港職員で陽性となった事例は28例（15.2%）であった。遺伝子型は28例のうち24例がH1、4例が型別不能であった。当所で検出された遺伝子型H1のN遺伝子の配列はすべて同一で単系統群を形成しており、同一のウイルスによる集団発生であったと考えられた。麻疹は2015年3月に国内からの排除が達成されており、現在日本国内で報告される麻疹患者のほとんどは海外からの持ち込み事例や、その関連事例である。今回の集団発生で検出されたH1型麻疹ウイルスは、中国やモンゴルで報告が多い遺伝子型であり、海外から持ち込まれたウイルスである可能性が高い。不特定多数の人が往来する国際空港は海外と日本との境界線上にあり、空港で勤務する職員は麻疹患者との接触歴が不明のまま麻疹ウイルスの暴露を受けるリスクがある。今後東京オリンピックなど海外からの渡航者の増加に備えて、空港職員への麻疹含有ワクチン2回接種推奨や啓発活動は、国内での麻疹発生防止に役立つと考えられた。

a 大阪健康安全基盤研究所微生物部ウイルス課
Laboratory findings from the measles outbreak at Kansai
International Airport, 2016

成人における風疹 IgM 抗体価の
診断的価値について

倉田貴子^a, 内野清子^a, 堀田千恵美^c,
小倉 惇^c, 三好龍也^a, 田中智之^a, 小川知子^c,
弓指孝博^a, 上林大起^a, 駒野 淳^d

病原微生物検出情報, 39(3), 37-38 (2018)

(RV) 特異的 IgM 抗体は WHO によると発疹出現後 4~28 日の患者血清で陽性になるとしている。しかし、日本で 2012~2013 年におきた成人を中心とする風疹流行では、発疹出現後 4 日も IgM 抗体の上昇が認められない事例が相次ぎ、臨床現場を混乱させた。過去の報告は風疹診断が核酸検査に基づいておらず、患者集団も小児が中心で、IgM 抗体の診断的意義については検討の余地がある。本研究では核酸検査で風疹と確定した成人症例の風疹 IgM 抗体の診断的価値に与える因子を解析した。発疹出現日を発症日とした場合、RV 特異的 IgM 抗体価は経時的に増加し、IgM 陽性症例の割合は発症当日~2 日目は 22.1~33.3%で推移したが、3 日目には 61.5%と有意に上昇し ($p<0.01$)、5 日目以降は 80.0%に達した。判定保留症例は発症後 2 日目に 15.7%で最大となった。RV 特異的 IgM 抗体検査の陽性率は発疹出現後 2 日間が最も難しく、核酸検査との併用が特に望ましいと考える。診断的価値が高まるのは発疹出現後 3 日目以降で、より確実に診断根拠とするためには 5 日目以降の検査が望ましいと思われた。

a 大阪健康安全基盤研究所微生物部ウイルス課

b 堺市衛生研究所 c 千葉県衛生研究所

d 名古屋医療センター

Diagnostic value of rubella IgM antibody testing in adults

Impact of coxsackievirus A6 emergence on hand,
foot, and mouth disease epidemic in Osaka City,
Japan

D. KANBAYASHI^{a,b}, A. KAIDA^a, S. P.
YAMAMOTO^{ab}, Y. HIRAI^a, H. KUBO^a, R.
FUJIMORI^c, N. HAKUI^c, H. HIROKAWA^c and N.
IRITANI^a

Journal of Medical Virology, 89(12), 2116-2121
(2017)

近年、日本国内では 1981 年の調査開始以来最大規模の手足口病流行が隔年で発生している。大阪市における 2011 年、2013 年、2015 年の手足口病患者の報告数は、それぞれ 4,210 人、4,211 人、6,386 人と全国での発生動向と同様に隔年での大きな流行が確認された。各流行年に報告された患者からは、主にコクサッキーウイルス A6 (CV-A6) が検出された。検出された CV-A6 の viral protein 1 (VP1) 領域全長 (915bp) の核酸配列を用いて系統樹解析した結果、2011 年から 2015 年にかけて大阪市において検出された CV-A6 株は、1999 年から 2009 年にかけて日本で検出された CV-A6 株と比較し異なる Clade に分類された。また、2011 年に検出された CV-A6 株と、2013 年から 2015 年にかけて検出された CV-A6 株は異なる genetic group に分類された。各流行年に検出された CV-A6 株は、VP1 領域の中でも特にウイルス粒子の表面に位置していると考えられる DE、EF、GH loop 領域に特徴的なアミノ酸変異を有していた。ウイルス粒子表面の変異や感受性集団の蓄積が近年の手足口病の流行に関与している可能性がある。

a 大阪府立環境科学研究所調査研究課微生物保健グループ

b 大阪府立公衆衛生研究所感染症部ウイルス課

c 大阪市保健所感染症対策課感染症グループ

大阪市における手足口病の流行に Coxsackievirus A6 が与えた影響

A novel cell-based high throughput assay to determine neutralizing antibody titers against circulating strains of rubella virus

D. KANBAYASHI^a, T. KURATA^a, K. TAKAHASHI^a, T. KASE^a and J. KOMANO^b

Journal of Virological Methods, 252, 86-93 (2018)

風疹ウイルス (Rubella virus, RV) は Togavirus 科 Rubivirus 属に属する RNA ウイルスである。日本では、2013 年に風疹流行が起こり、14,344 例の風疹患者、45 例の先天性風疹症候群患者が報告された。この流行は、主に遺伝子型 2B に分類される RV によって引き起こされた。この遺伝子型の RV は、これまで殆ど日本において検出されてこなかった。

感染防御能の評価を行う際、厳密には市中流行株に対する中和試験によって判断すべきであるが、RV の起こす CPE は弱く中和抗体価の定量が煩雑である為、ワクチン株を抗原にした HI 抗体価が集団免疫を評価する指標として用いられてきた。本研究では、RK13 (Rabbit Kidney 13) 細胞を基盤とする ISRE (Interferon-sensitive response element) レポーター細胞 (RK13ISREluc) を構築し、RK13ISREluc を用いてワクチン株並びに遺伝子型 2B 株に対する中和抗体保有率を調査した (N=101)。中和抗体価 8 倍をカットオフ値とすると、ワクチン株に対する中和抗体保有率は 85.2%であったのに対して、遺伝子型 2B 株に対する中和抗体保有率は 50.5%であった。

a 大阪健康安全基盤研究所微生物部ウイルス課
b 国立病院機構名古屋医療センター統括診療部臨床検査科
風疹ウイルスの新規中和抗体価測定系の確立

Molecular epidemiology of rubella virus strains detected around the time of the 2012-2013 epidemic in Japan

Y. MORI^a, M. MIYOSHI^b, M. KIKUCHI^c, M. SEKINE^d, M. UMEZAWA^e, M. SAIKUSA^f, Y. MATSUSHIMA^g, M. ITAMOCHI^h, Y. YASUIⁱ, D. KANBAYASHI^j, T. MIYOSHI^k, K. AKIYOSHI^l, C. TATSUMI^m, S. ZAITSUⁿ, M. KADOGUCHI^{o,p}, N. OTSUKI^q, K. OKAMOTO^a, M. SAKATA^a, K. KOMASE^a and M. TAKEDA^a

Frontiers in Microbiology, 9(8), 1513 (2017)

