神奈川県
衛生研究所

CODEN:KEKHB 8
ISSN:0303-0350

神奈川県衛生研究所研究報告

第41号（平成23年９月）

目　　次

神　奈　川　県　衛　生　研　究　所
〒253-0087　茅ヶ崎市下町屋１－３－１

県の花：山ゆり

神奈川県衛生研究所研究報告第41号

平成23年9月発行

編　集　神奈川県衛生研究所
発　行　〒253-0087　茅ヶ崎市下町屋1-3-1
TEL 0467-83-4400
印　刷　株式会社　シーケン
〒244-0842　横浜市栄区飯島町1439
TEL 045-893-5171㈹

神奈川県衛生研究所研究報告　No. 41 (2011)
Bull. Kanagawa Ins. of P.H.

総説

マイコプラズマ肺炎の検査と疫学

岡崎則男

Laboratory diagnosis and epidemiological studies of *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia

Norio OKAZAKI

Key Words：*Mycoplasma pneumoniae* pneumonia, epidemiology, laboratory diagnosis, P1 cytadhesin gene, macrolide-resistance

はじめに

ヒトのマイコプラズマ肺炎は肺炎マイコプラズマ（*Mycoplasma pneumoniae*）の感染で引き起こされる疾患で，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（感染症法）においては5類感染症に分類されており，この法律に基づく感染症発生動向調査事業実施要綱の中では定点把握疾患となっている．感染症発生動向調査事業は1982年に開始された感染症サーベイランス事業が継続したもので，感染症法が施行された1999年から実施されているものである．1998年までの感染症サーベイランス事業においては，マイコプラズマ肺炎は異型肺炎として調査が実施され，病原体定点病院で採取された患者検体からの*M. pneumoniae*培養検査を地方衛生研究所で行うことになっていた．しかし，実際に培養検査を実施した機関は神奈川県衛生研究所（神奈川衛研）を含めて数箇所であった．1999年に施行された感染症法では，病原体検査の対象疾患からは除外され，定点病院からの届出に基づき，地方感染症情報センター，国立感染症研究所感染症情報センターなどが連携し，患者数及び疾患情報の把握による全国的な調査が進められている．

神奈川衛研では，1976年から培養検査を主体としたマイコプラズマ肺炎の調査研究を開始し，1982年以降は上述の感染症サーベイランス事業に基づく検査を併せて実施してきた．また，1999年の感染症法施行後においても，神奈川県は本疾患の継続的な病原体検査の必要性を認め，県独自に病原体検査の対象疾患とし，神奈川衛研で*M. pneumoniae*の培養検査を実施している．*M. pneumoniae*は特殊な細菌で，その培養検査には一般の細菌とは異なる技術と感覚を要するため，国内で長期間にわたりこの検査を実施している機関は希であり，当所は数少ないマイコプラズマ肺炎の検査・調査研究機関となっている．一方で，最近，マイコプラズマ肺炎においては薬剤耐性*M. pneumoniae*の出現[1]，劇症型症例及び高齢者における重症例[2]などが報告され，加えて，*M. pneumoniae*の慢性的感染が喘息や慢性閉塞性肺疾患（Chronic obstructive pulmonary disease, COPD）の憎悪に関連する[3]ことも注目されており，本疾患に関する検査・調査研究の重要性が高まってきた．このような状況から，国内でも*M. pneumoniae*を取り扱う機関が若干ではあるが増えてきており，その中には山形県衛生研究所などの地方衛生研究所も含まれている．

マイコプラズマ肺炎の診断においては，培養検査などにより患者から*M. pneumoniae*を検出することが最も確実であり，これに基づく疫学調査が本疾患の動向を正確に把握することになる．また，培養検査で確保された*M. pneumoniae*を利用し，細菌学的解析を行うことで，病原性の変化や薬剤耐性などの情報を得ることが可能となる．しかし，通常，病院の検査室で*M. pneumoniae*検出が実施されることは殆どなく，マイコプラズマ肺炎の臨床診断は主に血清抗体検査で行われていること及び抗体検査による本疾患の疫学調査（血清疫学）も可能であることから，抗体検査法の検討も重要である．

著者は，長年にわたり，神奈川衛研でマイコプラズマ肺炎の検査・調査研究に携わり，*M. pneumoniae*検出及び血清抗体検査の両面から本疾患の調査研究を進め，特に，疫学的検討に力を注いできた．その立場から，今後の検査と疫学に関わる課題解決の一助にして頂きたく，在職中の成果を概説する．

*M. pneumoniae*とマイコプラズマ肺炎

1　*M. pneumoniae*

*M. pneumoniae*は*Mollicutes*綱，*Mycoplasma*属の細菌で，細胞壁を持たないため多形態性であり，最小増殖単位は0.3μm以下と小さく，ポアサイズ0.45μmの細菌濾過器を通過する．DNA全塩基配列も既に解明されており，そのサイズは816kb(キロベース)と大腸菌のほぼ5分の1で，GC含量は40％である[4]．このように，細菌でありながら，一般の細菌とは大きな隔たりのある形態学的及び遺伝学的特徴を有し，自己増殖可能な最小ク

神奈川県衛生研究所　前企画情報部
〒253-0087茅ヶ崎市下町屋1-3-1

ラスの生物とされている．また，*M. pneumoniae*を含む*Mycoplasma*属細菌における遺伝学上の特異な性質として，以下のような遺伝暗号の変化もあげられる．通常，ほとんどの生物ではメッセンジャーRNA上のUGAコドンは蛋白質合成の停止を意味するが，*Mycoplasma*属細菌ではトリプトファンを指定しているのである[5]．このため，遺伝子組み換えによって*M. pneumoniae*の蛋白質を大腸菌などで生産しようとした場合，UGAコドンの位置で合成が停止することになる．

*M. pneumoniae*は人工培地に増殖するが，一般の細菌に比べて栄養要求が厳しく，動物の血清や酵母エキスなどを添加しないと増殖しない．しかし，増殖しても液体培地が混濁することはなく，寒天平板培地に形成されるコロニーは極めて小さいことから，肉眼的に増殖を確認することは困難である．寒天培地上のコロニーは直径が0.1mm程度で，その形態を実体顕微鏡などで観察すると，目玉焼き状を呈していることが特徴である．図1のAに，*M. pneumoniae*の標準株（Mac株），同Bに患者から検出された*M. pneumoniae*のコロニーを示す．患者由来株は，検出当初は増殖が遅く，多くは目玉焼き状の形態を呈するが，目玉の部分（ニップル）が比較的大きく，目玉焼き状が明瞭でないこともある．

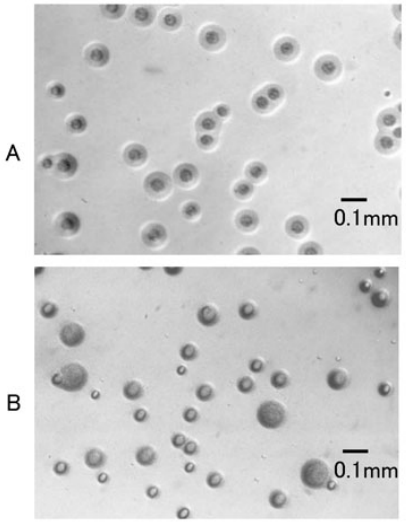

図1　寒天平板培地における*M. pneumoniae*標準株（A，7日間培養）及び患者由来株（B，14日間培養）のコロニー

本細菌の病原因子については長い間明らかにされてなかったが，現在では，菌体表面に存在するP1蛋白が重要であることが分かっている[6]．P1蛋白は分子量170 kDa(キロダルトン)の接着因子で，これによりヒトの呼吸器細胞表面に付着して病原性を発揮する[6,7]．従って，P1蛋白に変異が起こると，接着能が無くなり，病原性も失われることになる．また，感染して細胞表面に付着した*M. pneumoniae*は細胞表面を滑走することが知られており[8]，この運動でより条件の良い場所に移動し，病原性を発揮すると考えられている．

2　マイコプラズマ肺炎

*M. pneumoniae*はヒトに感染して主に呼吸器疾患（*M. pneumoniae*感染症）を起こし，その代表的なものがマイコプラズマ肺炎である．尚，マイコプラズマ肺炎は種々の動物の疾患としても存在し，これらは*M. pneumoniae*以外の*Mycoplasma*属細菌が原因となっていることから，ヒトの疾患としては肺炎マイコプラズマ肺炎もしくは*M. pneumoniae*肺炎との表現が妥当である．しかし，感染症法においては疾患名としてマイコプラズマ肺炎が記載されていることから，本稿ではこの表現を使用する．従来，この肺炎は異型肺炎（非定型肺炎）であり，肺炎球菌などによる細菌性肺炎とは胸部X線所見で区別できると言われてきたが，異型肺炎像を呈する疾患はウイルス，クラミジアなどによるものもあり[9]，これらとの鑑別は困難なようである．*M. pneumoniae*の感染は患者の咳やくしゃみで飛び散る飛沫が周囲のヒトに吸い込まれて起こり，感染力はインフルエンザウイルスのように強いものではなく，家族内などの閉鎖的集団おける濃厚接触により感染が進行するとされる[10]．発症までの潜伏期間は2～3週間で，頭痛，倦怠感，発熱，咽頭痛，咳などのいわゆる感冒様症状を呈し[9]，マイコプラズマ肺炎に特有な症状はないが，感冒性疾患と比べ症状が長引き，頑固な咳が続く傾向が見られる[10]．患者は小児に多く，通常は比較的軽症に止まるものの，成人では呼吸不全などを呈する重傷，劇症型に発展する例も知られている[2,11]．

3　マイコプラズマ肺炎の発生状況

図2に，国立感染症研究所感染症情報センターから提供される感染症発生動向調査におけるマイコプラズマ肺炎患者の報告数（1982～2006年）[12]を示す．1998年までの疾患名は異型肺炎となっているが，異型肺炎の4割程度をマイコプラズマ肺炎が占め，流行期には6割を占めるとされている[13]ことから，異型肺炎の動向がマイコプラズマ肺炎のそれを反映していると考えられる．1984年，1988年に患者報告数の明瞭なピークが見られ，1984年以前においても，地域的にはマイコプラズマ肺炎流行の4年周期性が報告[14,15]されていることから，1980年代までは，国内におけるマイコプラズマ肺炎の大規模な流行は4年周期で起こっていたものと推測される．また，流行は急激に拡大するものではなく，流行のピークを示す年及びその前後年において，比較的緩やかに進行する傾向が見られる．1990年以降，患者報告数が減少すると共に，4年周期性は不明瞭になり，2000年以降は

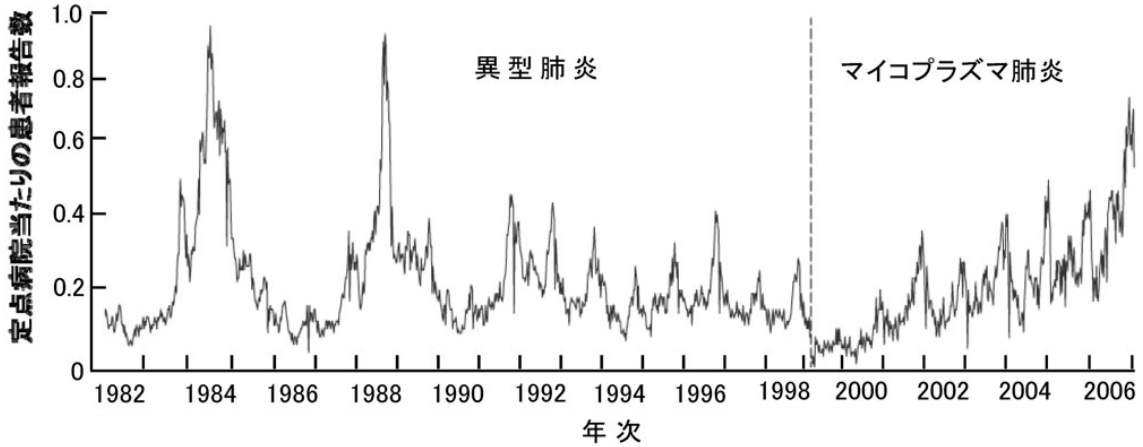

図2　感染症発生動向調査におけるマイコプラズマ肺炎患者報告数（各週）の推移（国立感染症研究所感染症情報センター，1999年第14週までは感染症サーベイランスによる異型肺炎患者報告数）

周期性が消失し，不定期に各地で小規模な流行が発生している状況になっている[9]．しかし，1988年の流行を過ぎてから減少していた患者報告数は，2000年から次第に増加する傾向が見られることから，今後の動向を注視する必要があろう．

マイコプラズマ肺炎の検査

1　*M. pneumoniae* の検出

マイコプラズマ肺炎を診断するには，患者から*M. pneumoniae* を検出することが最も確実である．*M. pneumoniae* 検出法には，培養検査法，遺伝子増幅法（Polymerase chain reaction, PCR），DNAプローブ法などがあり，酵素抗体法も検討されてはきたが，感度及び特異性などの問題から，現在，主に使用されているのは培養検査法とPCR法である．

1）培養検査

M. pneumoniae の培養検査は煩雑な技術を必要とし，その上に結果の判明までに通常1～2週間の日数を要することから，臨床診断をする上での適切な検査法とは言い難い．しかし，本菌の病原性，薬剤耐性，遺伝子変異などの検討をするためには，培養検査により菌株を確保し，保存することが重要である．

神奈川衛研では，患者から採取した咽頭スワブの絞り液を検査材料として使用し，これを寒天平板培地と二層培地に接種して培養している[16,17]．培地には様々な成分が添加されるが，中でもウマ血清と酵母エキスが重要であり[18]，これらを添加しないと*M. pneumoniae* は増殖しない．このウマ血清については，従来，非加熱で使用することが定説[19,20]となっていたが，非加熱ウマ血清にはマイコプラズマ発育阻害作用があり，この作用は56℃ 30分間の加熱で消失する[21,22]ことから，加熱処理をして使用するのが適切である．また，酵母エキスについては，パン酵母などから抽出した自家製のものを使用した方が良いと思われる[9]．