日本では 2012 年から 2013 年にかけて全国的な風疹流行が発生し、約 17,000 例の風疹症例と、45 例の先天性風疹症候群の乳児が誕生した。本研究は、2012 年から 2013 年にかけて検出された風疹ウイルス (RV) の遺伝的特徴を明らかにすることを目的とする。2010 年から 2014 年の間に、日本の 14 都道府県から検出された 221 株を対象とし、時系列的かつ地理的にグループ分けして解析した。解析した 221 株の遺伝子型は、遺伝子型 2B 192 株 (87%)、遺伝子型 1E 26 株 (12%)、遺伝子型 1J 3 株 (1%) であった。遺伝子型 2B 株の大多数 (n = 184) は 2B-L1 系統に属し、東南アジアおよび東アジア諸国で検出された株と相同性があった。系統樹解析では、少なくとも 6 つの異なるクラスターの RV が 2010 年から 2014 年にかけて日本で流行を引き起こしたことが示された。本結果は、RV が近隣諸国から何度も日本に持ち込まれたことを示唆している。

a 国立感染症研究所ウイルス第三部 b 北海道立衛生研究所 c 札幌市衛生研究所 d 仙台市衛生研究所 e 茨城県衛生研究所 f 横浜市衛生研究所 g 川崎市衛生研究所 h 富山県衛生研究所 i 愛知県衛生研究所 j 大阪健康安全基盤研究所 k 堺市衛生研究所 l 神戸市環境保健研究所 m 島根県保健環境科学研究所 n 福岡市保健環境研究所 o 熊本市環境総合センター p 熊本市市民病院 q 国立感染症研究所 感染症情報センター
2012 年から 2013 年の風疹流行時に検出された風疹ウイルス株の分子疫学解析

Mitochondrial damage elicits a TCDD-inducible poly (ADP-ribose) polymerase-mediated antiviral response

T. KOZAKI^{ab}, J. KOMANO^c, D. KANBAYASHI^d, T. MISAWA^b, T. SATOH^b, O. TAKEUCHI^c, T. KAWAI^f, S. SHIMIZU^g, Y. MASTUURA^b, S. AKIRA^b and T. SAITOH^{ab}

Proceedings of the National Academy of Sciences, 114(10), 2681-2686 (2017)

自然免疫系は、パターン認識受容体 (PRR) によって RNA ウイルスを感知し、宿主をウイルス感染から保護する。PRR は、免疫調節因子の産生を媒介し、RNA ウイルスの排除を指示する。本研究では、抗ウイルス応答を仲介する独自の PRR を示す。システイン 3 ヒスチジン (CCCH) 型ジンクフィンガータンパク質であるテトラクロロジベンゾ-p-ダイオキシシン (TCDD) 誘導性ポリ (ADP リボース) ポリメラーゼ (TIPARP) はジンダーフィンドメインを介してシンドビスウイルス (SINV) RNA に結合し、エキソソームでウイルス RNA 分解を誘導する。TIPARP は、典型的には核内に局在するが、SINV 感染後に細胞質に蓄積し、細胞質の SINV RNA の標的化を可能にする。TIPARP の再分布は、細胞質-核輸送に影響する核細孔の活性酸素種 (ROS) 依存性酸化によって誘導される。BCL2 関連 X タンパク質 (BAX) および BCL2 アンタゴニスト/キラー1 (BAK1)、B 細胞白血病/リンパ腫 2 (BCL2) ファミリーメンバーは、SINV 感染後に ROS を生成するミトコンドリア損傷を媒介する。したがって、TIPARP は、BAX および BAK1 依存性ミトコンドリア損傷によって引き起こされる抗ウイルス応答を媒介するウイルス性 RNA を感知する PRR である。

a 徳島大学 b 大阪大学 c 国立病院機構名古屋医療センター d 大阪健康安全基盤研究所 e 京都大学 f 奈良先端科学技術大学院大学 g 東京医科歯科大学

ミトコンドリア損傷は、TCDD 誘導性ポリ (ADP-リボース) ポリメラーゼ媒介抗ウイルス応答を誘発する

What's your diagnosis?
見て！日本のパンケーキだよ！

西澤 徹^{a,b}, 谷浦武仁^b, 山田瑞穂^b, 青山幾子^c, 弓指孝博^c

総合診療, 28(2), 173-176 (2018)

突然発症した上気道症状からアナフィラキシーショックを疑った患者について、病歴、身体診察所見、初診時検査所見より、得られる診断名は何かを問う。

発症直前の情報より自炊のお好み焼き摂取が誘因と考慮され、追加検査にて非特異的 IgE 高値、ダニアレルゲン特異的 IgE 高値、その他小麦、卵、豚肉等の IgE はすべて正常範囲内、またアレルゲン検査被疑粉のお好み焼き粉より、多数のダニが観察されたことより、パンケーキ症候群と診断された症例を報告した。パンケーキ症候群は「ダニが混入した食物を摂取直後に重篤なアレルギー症状を呈する疾患」と定義されており、経口ダニアナフィラキシーとも呼ばれている。パンケーキ症候群は、海外ではパンケーキが原因のことが多いが、本邦では大部分がお好み焼き (82%) とたこ焼き (11%) が原因である。本症例では被疑粉に 5120 匹/g のコナヒョウヒダニが含有していた。タイトルは Mite (=ダニ) Japanese Pancake! (ダニお好み焼き) による。

a 関西医科大学総合医療センター

b 大和病院

c 大阪健康安全基盤研究所微生物部ウイルス課

What's your diagnosis? Mite! Japanese pancake!

A case of imported *Taenia asiatica* infection in Japan

H. NAMIKAWA^{a, b}, Y. TAKEMOTO^a, I. SHIMAZAKI^a, A. MAKUUCHI^a, M. KOBAYASHI^a, S. KINUHATA^a, K. YAMADA^b, H. FUJIMOTO^b, H. TOYODA^a, N. KAMATA^a, Y. TOCHINO^a, I. TERAMOTO^c, N. ABE^d, M. MORIMURA^a, H. KAKEYA^b and T. SHUTO^a

Japanese Journal of Infectious Diseases, 71(2), 170-171 (2018)

テニア科条虫症は、無鉤条虫、有鉤条虫およびアジア条虫が原因となる。わが国におけるアジア条虫の感染実態は不明であったが、2010年から2011年に関東地方で国産豚の肝臓の生食が原因と疑われる散発事例が相次いで発生し、国内での本条虫の分布が明らかとなっている。しかし、その輸入症例の報告は限られており、感染地や感染経路等も不明な点が多い。本研究では、アジア条虫による輸入症例を報告した。患者は在日フィリッピン人女性で、排便後にひも状白色物が便に付着しているのに気づき、軽度の腹部違和感もあったことから受診した。患者は約10カ月前にフィリッピンに一時帰国し、その滞在時に豚の生レバーを食していた。便中に排泄された片節の形態と食歴などからテニア科条虫症が疑われ、駆虫後に多くのストロビラと頭節が排泄された。頭節には鉤がなく無鉤条虫を疑ったが、遺伝子解析によりアジア条虫と同定された。患者は日本国内で、肉の生食経験がなかったことから、この症例は輸入症例と考えられた。アジア条虫は東アジア、東南アジア諸国に広く分布しており、今後同地からの旅行者による輸入症例は増加する可能性がある。

a 大阪市立大学医学部医療管理医学講座総合医学教育学

b 大阪市立大学医学部医療管理医学講座臨床感染制御学

c 大阪市立大学医学部都市医学講座寄生虫学

d 大阪健康安全基盤研究所微生物部微生物課

日本でのアジア条虫症の輸入症例

輸入 Queensland tick typhus (クイーンズランドマダニチフス) の一例

森村 歩^a, 白野倫徳^a, 小西啓司^a, 笠松 悠^a, 後藤哲志^a, 阿部仁一郎^b, 安藤秀二^c

病原微生物検出情報, 38(6), 123-124 (2017)