寒天平板培地と二層培地に検査材料を接種し，37℃で7～14日間培養すると，寒天平板培地に*M. pneumoniae* が増殖した場合にはコロニーが形成され，これを実体顕微鏡下で40～80倍に拡大して観察すると，特徴的形態が確認される（図1参照）．また，二層培地に*M. pneumoniae* が増殖すると，図3のBに示すように，培地が変色する．二層培地は*M. pneumoniae* 用の選択増菌培地で，図3のAに示すように小試験管において寒天培地に倍量の液体培地を重層したものである．培地にはブドウ糖，フェノールレッド及びメチレンブルーが添加されており，*M. pneumoniae* が増殖すると，ブドウ糖分解による酸の産生及びメチレンブルーの還元により変色する．メチレンブルーは，*M. pneumoniae* 以外のヒトに寄生する*Mycoplasma* 属の発育を抑制する作用も有

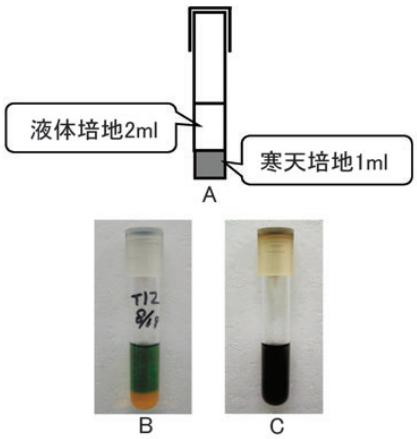

図3　二層培地（A，培地の構造; B，*M. pneumoniae* 培養陽性; C，同陰性）

する．*M. pneumoniae*は二層培地の液体層と寒天層の界面にが良く増殖するため，下部の寒天層から変色し，熟練すると，その界面における僅かな変色で早期の増殖が判断できるようになる．寒天平板培地でのコロニーと二層培地における変色が確認されれば，*M. pneumoniae*培養陽性と推定して良いが，同定は，基本的には生化学的性状試験及び抗血清による発育阻止試験により行う．生化学的性状試験の代表的なものである赤血球吸着試験[23]を図4に示す．上述のように，*M. pneumoniae*は接着因子であるP1蛋白により細胞に吸着する性質があり，

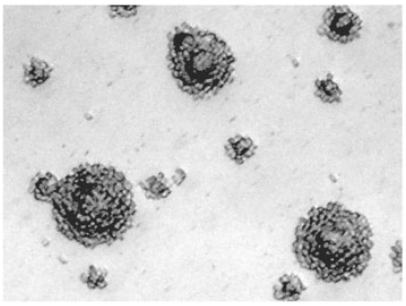

図4　赤血球吸着試験（寒天培地上の*M. pneumoniae* コロニーに，ニワトリ赤血球浮遊液を滴下し，室温で30分間反応）

これを利用した試験法で，寒天平板培地に形成されたコロニーに，ヒツジ，モルモットあるいはニワトリなどの動物赤血球浮遊液を滴下し，コロニーへの吸着を実体顕微鏡下で観察する．発育阻止試験[24]による同定は，図5に示すように，被検菌液を塗布した寒天平板培地に抗血清をしみ込ませたディスクを置いて培養し，被検菌が*M. pneumoniae*である場合にはディスク周囲に発育阻止帯が観察される．しかし，抗血清の入手が困難で，自家調整する必要があるため，最近では，PCR法で*M. pneumoniae*の同定を行うことが多い．

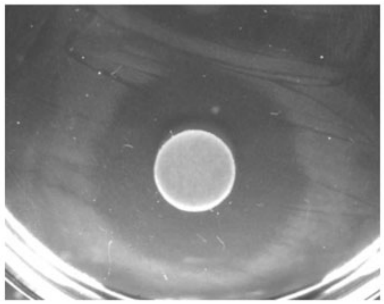

図5　発育阻止試験（寒天平板培地に*M. pneumoniae* 菌液を塗布後，抗血清を染みこませたディスクを置き，37℃で7日間培養）

２）　PCR法

PCR法は，現在，様々な感染症の迅速且つ正確な診断法として急速に普及しつつある．マイコプラズマ肺炎診断におけるPCR法に関しては，神奈川衛研が国立感染症研究所などと共同で16SリボゾームRNA遺伝子の一部を増幅するPCR法を検討し[25]，感染症発生動向調査などにおける*M. pneumoniae*の検出に利用して成果を上げてきた[26,27]．一方で，PCR法は迅速化と微量化が推進され，国内外で多くの研究がされてきており，現在，神奈川衛研では従来のPCR法に代えてIevenら[28]が報告した方法を若干修正して採用している[29]．このPCR法も16SリボゾームRNA遺伝子を標的としており，*M. pneumoniae*培養液を使用して調べた検出感度は，従来から神奈川衛研で使用していたものと同程度（1.7 CFU/10μl；CFU, colony forming unit）であり[26]，PCRサンプルの作成からPCR増幅産物の確認までの作業は3時間程度で終了する．しかし，患者咽頭スワブから調整したサンプルに使用した場合，PCR法の検出感度はやや低くなり[26]，表1に示すように，1～<10 CFUのPCRサンプルで8件中3件，10～<10^2 CFUでも11件中1件が陰性となった．これらの検体はいずれも培養検査により*M. pneumoniae*陽性となっている．原因としては，検体中のPCR阻害物質などの影響が考えられ，今後この点の改善を図ることができればPCR法の価値は更に高まることが期待される．

表1　臨床検体中の*M. pneumoniae*数（CFU）とPCR検査成績

CFU/10μl[1]	検査数	陽性数（%）
1～<10	8	5（62.5）
10～<10^2	11	10（90.9）
10^2～<10^3	14	14（100）
≧10^3	36	36（100）

[1] 咽頭スワブから調整したPCR用サンプル10μl中のCFU数（CFU数は培養検査における寒天平板培地のコロニー数から算出）

臨床検体に利用した際のPCR法と培養検査法の比較を表2に示す．マイコプラズマ肺炎を疑われた患者から採取された214件の咽頭スワブにつき，PCRと培養検査の両者を実施した結果，培養陽性でPCR陰性あるいは培養陰性でPCR陽性が共に3例ずつあり，これらは検体中のPCR阻害物質の影響あるいは薬剤治療により*M. pneumoniae*の生物活性が低下していたことによる可能性があるが，両方法における陽性率に差はほとんど見られなかった．一方，雑菌増殖により培養検査では判定できなかった12件の全てがPCR法で判定され，しかも4件が陽性であった．これはPCR法の優れた点である．これらの12件を除いて算出したPCRと培養検査法の陽性一致率は93.6%で，両者の成績は良く一致した．培養検査法はマイコプラズマ肺炎を診断する上で最も確実な方法

表 2　培養検査法とPCR法の比較

PCR	培養検査			計 (%)
	陽性	陰性	判定不可	
陽性	88	3	4	95 (44.4)
陰性	3	108	8	119
計 (%)	91 (42.5)	111	12	214