リケッチア感染症は世界各地に分布している。オーストラリアには紅斑熱群リケッチアの一種 *Rickettsia australis* による Queensland tick typhus (クイーンズランドマダニチフス) がある。本邦で初めて同定された Queensland tick typhus の輸入症例を経験したので報告する。患者はワーキングホリデーでオーストラリアのクイーンズランドに滞在していた。農作業後に左背部をマダニが吸血しているのに気づき、自分で取り除く際に口器がちぎれた。同日から刺し口が腫脹し、その後発熱、関節痛、リンパ節の腫脹が見られ、鎮痛薬を服用して帰国後に受診した。左大腿部に紅斑が認められた。病歴と身体所見からリケッチア感染症が疑われ抗菌薬の投薬治療が行われたが、治療前に全血と刺し口の生検材料が採取された。日本紅斑熱と *R. conorii* に対する抗体上昇が認められたことから、紅斑熱群リケッチアの感染と考えられ、皮膚組織抽出 DNA 液の PCR とそのシーケンス解析の結果、*R. australis* と同定された。本例は本邦初の確定診断がついた Queensland tick typhus の一例であるが、病歴上ダニ暴露が明らかで、症状とあわせてリケッチア感染症を想定することが比較的容易であった。訪日外国人旅行者数と出国日本人の数は増加しており、世界で発生しているリケッチア感染症の輸入例が増加する可能性があるため、ダニへの暴露歴を含めた詳細な問診が必要である。

a 大阪市立総合医療センター感染症内科

b 大阪健康安全基盤研究所微生物部微生物課

c 国立感染症研究所ウイルス第1部第5室

An imported case of Queensland tick typhus, 2016

Anisakis haemoglobin is a main antigen inducing strong and prolonged immunoreactions in rats

N. ABE^a and I. TERAMOTO^b

Parasitology Research, 116(7), 2035-2039 (2017)

Anisakis simplex (アニサキス・シンプレックス) が混じた生鮮または加熱不十分なシーフードを摂取した場合、急性の胃腸炎または蕁麻疹等のアレルギー症状を認めることがある。宿主が本幼虫に感染した場合、どのような抗原が免疫学的に強く認識され、その反応性は初感染、再感染後どのように変動するのかについては明らかではなかった。本研究では、*A. simplex* の幼虫を経口投与されたアニサキス感作ラットにおいて、アニサキス抗原特異 IgG、IgE および IgM が認識するアニサキス抗原分画の経時的な変動をイムノブロット法により解析した。初感作後、複数の抗原分画に対して抗体反応が認められ、各分画に対する反応は再感染後に増強した。特に、約 35kDa の抗原に対する反応は、IgG および IgE において強く長期にわたって認められた。初感作、再感作後に幼虫ホモジネートを経口投与した場合にも、この抗原に対する抗体反応は増強を認め、抗原を 30 分間煮沸した場合でもその反応性に変化を認めなかった。二次元電気泳動後にこの抗原分画をスポットとして単離し、質量分析により解析したところ、アニサキス主要抗原の一つであるアニサキスヘモグロビンと同定された。本研究により、*A. simplex* の主要アレルギーンとして知られているアニサキスヘモグロビンは、アニサキス感作ラットにおいて長期に強い免疫応答を誘導させることが明らかとなった。

a 大阪健康安全基盤研究所微生物部微生物課

b 大阪市立大学医学部都市医学講座寄生虫学
アニサキス感作ラットにおいてアニサキスヘモグロビンは免疫反応の増強と助長を誘導するアニサキス主要抗原の一つである

管楽器におけるカビ汚染の現状

濱田信夫^a, 阿部仁一郎^b

日本防菌防黴学会誌, 45(7), 345-351 (2017)

165 台の管楽器について、カビ汚染を調べるために拭き取り調査を行った。カビ汚染はホルン、トロンボーン、トランペットなどの金管楽器にしばしば見られた。木管楽器に比べて金管楽器にカビが多いのは、クラリネットやフルートなどの木管楽器に比べて水分が曲りくねった管の中に閉じ込められるために、管の内部が湿っていることが原因と思われた。管楽器内に生えるカビはいずれも好湿性のカビで、金管楽器では *Paecilomyces*, *Fusarium* が多く、木管楽器では *Exophiala*, *Phoma* が比較的多かった。優占しているカビの中で、40℃で生育するものはなかったが、金管楽器ではカビが繁殖することが多いので、胞子を大量に吸引した場合の健康被害について注意する必要があると思われる。

a 大阪市立自然史博物館

b 大阪健康安全基盤研究所微生物部微生物課
Fungal contamination in wind instruments

Molecular detection and characterization of
Anaplasma species in wild deer and boars in Gifu
Prefecture, Japan

K. MATSUO^{a, b}, J. MORIBE^a and N. ABE^c

Japanese Journal of Infectious Diseases, 70(3),
354-356 (2017)

アナプラズマ症はヒト、家畜、愛玩動物におけるダニ媒介性感染症である。わが国でも家畜、野生動物およびダニにおいて *Anaplasma phagocytophilum* の存在は報告されており、最近では本原虫による顆粒球性アナプラズマ症例も報告されている。*A. phagocytophilum* には2つの遺伝子型の存在が報告されており、一つは臨床例由来株に見られるヒト型であり、他方はヒト以外にシカや他の動物から検出されるシカ型である。わが国での野生動物を対象とした全国的な調査では、シカとイノシシからはシカ型や家畜寄生種が報告されていたが、岐阜県産シカ、イノシシにおける *A. phagocytophilum* の遺伝子型については不明であった。本調査では岐阜県産シカ (69 頭) とイノシシ (7 頭) からの血餅サンプルを用いて、*A. phagocytophilum* の感染率と遺伝子型を調査した。シカでは 69 頭中 52 頭 (75.4%)、イノシシでは 7 頭中 1 頭 (14.3%) が *A. phagocytophilum* 陽性であり、それらは全てシカ型であった。本研究により、岐阜県産シカにおける *A. phagocytophilum* の高い感染率が明らかとなったが、その遺伝子型はイノシシ由来株を含めて全てシカ型であったことから、シカ型の人獣共通感染性とシカやイノシシがヒトへの伝播に関与する可能性について更なる調査が必要である。

a 岐阜大学応用生物科学部

b 岐阜県飛騨家畜保健衛生所

c 大阪健康安全基盤研究所微生物部微生物課

岐阜県産ホンシュウジカとイノシシより検出された
アナプラズマの遺伝子解析

春季日本海におけるマイワシとカタクチイワシ
の同時同所採集物を用いた食性比較

馬場 孝^{ab}, 森本晴之^b, 後藤常夫^b, 南條暢聡^c,
尾田昌紀^d, 上野陽一郎^e

日本水産学会誌, 84(2), 288-290 (2018)

マイワシとカタクチイワシの食性を明らかにするため、2014 年春季に日本海各地の同時同所採集物 (それぞれ計 158 尾, 149 尾) を用いて胃内容を調べた。両種はカイアシ類や端脚類などを捕食していたが、5 回のうち 4 回でマイワシはカタクチイワシ卵を捕食していた。捕食されていた卵数は、調査地点や調査個体によるばらつきが大きく、このような変動はカタクチイワシの産卵域とマイワシの索餌域との一致度が関与すると考えられ、卵分布と卵捕食量との関係を更に研究する必要がある。

a 大阪健康安全基盤研究所微生物部微生物課

b 水産研究・教育機構日本海区水産研究所

c 富山県農林水産総合技術センター水産研究所

d 鳥取県境港水産事務所

e 京都府農林水産技術センター海洋センター

Comparison of stomach contents between Japanese sardine
Sardinops melanostictus and anchovy *Engraulis japonicus*
using commercial fisheries together with the two species
in the Japan Sea during spring