であることから，以上の結果はPCR法の本疾患診断における有用性を示すものと言える．

このように，PCR法は臨床検体中の阻害物質など，若干の課題はあるものの，マイコプラズマ肺炎の迅速診断に極めて有用と考えられる．しかし，これを実施するには検査の正確性を確保するための設備，機器及び技術が必要となるため，現段階では一部の研究機関や大学病院など，限られた機関でしか実施されていない．今後，マイコプラズマ肺炎の重症例，*M. pneumoniae*の薬剤耐性などが問題視される中で，迅速診断法としてのPCR法の普及が強く望まれる．

3）過去34年間の*M. pneumoniae*の検出成績

図6に，神奈川衛研における1976～2009年までの調査研究などで，培養検査やPCR法により*M. pneumoniae*を検出した成績の年次推移を示す．検体総数2,509件，陽性数615件，陽性率は24.5％であった．年次による検体数に大きな差があることを考慮する必要はあるが，1980年，1984年及び1988年には陽性数と陽性率が共にピークを示しており，これらに加えて，既報[14,15]により1976年もピークと推定されることから，*M. pneumoniae*検出成績においても1980年代までのマイコプラズマ肺炎流行の4年周期性が伺える．一方で，1990年以降のピークに周期性は見られず，2000年以降は，2003年及び2006年のピークと共に次第に上昇する様相を呈している．これらは，国の感染症サーベイランスあるいは感染症発生動向調査におけるマイコプラズマ肺炎患者報告数の推移（図2参照）とほぼ一致しており，患者発生の動向が病原体検出成績から裏付けられたものと考えられる．

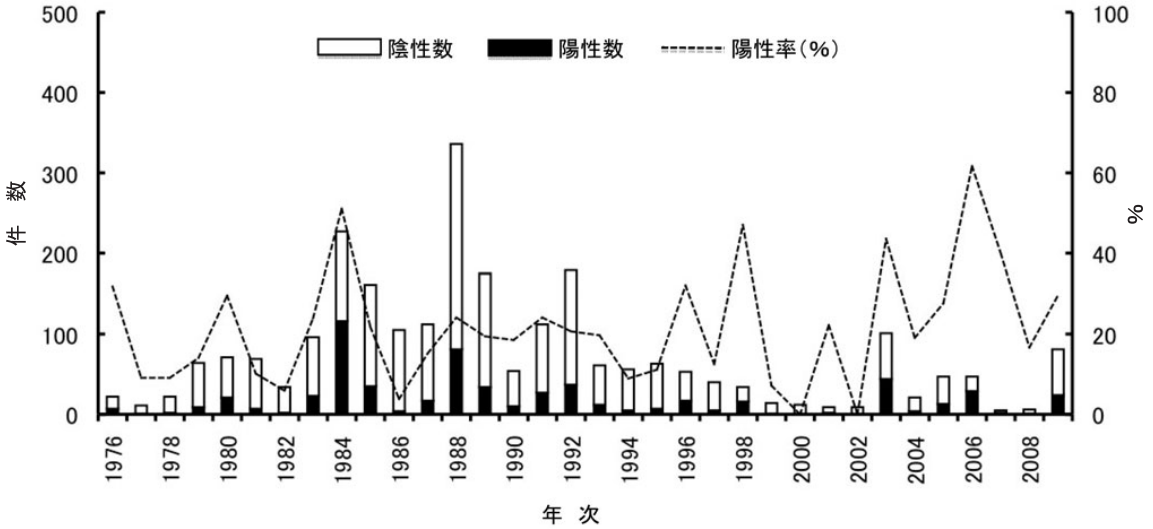

図 6　神奈川県における*M. pneumoniae*検出成績の年次推移

培養検査により，患者から *M. pneumoniae*が検出される期間を調べた成績を表3及び4に示す[30]．患者は1983から1984年の期間に培養検査あるいは血清抗体検査でマイコプラズマ肺炎と診断された例である．表3のように，薬剤治療前では，発病後7日以内の患者の多く（92.7%）が培養陽性であり，1ヶ月程度後においても検出が可能であった．薬剤治療後においても，表4に示すように，検出率は低くなる傾向があるものの，2ヶ月程度は*M. pneumoniae*が検出され，最長で発病後112日目に検出された例があった．このように，マイコプラズマ肺炎患者では，治療後においても速やかに菌が消失するのではなく，数ヶ月間にわたり排菌する例が少なくな

表 3　薬剤治療前の患者における病日と培養検査による*M. pneumoniae*検出成績

病 日[1]	検査数	陽性数(%)
1～7	55	51(92.7)
8～14	60	50(83.3)
15～21	11	10(90.9)
22～28	6	5(83.3)
29～35	4	3(75)
計	136	119(87.5)

[1] 担当医師の診断による発病日と検体採取日から算出

表4　薬剤治療後の患者における病日と培養検査による*M. pneumoniae* 検出成績

病 日[1]	検査数	陽性数(%)
1～28	5	4(80)
29～56	8	6(75)
57～84	10	4(40)
85～112	3	1(33.3)
113～140	3	0(0)
計	29	15(51.7)

[1] 表3を参照

いようである．1980年代までの本疾患流行が緩やかに，年余にわたって進行していった理由の一つとしてこのことが上げられるように思われる．

4）*M. pneumoniae*の月別及び年齢別検出成績

1976～2009年までの月別による*M. pneumoniae*検出成績を図7に示す．検体数は10～12月の秋から冬にかけて多くなるが，検出陽性率は8月をピークとして，夏季に高い値を示した．この傾向は，4年周期でマイコプラズマ肺炎流行が起こっていた1980年代，その周期性が不明瞭となった1990年代以降の集計結果においてほぼ同じものであった．秋から冬にはマイコプラズマ肺炎を含めた呼吸器疾患が多くなり，検体数もそれに比例しているものと思われるが，*M. pneumoniae*検出結果は，マイコプラズマ肺炎が夏季に多発することを示すものであった．

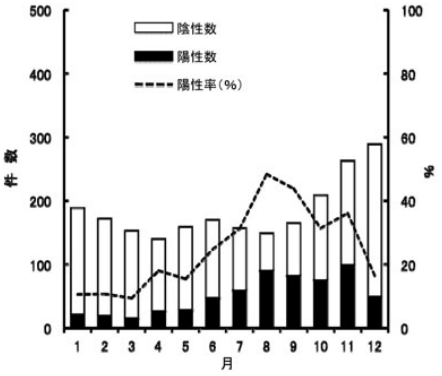

図7　*M. pneumoniae* の月別検出成績（1976～2009年）

図8に年齢別に見た検出成績を示す．マイコプラズマ肺炎は小児に多く，本稿の調査成績も主に小児科における患者を対象としたものであるため，12歳以下の患者年齢層が多くなっている．図のように，0歳児では検出されず，11歳までの年齢層においては，検出陽性率が概ね加齢と共に上昇し，12歳以降は次第に低下していき，成人になると著しく低くなる傾向が見られた．マイコプラズマ肺炎が年長児ほど多くなることについては，本疾患に細胞性免疫が関与し，感染機会の増加と共にそ

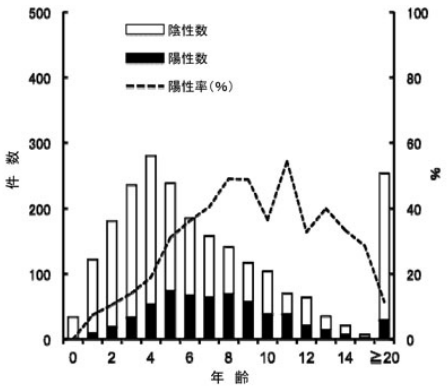

図8　*M. pneumoniae* の年齢別検出成績（1976～2009年）

の獲得率が高くなる年長児ほど肺炎を発症し易くなるとする[31]免疫学的背景を支持する成績と思われる．また，マイコプラズマ肺炎が学齢児童に多いことから，小学校内が主な感染の場となっているようにも考えられるが，著者ら[16,32]が1984年の流行年及びその前後年における年齢層別*M. pneumoniae*侵淫状況を調べたところでは，*M. pneumoniae*感染が家族内を中心に進行し，感染年齢層を拡大させながら，小学校との間で相互に感染持ち込みが繰り返され，マイコプラズマ肺炎の流行につながって行く様相が伺えた．上述のように，*M. pneumoniae*の月別検出成績から見ると，マイコプラズマ肺炎は8月を中心とした夏休みの時期に多発しており，このことも家族内感染が本疾患の流行に大きな役割を果たしていることを示しているように思われる．家族内感染の詳細な検討についてはプライバシーなどの問題もあり，容易には進められない状況にはあるが，今後，マイコプラズマ肺炎の大きな流行を防止する意味においては重要な課題と思われる．

2　血清抗体検査

血清抗体検査は，現在のマイコプラズマ肺炎の臨床診断における主流を占め，受身凝集反応法，補体結合反応法，酵素抗体法，間接蛍光抗体法，寒冷凝集反応法，イムノカード法，代謝阻止抗体法，mycoplasma-cidal法など，多くの方法がある．最近，簡便且つ迅速な抗体検査が可能であるイムノカード法に大きな期待が寄せられているが，*M. pneumoniae*の既感染を捉えることが少なくないとの指摘がなされており[33]，簡便性，検体処理数及び検査結果の信頼性などから受身凝集反応（Particle agglutination, PA）法が国内では広く普及している．また，感染防御に関与するとされる[34,35]代謝阻止抗体は，血清疫学的視点から重視されている．従って，本稿ではPA法と代謝阻止抗体法の二つの方法に関する検討成績を記載する．

1）　PA法

*M. pneumoniae*抗原を赤血球，ラテックス粒子ある

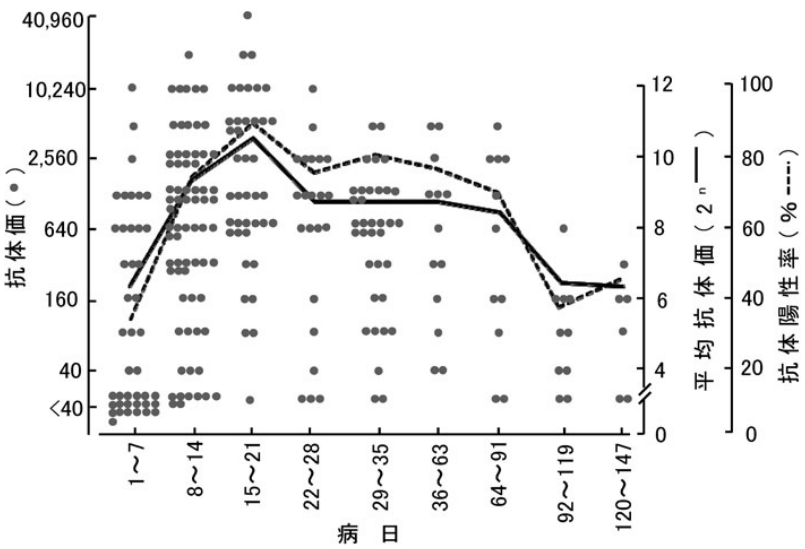

図9　病日に伴うIHA抗体価の分布と推移（n=247，平均抗体価は相乗平均値，抗体陽性率は≧320を示す例の比率）

いはゼラチン粒子などの凝集体に結合させ，これに患者血清を加えて反応させ，凝集の強さにより判定を行うものである．凝集体として赤血球を用いた場合が間接赤血球凝集反応（Indirect hemagglutination，IHA）法であるが，現在ではラテックス粒子，ゼラチン粒子などの凝集体が主体となっており，特異性と感度の向上が図られている．

図9に，神奈川衛研で実施した247例の患者血清（1982～1986年に採取）の病日に伴うIHA抗体価分布，平均抗体価（相乗平均；2^n）及び抗体陽性率（≧320）を示す[30]．抗体価は発病後8～14日から高くなり，15～21日で最高値を示し，以後，2～3ヶ月まで比較的高い値を維持するが，それを過ぎると低下し，≧320以上の抗体価を示す例も少なくなる傾向が見られる．従って，IHA抗体価が半年ないしは1年以上にわたり≧320の値を維持することはないように思われる．このような観点及び既報[36]から，シングル血清で測定した時のIHA抗体陽性値を≧320とした場合，発病後7日以内の陽性率は38.1％で，8～14日で73.9％と高くなり，15～21日では87.5％と最も高い値を示した．IHA法では主にIgM抗体を捕捉するとされ[37]，発病後7日以内でも≧320の抗体価を示す例が少なくないものの，シングル血清で測定する場合には発病後15日以降の血清を用いるのが適切であり，この時期に採取した血清と発病後7日以内の血清をペアで供試して抗体検査を行うことが好ましい．

また，抗体陽性率（38.1％）が低い発病後7日以内の患者では，IHA抗体検査による診断が難しい例が多く，一方で，同時期の患者について*M. pneumoniae*培養検査を行うと，上述のように，多くが陽性となる（表3参照）．培養検査は臨床診断の上では実用的ではないが，PCRなどによる迅速な*M. pneumoniae*検出法を併せて実施することで，より確実な診断が可能になると思われる．

2）代謝阻止抗体法

代謝阻止抗体の測定は液体培地での*M. pneumoniae*の培養を伴い，抗体によるブドウ糖発酵阻止（Fermentation inhibition，FI）あるいはテトラゾリウム還元阻止を指標として測定される．後者は遮光の必要性など，手技が煩雑であるため，前者により実施するのが一般的である．しかし，測定用培地に添加するウマ血清の品質が結果に大きく影響すること及び判定に熟練を要することなどの問題があった．特に，ウマ血清は含まれる補体が重要な役割を果たすとされ[38]，非加熱で用いることとなっていたが，上述のように非加熱ウマ血清にはマイコプラズマ発育阻害作用があることから，抗体測定に大きな影響を及ぼすことが懸念されていた．

これらの問題を解決するため，著者ら[39,40]はウマ血清に代えてγ－グロブリン除去ウマ血清とモルモット補体を抗体測定用培地に添加することで，高感度で再現性のあるFI抗体測定法（補体添加FI法）を開発した．この方法で測定した健常者を含む*M. pneumoniae*非感染者の血清（1985～1990年採取）における年齢層別FI抗体価分布及び平均抗体価（相乗平均，2^n）を図10に示す．0歳児の平均抗体価は1～3歳児と比べて高く，これは母体に由来する抗体が残存するためと思われ，これ以上の年齢層では年齢とともに高くなり，10～12歳から急上昇し，成人では小児と比べ著しく高い値を示した．上述の図8で示したように，*M. pneumoniae*の年齢別検出成績から見ると，マイコプラズマ肺炎は0歳児では少なく，11歳までは年齢と供に増加し，12歳から減少傾向を辿り，成人になると著減している．また，FI抗体はIgM