The first fatal case of *Corynebacterium ulcerans* infection in Japan

K. OTSUJI^{ab}, K. FUKUDA^a, T. ENDO^b, S. SHIMIZU^b, N. HARAYAMA^b, M. OGAWA^a, A. YAMAMOTO^c, K. UMEDA^d, T. UMATA^e, H. SEKI^f, M. IWAKI^c, M. KAMOCHI^b and M. SAITO^a

JMM Case Reports, 2017;4 (2017)

コリネバクテリウム・ウルセランス感染症は、主に伴侶動物から感染し、ジフテリア様の呼吸器症状を引き起こす、新興の動物由来感染症である。国内ではこれまでに 20 症例以上の発症例が報告されている。

本報告では、伴侶動物からの感染が疑われ、国内で初めてとなる死亡症例についての詳細を報告した。患者の咽頭部には、ジフテリア様の偽膜の形成が認められた。分離菌の遺伝子解析（16S rRNA 遺伝子シーケンス、ジフテリア毒素遺伝子シーケンス、リボタイピング、PFGE）より、患者分離株は、患者が飼育していたネコ分離株と同一の遺伝子型を有することが分かった。

Molecular and epidemiological characterization of staphylococcal foodborne outbreak of *Staphylococcus aureus* harboring *seg*, *sei*, *sem*, *sen*, *seo*, and *selu* genes without production of classical enterotoxins.

K. UMEDA^a, H. NAKAMURA^a, K. YAMAMOTO^a, N. NISHINA^b, K. YASUFUKU^b, Y. HIRAI^a, T. HIRAYAMA^a, K. GOTO^a, A. HASE^a, J. OGASAWARA^a

International Journal of Food Microbiology, 256; 30-35 (2017)

2016 年 5 月に大阪市内で発生した食中毒において、本研究所での食中毒起因菌検査の結果、黄色ブドウ球菌が患者、食品残品、ふき取り水等から分離された。分離菌は、食中毒起因性があるとされる従来型エンテロトキシンを産生せず、食中毒起因性が不明な複数の新型/新型様エンテロトキシン遺伝子 (*seg*, *sei*, *sem*, *sen*, *seo*, *selu* の 6 種類) を保有していた。

菌の遺伝子型 (PFGE, MLST) は一致し、患者の症状や発生状況は、黄色ブドウ球菌食中毒に典型的であった。さらに、健康なヒト鼻腔分離株にも、同じエンテロトキシン遺伝子型を保有する株が存在することがわかった。

本食中毒の発生要因は、調理人が手指に保有しているブドウ球菌が食品に付着し、常温に長く置かれたために菌が増殖し、食品内でエンテロトキシンが産生されたと考えられる。今後は、従来型エンテロトキシンを産生しない株であっても、食中毒の原因になりうるものとして対応する必要がある。

a 産業医科大学医学部微生物学

b 産業医科大学病院集中治療部

c 国立感染症研究所細菌第二部

d 大阪健康安全基盤研究所微生物部微生物課

e 産業医科大学

f 産業医科大学病院

国内初のコリネバクテリウム・ウルセランス感染による死亡例

a 大阪健康安全基盤研究所微生物部微生物課

b 大阪市保健所

従来型エンテロトキシン非産生の黄色ブドウ球菌による食中毒事例と、分離株の解析

White plant shoots, wax-producing insects and other white structures made by arthropods: a mimicry complex?

K. YAMAZAKI^a

European Journal of Entomology, 114, 343-349
(2017)

多くの昆虫は植物の一部に変装したり、他の有毒昆虫に擬態する。一方、最近、さまざまな植物が節足動物に擬態して食害を減少させることが示されている。今回、日本各地の植物と節足動物から白色の類似構造物を報告し、これらが擬態複合体であることを示唆した。白色の柔毛やワックス状物質をもつ植物のシュート（新梢）はワタアブラムシ、カイガラムシ、チョウ目幼虫などのワックス生産昆虫に外観が類似しており、植食を減少させている可能性がある。ワックス生産昆虫は寄主植物の質・量を低下させたり、天敵を誘引したり、これらの虫自体が有毒であることから植食者に回避されるであろう。さらに、菌感染した昆虫、コマユバチの繭、クモの卵囊、アワフキムシの泡なども白色で目立ち、植食性節足動物にとって危険な存在であるため、これらも白色シュートの擬態モデルとなって、擬態複合体を形成するかもしれない。

Disappearance of summer collection records in *Menochilus sexmaculatus* (Coleoptera: Coccinellidae) during climate warming

Y. KAWAKAMI^a and K. YAMAZAKI^b

Journal of Natural History, 51(17-18), 1015-1020
(2017)

ダンダラテントウは都市公園などに多く生息し害虫のアブラムシを捕食する。過去 100 年間の気候温暖化により日本列島を北上してきた。今回、1949 年～2004 年に近畿地方で採集された本種の標本を精査したところ、近年、本種の 7-8 月の採集記録が減少しており、とくに 2000 年～2004 年には全く採集されなくなった。同時に、年平均気温と夏季の気温が増加し、夏季の湿度が低下していた。そのため、本種の夏季の活動が妨げられていると考えられた。

a 大阪健康安全基盤研究所微生物部微生物課
白色の植物のシュート、ワックス生産昆虫、他の節足動物の白色構造：擬態複合体か？

a 大阪市立自然史博物館外来研究員
b 大阪健康安全基盤研究所微生物部微生物課
気候温暖化によるダンダラテントウの夏季採集記録の消失

Distinct genetic clades of enterovirus D68 detected in 2010, 2013, and 2015 in Osaka City, Japan

A. KAIDA^a, N. IRITANI^a, S. P. YAMAMOTO^a, D. KANBAYASHI^a, Y. HIRAI^a, M. TOGAWA^b, K. AMO^b, U. KOHDERA^c, T. NISHIGAKI^d, M. SHIOMI^e, S. ASAI^f, T. KAGEYAMA^g and H. KUBO^a

PLOS ONE, 12(9): e0184335

(<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184335>)

(2017)

エンテロウイルス D68 型 (EV-D68) は、2010 年に国内の呼吸器感染症患者から急激な検出増加が報告された。本研究では、2010 年以降の呼吸器感染症検体における EV-D68 の検索、陽性株の分子疫学解析を目的とした。2010 年 11 月～2015 年 12 月に呼吸器症状が認められた 10 歳未満の 2,215 検体を対象とした (インフルエンザ診断例は除外)。リアルタイム RT-PCR 法によりエンテロウイルスの遺伝子検査をおこない、陽性株については、VP4 あるいは VP1 領域の塩基配列を決定後、BLAST 解析により型別を実施した。その結果、18 検体(0.8%)が EV-D68 陽性であり、2013、2015 年のみ検出が認められた。VP1 領域の塩基配列が可能であった株を用いて、系統樹解析をおこなった結果、2013、2015 年の検出株は、2010 年の検出株とはそれぞれ異なるクラスターを形成した。大阪市という限定された地域で、2010、2013、2015 年に異なるクラスターの EV-D68 株がそれぞれ検出されたことは、各クラスターの抗原性の違いや過去に流行した EV-D68 に対する集団免疫の影響の可能性が考えられた。

a 大阪健康安全基盤研究所 b 大阪市立総合医療センター c 中野こども病院 d 大阪警察病院 e 愛染橋病院 f あさいこどもクリニック g 国立感染症研究所
大阪市内における 2010、2013、2015 年の異なる遺伝子グループのエンテロウイルス D68 型検出