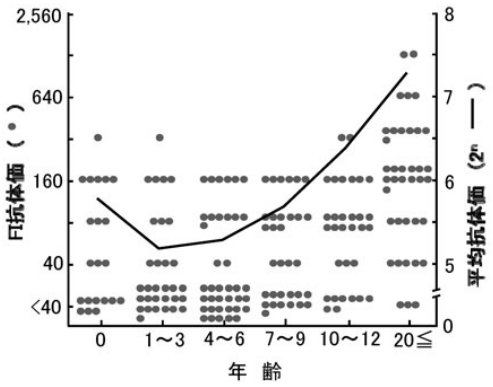

図10　健常者を含む*M. pneumoniae* 非感染者（n=191）における年齢層別FＩ抗体価分布と平均抗体価（平均抗体価は相乗平均値）

及びIgG抗体の両者を含み，血液中に長期間残存することが知られている[40,41,42]．これらのことから，*M. pneumoniae*感染を繰り返すことで加齢と供に本菌に対する免疫能が充実し，12歳以降はそれによる感染防御能が発揮されてマイコプラズマ肺炎が減少していくものと推察される．しかし，感染防御能を発揮できるFI抗体価レベルについては明確ではなく，また，本抗体以外に様々な因子が感染防御に関わっているものと考えられ，FI抗体とマイコプラズマ肺炎の発生疫学との関連性については推察の域を出ない．今後，補体添加FI法を利用した検討成績を積み重ねることにより，本疾患に関するより明解な血清疫学的見解が得られることを期待したい．

FI抗体及びIHA抗体法はIgGとIgMの両者を補足し，前者は主にIgGを補足するため，長期間にわたり患者血清から抗体検出が可能とされる[41,42]．著者らは，長期的な観察が可能であった2例（1984～1986年）のマイコプラズマ肺炎患者について，両方法による抗体検査を実施した経験があり，その成績を表5に示す．発病後200～300日程度において，いずれの患者もFI抗体が検出され，IHA抗体は検出されなかった．殊に，1名の患者におけるFI抗体価は212日後も1,280を示した．この結果からも，IHA抗体は年余にわたり残存するものではなく，

表 5　マイコプラズマ肺炎患者の長期観察例における病日と検査成績

患者年齢	病日[1)]	培養	抗体価 IHA	抗体価 FI
7	10	＋	2,560	5,120
	20	＋	2,560	1,280
	308	－	<40	160
13	12	＋	320	1,280
	20	＋	2,560	5,120
	212	－	<40	1,280

[1)] 表3を参照

一方で，FI抗体は長期間残存し，感染防御にも関与するものと推察される．

*M. pneumoniae*の分子疫学

1　*M. pneumoniae*の遺伝子型別

*M. pneumoniae*は，従来，抗原型あるいは遺伝子型に分類できないとされてきた．しかし，最近，本菌の接着因子であるP1蛋白の遺伝子塩基配列に多型が存在し，Ⅰ型とⅡ型に分類できることが明らかにされた[43,44]．神奈川衛研では国立感染症研究所との共同研究により，その遺伝子型別について検討してきた．

P1蛋白遺伝子型別はPCRと制限酵素処理を組み合わせたPCR-RFLP（RFLP, restriction fragment length polymorphism）法[29,44]で行い，*M. pneumoniae*のP1蛋白遺伝子塩基配列の前半部と後半部の可変領域をPCRで増幅し，増幅産物を制限酵素（*Hae*Ⅲ）で切断後，アガロースゲルなどによる電気泳動で切断パターンを観察する．現在，遺伝子型としてⅠ型及びⅡ型が知られており，Ⅱ型には亜型が存在する．図11は，それらのアガロース電気泳動パターンを示したものである．P1蛋白遺伝子塩基配列の前半部及び後半部ともにⅠ型パターンを示す菌をⅠ型，同様にⅡ型パターンを示すものをⅡ型とし，前半部はⅡ型パターンで，後半部がⅠ型でもⅡ型パターンでもない菌をⅡ型亜型としている．

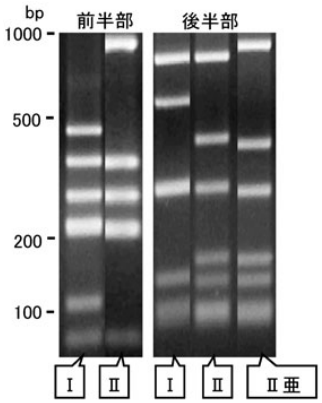

図11　*M. pneumoniae* P1蛋白遺伝子型のアガロース電気泳動パターン

2　過去33年間におけるP1遺伝子型の推移

1976～2008年に神奈川衛研で検出された432株の*M. pneumoniae*についてP1蛋白遺伝子を解析し，年次によるⅠ型とⅡ型の推移を調べた結果を図12に示す．この結果から，国内ではⅠ型とⅡ型が一定期間（8～10年）をもって入れ替わっていることが明らかになった[44,45,46]．このような現象の正確な理由は不明であるが，それぞれの遺伝子型に対するヒトの免疫レベルが関与していると

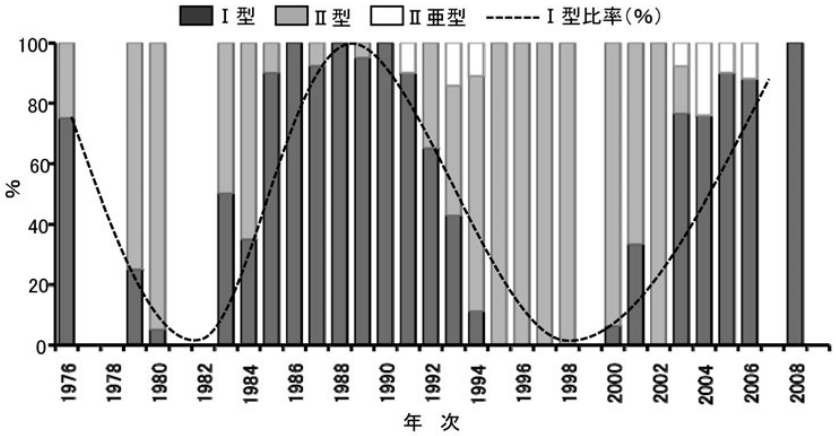

図12 *M. pneumoniae* P1蛋白遺伝子型の推移（1977，1978，1981，1982，1999及び2007年については遺伝子解析を実施せず）

推測され[47,48]，1980年代までのマイコプラズマ肺炎の周期的流行にも何らかの関連性があるのではないかとも考えられる．また，最近の数年間はⅠ型が優勢であり，Ⅱ型の殆どがⅡ型亜型であることが特徴である．

*M. pneumoniae*の薬剤耐性

1　薬剤耐性*M. pneumoniae*の出現

*M. pneumoniae*は細胞壁を欠くため，細菌性肺炎の治療に汎用されるペニシリン，セフェム系などのβ-ラクタム系薬剤は無効であり，マイコプラズマ肺炎の治療にはマクロライド系（MLs）薬剤が第一選択薬剤として使用されている[9,36]．テトラサイクリン（TC）系及びニューキノロン系薬剤も本症の治療に有効とされるが，これらは小児に対する副作用が発現する場合があり，使用が制限されている[36,49]．従来，これらの薬剤に対する耐性*M. pneumoniae*が患者から検出されることはなく，治療において薬剤耐性が問題視されることもなかった．しかし，2000年に，札幌市内の病院から神奈川衛研に送付された*M. pneumoniae*がMLs耐性と確認され[1]，以後，引き続き北海道で，更に，高知県，千葉県，神奈川県など，国内のいくつかの地域で耐性*M. pneumoniae*が検出されるようになってきている[50,51]．

神奈川衛研で最初に検出された上述のMLs耐性*M. pneumoniae*は，国立感染症研究所との共同研究により23SリボゾームRNA遺伝子に点変異を起こしていることが判明し[1]，これをきっかけに，国内における薬剤耐性*M. pneumoniae*の遺伝子変異に関する研究が進み，現在に至っている．

2　薬剤感受性試験

患者から検出された*M. pneumoniae*の薬剤耐性については，薬剤感受性試験を実施して詳細を調べる．その方法として，寒天平板希釈法及び液体培地希釈法があり，前者では，感受性判定のためのコロニー発育の観察が容易でないことから，神奈川衛研では後者を利用し，マイクロプレート（96ウェル）を利用した微量液体培地希釈法で行っている[52,53]．この方法ではブドウ糖とフェノールレッドを添加した液体培地を用い，薬剤による*M. pneumoniae*のブドウ糖発酵阻止反応による培地色の変化から最小発育阻止濃度（Minimal inhibition concentration, MIC/ml）を測定する．

3　*M. pneumoniae*の試験管内における薬剤耐性化

従来，*M. pneumoniae*は抗生物質などに対して耐性化し難いとされていた．そこで，著者ら[1,54]は，患者から検出された141株の*M. pneumoniae*につき，エリスロマイシン（EM）100μg/mlを添加した液体培地に接種して培養し，試験管内での耐性化を試みた．その結果，11株が耐性化した．これらの耐性株及び親株のMLs6薬剤，リンコマイシン（LCM），TCに対するMIC値と遺伝子解析結果を表6に示す．耐性化した*M. pneumoniae*は，供試した全てのMLs薬剤とLCMに交差耐性を示したが，TCには感受性であった．また，23SリボゾームRNAドメインⅤ遺伝子の塩基配列における2063位あるいは2064位に点変異が見られ，3株がA2063G（2063位のアデニンがグアニンに置換），5株がA2064G，他の3株はA2064Cの塩基置換が確認された．遺伝子変異と各薬剤に対する交差耐性パターンとの関係を見ると，2063位変異株はEM，オレアンドマイシン（OM），クラリスロマイシン（CAM），ロキシスロマイシン（RXM）などの14員環MLs薬剤及びLCMに高度耐性（MIC：200～≧400μg/ml）であり，ジョサマイシン（JM），スピラマイシン（SPM）などの16員環MLs薬剤にはより低い耐性（MIC：6.25～25μg/ml）を示した．一方，2064位変異株は16員環MLs薬剤にも高度耐性（MIC：200～≧400μg/ml）であった．このように，23Sリボゾーム

表6　試験管内（100μg/ml EM）において耐性化した*M. pneumoniae*（11株）の遺伝子変異及びMLs薬剤，LCM，TCに対するMIC値，並びに親株の各薬剤に対するMIC値

変 異[1]	菌 株	MIC（μg/ml）[2]							
		EM	OM	JM	SPM	RXM	CAM	LCM	TC
A2063G	1225EMR 1436EMR 2043EMR	>400	>400	6.25 ～ 12.5	6.25 ～ 25	400	200 ～ 400	400	0.195 ～ 0.39
A2064G	1020EMR 1026EMR 1046EMR 1224EMR 1653EMR	200 ～ >400	400 ～ >400	400 ～ >400	>400	50 ～ 100	25 ～ 50	50 ～ 200	0.195 ～ 0.39
A2064C	1253EMR 1255EMR 1552EMR	200 ～ >400	200 ～ 400	200 ～ 400	200 ～ >400	100	25 ～ 50	50	0.195 ～ 0.39
親 株		0.006 ～ 0.012	0.098	0.024 ～ 0.098	0.098	0.012 ～ 0.024	0.006	0.195 ～ 0.39	0.195 ～ 0.39

[1] 23SリボゾームRNAドメインV遺伝子における点変異
[2] 薬剤感受性試験はデュプリケート（duplicate）で実施し，MICを測定

RNAドメインV遺伝子における塩基置換の位置により耐性パターンが異なる傾向が伺えた．

図13に，後述する変異（C2617G）を含めて，2008年までに神奈川衛研で検出されたMLs耐性*M. pneumoniae*の23SリボゾームRNAドメインVにおける変異（表現型）を示す．MLs薬剤の作用機序は，細菌の23SリボゾームRNAに薬剤が結合し，蛋白合成を阻害することであり，図に示すような変異が起こると，23SリボゾームRNAに結合できなくなるため作用を発揮できなくなり，細菌は耐性を発現する．これらの変異は，従来，23SリボゾームRNAドメインV遺伝子の塩基配列を解析して検出され[55]，これには高価な機器と煩雑で高度な技術を要していたが，最近では，PCR-RFLP法による迅速な検出法が確立されており[56]，神奈川衛研でも実施可能となっている．

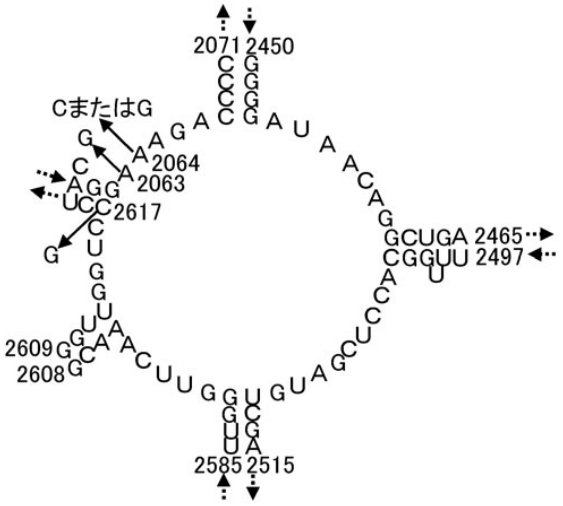

図13　MLs耐性化に伴う *M. pneumoniae* の23SリボゾームRNAドメインVにおける点変異の表現型（耐性化すると，2063位のAがG，2064位のAがCまたはG，2617位 のCがGに置換することを示す）