Ten-year surveillance of measles virus from 2007–2016 in Osaka City, Japan

A. KAIDA^a, N. IRITANI^a, D. KANBAYASHI^a, S. P. YAMAMOTO^a, Y. HIRAI^a, N. HAKUI^b, R. FUJIMORI^b, H. MORI^b, H. HIROKAWA^b, J. OGASAWARA^a and H. KUBO^a

Japanese Journal of Infectious Diseases

71(2):152-154 (2018)

麻疹ウイルス (MV) は、A～H の 8 クレード、24 の遺伝子型に分類される (ワクチン株は A 型)。今回、2007 年 1 月～2016 年 12 月の期間に大阪市内の医療機関で麻疹と診断された 417 症例を対象に MV 検出状況、遺伝子型・陽性者の年齢分布の推移について検討した。MV 遺伝子検出法および遺伝子型別法については、国立感染症研究所の「麻疹診断マニュアル」に従った。全症例のうち 54 例 (12.9%) が MV 陽性であった。国内で麻疹流行が認められた 2007 年は、32 例のうち 20 例 (62.5%) が陽性であり、遺伝子型は、すべて日本土着株とされる D5 型であった。一方、2008～2013 年は、221 例中わずか 3 例 (1.4%) が陽性 (D4 型 1 例、D8 型 2 例) であり、2 例は海外渡航歴があった。2014 年は、陽性例が 14 例 (29.2%) と急増した (B3 型 8 例、H1 型 4 例、D8 型 1 例、A 型 1 例)。大阪市内において、2007～2013 年の期間に B3 型、H1 型は検出されていないことから、2014 年は海外あるいは周辺地域から持ち込まれた B3 型、H1 型ウイルスの感染が広がった可能性が考えられた。2015 年は、B3 型 1 例のみ (海外渡航歴あり) であったが、2016 年は、関西空港における集団感染事例を契機に検査数が増加し、陽性例も 16 例 (16.7%) と急増した (H1 型 10 例、D8 型 3 例、A 型 2 例、型別不可 1 例)。陽性者の年齢分布は、A 型検出例を除くと、2008 年以降の MV 陽性者の 83.9% が 20 歳以上であった。近年、成人のリスクが高い可能性が考えられた。

a 大阪健康安全基盤研究所微生物部微生物課

b 大阪市保健所

大阪市内における 2007～2016 年の麻疹ウイルスサーベイランス

Problems and solutions of polyethylene glycol co-injection method in multiresidue pesticide analysis by gas chromatography-mass spectrometry:

Evaluation of instability phenomenon in type II pyrethroids and its suppression by novel analyte protectants

K. AKUTSU^a, Y. KITAGAWA^a,
M. YOSHIMITSU^a, S. TAKATORI^a, N. FUKUI^a,
M. OSAKADA^a, K. UCHIDA^a, E. AZUMA^a and
K. KAJIMURA^a

Analytical and Bioanalytical Chemistry, 410(13),
3145–3160 (2018)

GC-MS/MSを用いた食品中の残留農薬一斉分析では、装置流路内の活性点をマスキングするためのアナライトプロテクタント (AP) としてポリエチレングリコール 300 (PEG300) が汎用されている。一方、PEG300 共注入時の問題点として、 α -シアノ基を有するピレスロイド系農薬 (タイプ II ピレスロイド) の不安定化現象が報告されている。本研究では、当該現象の制御法についてアセトン/ヘキサン混液条件で検討を行い、脂溶性アスコルビン酸誘導体 (AAs) の添加が有効であることを明らかにした。さらに、PEG300 を使用せず、かつアセトン/ヘキサン混液条件に適した新規 AP として、10 種類の飽和脂肪酸 (炭素 8~26) を基剤とした SFA10mix を構築した。今回新たに構築した 2 種類の AP (PEG300+AAs および SFA10mix) は、フルバリネット等のタイプ II ピレスロイドを含む 30 種類の指標農薬の検量線の頑健化に有効であった。さらに 12 種類の食品マトリックスに対する指標農薬の添加回収率を比較した結果、PEG300+AAs および SFA10mix は既報の「汎用マトリックス」と同等の成績を示し、いずれもアセトン/ヘキサン混液条件で有用な AP であることが示された。

a 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部食品化学 1 課
GC-MS を用いた残留農薬一斉分析におけるポリエチレングリコール共注入法の問題点および対策：タイプ II ピレスロイドの不安定化現象および新規アナライトプロテクタントによる当該現象の抑制に関する検討

Persistent organic pollutants in red-crowned cranes (*Grus japonensis*) from Hokkaido, Japan

K. KAKIMOTO^a, K. AKUTSU^a, H. NAGAYOSHI^a,
Y. KONISHI^a, K. KAJIMURA^a, N. TSUKUE^b,
T. YOSHINO^c, F. MATSUMOTO^c, T. NAKANO^d,
N. TANG^b, K. HAYAKAWA^b and A. TORIBA^b

Ecotoxicology and Environmental Safety, 147,
367-372 (2018)

タンチョウは日本では特別天然記念物に指定され、環境省のレッドリストでは「絶滅の危険が増大している種」である絶滅危惧 II 類 (VU) に分類される。残留性有機汚染物質には卵の孵化、雛の生存率へ影響を与える化合物も存在することが知られている。一方で、タンチョウに残留している有機汚染物質の実態は把握されておらず、種の保存の観点から調査をすることは重要であると考えられた。我々は釧路市動物園に冷凍保存されている、2002 年から 2016 年の間に事故が原因で死亡したタンチョウ 47 羽 (雄 25 羽、雌 22 羽) を対象に調査を行った。

タンチョウに最も高い濃度で検出された物質はポリ塩素化ジフェニルエーテル (PCB) であった。続いて DDT 類、クロルデン類、ヘキサクロロベンゼン (HCB)、HCH 類、ポリ臭素化ジフェニルエーテル (PBDE)、マイレックスの順で検出された。PBDE の中では BDE-153 が特徴的に高濃度であり、この傾向は他の鳥類の調査結果と照らし合わせると、内陸部に生息する鳥に見られる現象であった。性差や、経年的な濃度変化はみられないことから、それらに影響しない持続的な残留性有機汚染物質の暴露源の存在が示唆された。しかし、それらの濃度レベルは過去の報告を踏まえるとタンチョウの種の保存へは影響のない程度であると考えられた。

a 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部食品化学 1 課
b 金沢大学
c 釧路市動物園
d 大阪大学
北海道に生息するタンチョウヅル中の残留性有機汚染物質

Cytochrome P450 2A6 and other human P450 enzymes in the oxidation of flavone and flavanone

K. KAKIMOTO^a, N. MURAYAMA^b, S. TAKENAKA^c, H. NAGAYOSHI^a, Y. R. LIM^d, V. KIM^d, D. KIM^d, H. YAMAZAKI^b, M. KOMORI^c, F. P. GUENGERICH^e and T. SHIMADA^e

Xenobiotica, doi: 10.1080/00498254.2018.1426133, 2018

我々はいままでフラボン及びフラバノンについてヒトチトクローム P450 酵素 2A6 及び 2A13 との相互作用、活性阻害作用を明らかにしてきた。さらに詳細な酸化的代謝挙動を明らかにするため、CYP1A1、1A2、1B1、2A6、2A13、2C9、3A4 によるフラボン及びフラバノンを基質とした生成代謝物を対象に分析を行った。CYP2A6 はフラボンを基質とする代謝活性が他の分子種に比較して高く、6-水酸化体や 5-水酸化体及びその他いくつかのモノ水酸化体やジ水酸化体を生成した。CYP2A6 はまた、フラバノン代謝においても高い活性を示し、主に 2'-水酸化フラバノン及び 6-水酸化フラバノンを生成した他、代謝産物としてフラボンを生成した。このことから、フラボン及びフラバノンの代謝には CYP2A6 が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。また、このフラバノンからフラボンへの代謝メカニズムについて分子活性相関モデルを通じ考察を行った。

食中毒を引き起こす有毒キノコの種特異的プライマーによるスクリーニング法の開発

野村千枝^a, 昌山 敦^b, 山口瑞香^a, 佐久間大輔^c, 梶村計志^a

食品衛生学雑誌, 58(5), 132-142 (2017)

日本では毎年、有毒キノコの誤食による食中毒が数十件発生している。食中毒の原因究明のために行われるキノコの肉眼・顕微鏡観察による形態学的鑑別法は、高度な菌類学の専門知識を要する上、キノコが原形を留めていない食中毒検体（喫食残品や患者吐物）には適用が困難である。そこで、種の同定に有用とされる DNA バーコーディング法（塩基配列解析による種同定）を応用した種特異的プライマーの設計によるキノコのスクリーニング法について検討した。

日本で食中毒事例のあるキノコのうち、5 種類のキノコ（オオワライタケ、オオシロカラカサタケ、ニガクリタケ、スギヒラタケ、カキシメジ）について種特異的なプライマーを作製した。本法は調理および人工胃液による処理の影響を受けず、湿試料 100 mg のキノコ (DNA 10 ng) を、約 2 時間半で検出可能であった。キノコによる食中毒疑いが発生したとき、本法によるスクリーニング検査と同時に、ITS1 領域の塩基配列解析による確認検査を行う。塩基配列解析には約 9 時間以上要することから、本法と塩基配列解析を併用することにより、検査精度を担保するとともに、保健所や衛生研究所等において、より迅速な食中毒対応が可能になると考える。

a 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部食品化学 1 課

b 昭和薬科大学

c 大阪府立大学

d Konkuk University

e Vanderbilt University

ヒトチトクローム P450 におけるフラボン及びフラバノンの酸化的代謝挙動

a 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部食品化学 1 課

b 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部食品化学 2 課

c 大阪市立自然史博物館

PCR-based method for the detection of toxic mushrooms causing food-poisoning incidents

Rapid and reliable method for determining irradiation histories of ground beef and prawns by measuring 5,6-dihydrothymidine

N. FUKUI^{a,b}, S. TAKATORI^a, Y. KITAGAWA^a, T. FUJIWARA^a, E. ISHIKAWA^b, T. FUJIYAMA^b, K. KAJIMURA^a, M. FURUTA^b and H. OBANA^c

Journal of Agricultural and Food Chemistry, 65(42), 9342-9352 (2017)

食品への放射線照射は、諸外国では香辛料の殺菌・殺虫やエビおよび食肉の殺菌に利用が認められている。国内では馬鈴薯の発芽防止を目的とした照射のみが許可され、他の放射線照射した食品（照射食品）の流通は禁止されている。厚生労働省から照射食品検知法が通知されているが、適用困難な食品が多くある。

新たな検知指標として、放射線照射によって DNA 中のチミジン (dThd) から形成される損傷ヌクレオシドの 5,6-ジヒドロチミジン (DHdThd) に着目し、牛ミンチおよびエビへの適用を念頭に新規照射食品検知法を開発した。γ 線照射した牛ミンチまたはエビから DNA を抽出し、これをヌクレオシドへ分解し、生成した DHdThd を LC-MS/MS で分析した。DHdThd は照射特異的かつ線量依存的に生成していることが明らかになった。

牛ミンチにおいて、既存の検知法のアルキルシクロブタノン(ACBs)法との相関性を評価した結果、DHdThd と ACBs の間に高い相関性が認められ、その信頼性が裏付けされた。DNA 中の DHdThd は、照射食品の検知指標として有用であると考えられた。本法は DNA 抽出が可能であれば、様々な食品への適用が期待できる。

a 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部食品化学 1 課

b 公立大学法人大阪府立大学

c 大阪府立公衆衛生研究所衛生化学部

(現：三栄源エフ・エフ・アイ株式会社)

5,6-ジヒドロチミジンを指標とした牛ミンチおよびエビの迅速かつ信頼性のある放射線照射履歴検知法の開発

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^a, 六鹿元雄^b, 阿部 裕^b, 尾崎麻子^c, 野村千枝^c, 佐藤恭子^b (他 24 名)

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。

a 名古屋市衛生研究所

b 国立医薬品食品衛生研究所

c 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部食品化学 2 課

Interlaboratory study on evaporation residue test for food contact products (Report 1)

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^a, 六鹿元雄^b, 阿部 裕^b,
尾崎麻子^c, 野村千枝^c, 佐藤恭子^b (他 24 名)

食品衛生学雑誌, 59(1), 64-71 (2018)

ヘ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、それらの性能はヘプタンとほぼ同等であった。

a 名古屋市衛生研究所

b 国立医薬品食品衛生研究所

c 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部食品化学 2 課
Interlaboratory study on evaporation residue test for food
contact products (Report 2)

An optimized extraction method for gluten analysis
in cacao-containing products using an extraction
buffer with polyvinylpyrrolidone

T. SATSUKI-MURAKAMI^a, A. KUDO^a,
A. MASAYAMA^a, M. KI^a
and T. YAMANO^a

Food control, 84, 70-75 (2018)

本研究ではカカオを含む加工食品からの小麦タンパク質の検出における Polyvinylpyrrolidone (PVP) の共存条件の最適化について検討した。

ELISA 法による小麦タンパク質の測定について、原材料中の夾雑物が測定に及ぼす影響の評価を行った結果、カカオなどのプロアントシアニジン系ポリフェノール (PAC) を含有する原材料によって測定の阻害が確認された。

小麦タンパク質の抽出時に PAC と結合能がある水溶性ポリマーの PVP を共存させることによって、PAC による阻害が軽減されることが確認された。このため、重合度の異なる PVP を共存させて評価を行ったところ、分子量の最も小さい PVP K15 による効果が最も高かった。

カカオを含む加工食品からの添加回収試験の結果、全ての食品で PVP K15 を 1%共存させることによって回収率の向上が確認された。さらに、チョコレートに混入した小麦タンパク質についても抽出時に PVP を共存させることにより、測定値が向上したため、改良法の汎用性が示された。

a 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部食品化学 2 課
カカオ加工品中の小麦グルテン分析におけるポリビ
ニルピロリドンの共存条件の最適化

Polychlorinated dibenzo-p-dioxins, polychlorinated dibenzofurans and dioxin-like coplanar polychlorinated biphenyls in mackerel obtained from the Japanese market, 1999–2003 ,

T. NAKATANI^a and T. YAMANO^a

Food Additives & Contaminants, **34** (9), 1562-1572 (2017)

1999～2003年の間に大阪府内に流通していたサバ17検体を対象にダイオキシン類(PCDDs、PCDFsおよびcoplanar PCB)の濃度について調査を行った。サバ中のダイオキシン類濃度は平均で3.59 pg TEQ/g、濃度範囲は1.24-10.8 pg TEQ/gであった。サバ中のダイオキシン類濃度と重量の間には有意な相関関係が見られ、4および5塩素化のPCDDsやPCDFs、およびcoplanar PCBsのような生物体内で高い蓄積性を示す物質がこの関係に多く寄与していた。中でも3,3',4,4',5-PeCBの寄与は顕著であった。サバの摂取を通じたダイオキシン類の暴露量を計算したところ、その量はヒト成人1日あたり約5 pg TEQであり、魚介類の摂取を通じたダイオキシン類暴露量のうち7%程度に達することが推定された。

Detection of the tomato allergen Sola 1 1 and evaluation of its reactivity after heat and papain treatment

K. KIYOTA^a, M. YOSHIMITSU^b,
T. SATSUKI-MURAKAMI^c, K. AKUTSU^b,
K. KAJIMURA^b and T. YAMANO^d

Food and Agricultural Immunology, **28**(6), 1450-1459 (2017)

トマトは、生鮮品や加工品として消費量が高い食物であり、健康に有益な栄養成分を含んでいる一方、食物アレルギーの原因となる成分(アレルギー)も含んでいる。本研究では、トマトアレルギーの一つであるプロフィリン(Sola 1 1)について、トマトの生鮮品や加工品における濃度実態、および加熱とパパイン酵素処理後の反応性を明らかにすることを目的とした。

Sola 1 1のペプチドに対するウサギポリクローナル抗体を常法に従って作出した。この抗体を用いたELISA(酵素結合免疫吸着法)によりSola 1 1を半定量したところ、Sola 1 1濃度は、トマト生鮮品で25.6 ± 9.1 μg/g、トマト加工品9種類で13.3 μg/gから24.8 μg/gの範囲であった。また、生鮮トマト抽出物に対して加熱およびパパイン酵素処理を行い、その反応性をELISAにより評価したところ、反応性に顕著な変化は見られなかった。

以上より、Sola 1 1に反応を示すトマトアレルギー患者は、トマトの生鮮品だけでなく加工品の摂取にも十分な注意を要することが示唆された。

a 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部食品化学2課
日本の市場に流通するサバ中のダイオキシン類
(PCDDs, PCDFs および coplanar PCBs) について

a 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部医薬品課

b 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部食品化学1課

c 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部食品化学2課

d 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部

トマトアレルギー Sola 1 1 の検出と加熱およびパパイン酵素処理後におけるその反応性評価

Cannabimimetic activities of cumyl
carboxamide-type synthetic cannabinoids

A. ASADA^a, T. DOI^a, T. TAGAMI^a,
A. TAKEDA^a, Y. SATSUKI^a, M. KAWAGUCHI^a,
A. NAKAMURA^a and Y. SAWABE^a

Forensic Toxicology, 36(1), 170-177 (2018)

近年、規制薬物の構造を元に設計された『危険ドラッグ』が世界的な問題となっている。海外では次々に新規薬物が流通しているが、その変遷の激しさと標準品入手の困難さから、新規薬物の作用評価は十分に行われていない。我々は海外で流通が確認されたクミル基を共通の構造として有する合成カンナビノイド薬物 7 種類（CUMYL-PINACA、CUMYL-5F-PINACA、CUMYL-PICA、CUMYL-5F-PICA、CUMYL-THPINACA、CUMYL-BICA、CUMYL-5F-P7AICA）について化学合成を行った。合成した薬物を用いてガスクロマトグラフ-質量分析計による分析を実施し、構造上の違いによって異なるスペクトルパターンの特徴を明らかにした。さらに受容体機能評価試験を行い、合成した 7 種類の薬物すべてがカンナビノイド受容体（CB₁ および CB₂ 受容体）に対するアゴニスト活性を有することを明らかにした。

Evaluation of carboxamide-type synthetic
cannabinoids
as CB₁/CB₂ receptor agonists: difference between
the enantiomers

T. DOI^a, T. TAGAMI^a, A. TAKEDA^a, A. ASADA^a
and Y. SAWABE^a

Forensic Toxicology, 36(1), 51-60 (2018)

合成カンナビノイドは、危険ドラッグ中に高頻度で含まれる化合物群であり、大麻の代替薬物として乱用されている。近年検出されるものの一つとして、カルボキサミド型の合成カンナビノイドが挙げられる。カルボキサミド型合成カンナビノイドにはアミノ酸の部分構造を持つものがあり、原料アミノ酸の不斉炭素に由来するエナンチオマーが存在している。一般的にはエナンチオマーによって生理活性が異なることが知られているが、カルボキサミド型合成カンナビノイドについては、その活性の違いについてこれまでに明らかにされていない。

本研究では、欧州で検出が報告された 5 種類の合成カンナビノイドのエナンチオマーをそれぞれ合成し、カンナビノイド受容体活性化能の評価を行った。S 体については評価した全ての化合物で CB₁/CB₂ 受容体活性化能が確認できたが、R 体では CB₁ 受容体活性化能が確認できない化合物も存在していた。CB₁ 受容体活性化能を確認できなかった(R)MDMB-FUBICA は、CB₂ 受容体に対しては低濃度で活性を示すなど、高い CB₂ 選択性を示した。

a 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部医薬品課
クミルカルボキサミド型合成カンナビノイド薬物の
カンナビノイド受容体に対する受容体機能評価

a 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部医薬品課
カルボキサミド型合成カンナビノイドの CB₁/CB₂ 受
容体活性化能：エナンチオマーによる活性の違いに
ついて

Analytical method for pyrethroid metabolites in urine of the non-occupationally exposed population by gas chromatography/mass spectrometry

T. YOSHIDA^a

Journal of Chromatographic Science, 55, 873-881 (2017)

近年、ピレスロイド系殺虫剤が住宅内において広く使用されており、その慢性的曝露による住人への健康影響が懸念される。本研究では、住宅内において使用される主要なピレスロイド系殺虫剤 (アレスリン、ピフェンスリン、シフルスリン、シペルメトリン、シフェノスリン、デルタメトリン、エンペンスリン、エトフェンプロックス、フェンプロパスリン、フルメトリン、フラメトリン、イミプロトリン、メトフルトリン、ペルメトリン、フェノスリン、プラレトリン、プロフルトリン、レスメトリン、テトラメトリン、トランスフルトリン)の住人への曝露を把握する目的で、尿中に排泄されるそれらの主要な 11 種の代謝物の一斉分析法を開発した。

代謝物は、尿に酵素を加えて加水分解した後トルエンにて抽出し、誘導体化 (アルコール性代謝物: トリメチルシリル化、カルボン酸性代謝物: *tert*-ブチルジメチルシリル化) してガスクロマトグラフィー/質量分析 (電子衝撃イオン化モード) により定量した。

全ての代謝物は 21 分以内に検出され、尿中の他成分との分離も良好であった。検量線はいずれの代謝物においても 0~30 µg/L の尿中濃度において良好な直線性を示した。定量下限濃度は 0.04~0.4 µg/L であり、定量値の再現性及び正確性は良好であった。既知量の代謝物を添加した尿を -20°C において保存後、定期的に分析した。いずれの代謝物においても時間的な増減は見られず、尿試料は 1 ヶ月間冷凍保存可能であると考えられた。本法は、職業的曝露のない一般住民におけるピレスロイド系殺虫剤の曝露量を把握するために十分適用できると考えられた。

^a 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部生活環境課
一般住民における尿中ピレスロイド代謝物のガスクロマトグラフィー/質量分析による定量

Analytical method for urinary metabolites as biomarkers for monitoring exposure to phthalates by gas chromatography/mass spectrometry

T. YOSHIDA^a

Biomedical Chromatography, 31, e3910 (2017)

住民におけるフタル酸系可塑剤 (フタル酸ベンジルブチル、フタル酸ジ(2-エチルヘキシル)、フタル酸ジシクロヘキシル、フタル酸ジエチル、フタル酸ジイソブチル、フタル酸ジ-*n*-ブチル、フタル酸ジ-*n*-ヘキシル、フタル酸ジメチル、フタル酸ジ-*n*-ペンチル) への曝露を想定し、その体内吸収量の指標として、尿中に排泄されるこれら化学物質の 9 種の代謝物 (フタル酸モノベンジル、フタル酸モノ-*n*-ブチル、フタル酸モノ(2-エチル-5-カルボキシペンチル)、フタル酸モノシクロヘキシル、フタル酸モノエチル、フタル酸モノイソブチル、フタル酸モノ-*n*-ヘキシル、フタル酸モノメチル、フタル酸モノ-*n*-ペンチル)を同時に分析する方法を確立した。

尿に酵素 (スルファターゼ + グルクロニターゼ) を加えて反応させた後、トルエンを加えて代謝物を抽出した。代謝物を誘導体化 (*tert*-ブチルジメチルシリル化) した後ガスクロマトグラフィー/質量分析により定量した。

各代謝物と尿中の他成分との分離は良好であった。検量線は、いずれの代謝物においても 0~30 µg/L の尿中濃度において良好な直線性を示し、定量下限濃度は 0.3~1.3 µg/L であった。既知量の代謝物を添加した尿の繰り返し測定により、相対標準偏差及び相対誤差を算出したところ、すべての代謝物各濃度において概ね 13%以下であり、定量値の再現性及び正確性は良好であった。また、-20°C において保存した尿試料中の各代謝物は 1 ヶ月間安定であった。本法は、日常生活下の一般住民におけるフタル酸系可塑剤への曝露レベルを把握するために有用な分析方法であると考えられた。

^a 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部生活環境課
フタル酸エステル類の曝露指標としての尿中代謝物のガスクロマトグラフィー/質量分析による定量

液体クロマトグラフィータンデム質量分析による水道水中の臭素酸イオン分析条件の検討と妥当性評価

小林憲弘^a, 小坂浩司^{b,c}, 浅見真理^b, 中川慎也^d, 木下輝昭^d, 高木総吉^e, 中島孝江^e (他 20 名)

水環境学会誌, 40(6), 223-233 (2017)

水道水中の臭素酸イオンを、ミックスモードカラムと液体クロマトグラフ-タンデム質量分析計を用いて高感度に分析可能な測定条件を検討し、確立した。確立した条件を用いて 23 機関において水道水質基準値 (0.01 mg/L) および基準値の 1/10 (0.001 mg/L) に調製した実試料を用いて妥当性評価を実施した。

その結果、各機関の試験の真度は 73~118%の範囲にあり、いずれの機関においても厚生労働省の「水道水質検査方法の妥当性評価ガイドライン」の目標 (70~120%) を満たす良好な結果が得られた。また、各機関の併行精度は 0.46~14%の範囲にあり、ほとんどの機関で 10%未満であった。さらに、各添加濃度における室間精度は、添加濃度 0.01 mg/L で 9.0%、添加濃度 0.001 mg/L で 10%であり。上記の妥当性評価ガイドラインの室内精度の目標 (基準値において<20%、基準値の 1/10 において<30%) を満たした。

以上のことから、本分析法は水道水中の臭素酸イオンを基準値の 1/10 まで精度よく分析可能な方法であると評価できる。

浴槽水試料を対象としたレジオネラ属菌精度管理の試み

枝川亜希子^a, 城美紀^b, 木村明生^a

防菌防黴, 45, 525-528 (2017)

近年、レジオネラ症の患者報告数は年々増加傾向にある。日本国内での主な感染源である浴槽水を対象としたレジオネラ属菌検査は、公的および民間を含め多くの検査機関で実施されているが、現在のところ検査精度を確認するための精度管理手法は定められていない。そこで本研究では、レジオネラ属菌検査における精度確認手法の確立を目的に検討を行い、本手法により 3 試験機関 14 名を対象に精度管理を試みた。その結果、前処理方法を併用しない方法での回収率は 82.6%-103.3%と良好な結果が得られた。一方、前処理方法を併用すると、酸処理は 77.1 - 96.9%、熱処理は 8.3 - 41.1%に回収率が低下し、前処理方法により一定の割合で検出菌数が減少することが明らかとなった。レジオネラ属菌検査は、試料水の種別によって適した検査方法を選択することが可能であるが、検査精度の確認と検査者の手技の確認を目的とした精度管理については、前処理方法を併用しない方法で確認する必要があると考えられた。

a 国立医薬品食品衛生研究所生活衛生化学部

b 国立保健医療科学院生活環境研究部

c 京都大学大学院工学研究科

d 東京都健康安全研究センター薬事環境科学部

e 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部生活環境課

Development and validation of an analytical method for bromate by liquid chromatography/tandem mass spectrometry (LC/MS/MS)

a 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部生活環境課

b 大阪府健康医療部 健康医療総務課

External quality control for *Legionella* by culture method.

Rapid on-site monitoring of *Legionella pneumophila*
in cooling tower water using a portable microfluidic
system

N. YAMAGUCHI^a, Y. TOKUNAGA^b, S. GOTO^c, Y.
FUJII^c, F. BANNO^c and A. EDAGAWA^a

Scientific Reports, 7, Article number 3092 (2017)

呼吸器感染症であるレジオネラ症の主な原因菌は *Legionella pneumophila* であり、その患者報告数は世界的に増加傾向にある。主な感染源は本菌によって汚染された環境水であるが、培養法ではその検出に約 2 週間を要することから、迅速・簡便かつ高精度な本菌の定量法が必要とされている。そこで、マイクロ流路デバイスを用いた *L. pneumophila* の定量法を作成した。また、マイクロ流路を流れる細菌を半自動的に検出するために、ポータブル・システムを作製した。マイクロ流路デバイス (5 cm×2.5 cm) はシリコン樹脂で作製し、マイクロ流路の幅を 100~500 μm、深さを 15 μm とした。冷却塔水をマイクロ流路デバイスに導入後、マイクロ流路内で *L. pneumophila* を蛍光抗体により標識し (on-chip 染色)、ポータブル・システムの CCD カメラを用いてマイクロ流路内を流れる *L. pneumophila* を検出・計数した。本方法により得られた値は蛍光顕微鏡により得られた値と同等であり、冷却塔水を濃縮することにより、10¹ cells/mL の *L. pneumophila* を検出することができた。本方法はモニタリング地点で実施可能であり、測定までに要する時間は約 90 分であることから、環境水のレジオネラ汚染の現地での (on-site) モニタリングに応用可能である。

a 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部生活環境課

b 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部食品化学 1 課

c 大阪大学大学院薬学研究科衛生・微生物学分野
ポータブル・マイクロ流路システムを用いた冷却塔水中の *Legionella pneumophila* の迅速 on-site モニタリング

編集委員

池森 亮

坂田 淳子

高田 利香

土井 崇広

根岸 直矢

肥塚 利江

宮本 伊織

○ 山口 進康

山崎 一夫

吉光 真人

(○ 編集委員長)

査読委員

入谷 展弘

起橋 雅浩

改田 厚

柿本 幸子

川津 健太郎

神吉 政史

紀 雅美

久保 英幸

西村 公志

村上 太郎

山崎 一夫

山元 誠司

吉田 仁

吉光 真人

地方独立行政法人 大阪健康安全基盤研究所

研究年報 第2号 平成30年度

ISSN 2433-5819

(無断転載禁止)

平成30年12月

編集・発行 地方独立行政法人 大阪健康安全基盤研究所

大阪市東成区中道1丁目3番69号

電話 06-6972-1321