100μg/mlのEM存在下で耐性化した11株の*M. pneumoniae*の親株（感受性株）を供試し，EM濃度別に耐性化を試みた結果を表7に示す．4株（1026，1225，1436，1552）が0.024～50μg/mlの全濃度において耐性化し，全般的に幅広いEM濃度域において耐性化が認められ，計110株の耐性*M. pneumoniae*が得られた．これらの結果は，*M. pneumoniae*のEM耐性化がEM濃度に依存していないことを示すものであり，23SリボゾームRNA遺伝子の突然変異により出現した耐性*M. pneumoniae*が，EM存在下において選択的に増殖して耐性が確立するものと推定される．

EM濃度別に得られた110株の耐性*M. pneumoniae*の内12株について，23SリボゾームRNAドメインVの遺伝子変異を調べた結果を表8に示す．EM濃度と遺伝子変異との間に一定の関連性は見られなかったが，A2063Gの変異を示すものが7株と最も多く，A2063G，A2064G及びA2064C以外にC2617Gの変異が新たに見出された．A2063G，A2064G及びA2064C変異株は各薬剤に対し，上述と同様の耐性パターンを示したが，C2617G変異株は，表9に示すように，EM，OM，RXM，CAMなどの14員環MLs薬剤及びLCMには低いMIC値な

表７　試験管内（100μg/ml EM）において耐性化した*M. pneumoniae*（11株）の親株を供試したEM濃度別による耐性化試験成績

菌株	EM濃度（μg/ml）											
	0.024	0.049	0.098	0.195	0.39	0.78	1.56	3.125	6.25	12.5	25	50
1020	−[1]	+[2]	+	+	+	+	+	+	−	+	−	−
1026	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1046	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−
1224	+	−	+	−	+	+	+	+	−	+	+	+
1225	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1253	+	+	+	−	+	+	+	+	−	+	−	−
1255	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	+
1436	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1552	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1653	−	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2043	−	−	+	−	−	−	+	−	+	+	+	−

[1] 耐性化しなかったもの
[2] 耐性化したもの

がらも耐性（0.78～12.5μg/ml）を示したものの，他のMLs薬剤に対してはむしろ感受性（0.049～0.39μg/ml）とも言えるMIC値を示した．

これらのことから，*M. pneumoniae*のMLs耐性は，23SリボゾームRNAドメインＶ遺伝子の主に2063あるいは2064位の変異により発現し，これらの位置に変異が起こった場合には高度耐性となり，他の位置の変異によっても耐性となることはあるが，2063あるいは2064位から遠ざかるほど，耐性度はより低く発現するように思われる．また，0.049μg/mlのEM濃度で耐性化が認められたことは，EM投与中の患者においても，体内で*M. pneumoniae*の耐性化，即ち，変異により生じた耐性菌が選択的に増殖することがあり得ることを示唆するものである．

尚，その後の神奈川衛研での検討により，試験管内においてEM以外のMLs薬剤による*M. pneumoniae*の耐性化が認められており，A2063C，A2063Tなどの新たな変異が見出されている．

４　薬剤耐性*M. pneumoniae*の検出成績

MLs耐性*M. pneumoniae*の検出については，上述のようなPCR-RFLP法で可能であり，神奈川衛研ではこの方法を患者の咽頭スワブから抽出したDNAサンプルに直接利用する迅速法も検討している．しかし，PCR-RFLP法では既知の遺伝子変異を持つ耐性菌の検出はで

表８　各EM濃度の試験管内において耐性化した*M. pneumoniae*の遺伝子変異

菌株	EM濃度（μg/ml）	変異[1]
1020EMR1	0.049	A2063G
1020EMR2	1.56	A2064G
1020EMR3	3.125	C2617G
1020EMR4	12.5	A2064G
1225EMR1	0.195	A2064G
1225EMR2	1.56	A2063G
1225EMR3	25	A2063G
1255EMR1	0.049	A2063G
1255EMR2	12.5	A2064C
2043EMR1	0.098	A2063G
2043EMR2	1.56	A2063G
2043EMR3	25	A2063G

[1] 表6を参照

表９　C2617G変異株のMLs薬剤，LCM及びTCに対するMIC値

薬剤	MIC（μg/ml）[1]
EM	3.125～6.25
OM	12.5
JM	0.049～0.098
SPM	0.195～0.39
RXM	1.56～3.125
CAM	0.78
LCM	12.5～25
TC	0.195～0.39

[1] 表6を参照

きるものの，それら以外の耐性菌は検出できない．従って，培養検査で検出された*M. pneumoniae*につき，薬剤感受性試験を行い，MIC値を調べた上で耐性を確認する必要がある．

表10に，神奈川衛研で実施された薬剤感受性試験によるMLs耐性*M. pneumoniae*の検出成績を示す．1979～2008年に患者から検出された*M. pneumoniae*の内，1999年までの505株中にMLs耐性株は検出されなかったが，2000年に札幌鉄道病院から送付された*M. pneumoniae*が耐性株であった．この耐性株は9歳の女児から検出されたもので，患者はクリンダマイシン（CLI）を7日間投与されても症状の改善が見られず，CLI耐性*M. pneumoniae*の感染と推定されていた[49]．薬剤感受性試験結果から，MLs薬剤及びCLIと同系のLCMに高度の耐性を有し，遺伝子解析の結果，A2063Gの変異が確認された．著者及び共同研究者の知り得る範囲では，患者から検出され，遺伝子変異が確認された国内外における最初のMLs耐性*M. pneumoniae*がこの菌株である．

表10　患者からのMLs耐性*M. pneumoniae* 検出成績

年	検査株数	耐性株数（%）
1979～1985	200	0
1986～1990	171	0
1991～1995	87	0
1996～2000	48	1（2.1）
2001～2005	97	13（13.4）
2006～2008	82	19（23.2）
計	685	33（4.8）

以後，北海道，高知県，山形県，山梨県などから当所に送付された臨床検体あるいは*M. pneumoniae*からMLs耐性株が検出され，神奈川県内においても検出されている[17,50]．2008年の段階で，神奈川衛研では33株のMLs耐性*M. pneumoniae*を検出しており，表10のように，ほぼ5年ごとに整理すると，耐性株の検出率が上昇しているように見えるが，最近，当所に送付されてくる検体は耐性菌感染が疑われる患者から採取されたものが多いことを考慮する必要があり，必ずしも数値通りに解釈はできないように思われる．患者から検出された33株のMLs耐性*M. pneumoniae*の遺伝子変異を調べた結果，表11のように，A2063Gが25株と最も多く，A2064Gが5株，A2063C，A2064C及びC2617Gが各1株であった．A2063Gが多かったことは上述の試験管内耐性化試験の結果と類似していたが，A2063Cは耐性化試験では検出されなかった変異である．また，これらの耐性*M. pneumoniae*のMLs薬剤，LCM及びTCに対するMIC値は試験管内で耐性化したものと同一であった．

表11　患者から検出されたMLs耐性*M. pneumoniae* の遺伝子変異

変 異[1]	株 数
A2063C	1
A2063G	25
A2064C	1
A2064G	5
C2617G	1

[1] 表6を参照

2000年以降，MLs耐性*M. pneumoniae*が検出され始めた理由は現在不明であるが，様々な細菌感染症などへのMLs薬剤の汎用がその背景になっているであろうことは想像に難くない．現在，マイコプラズマ肺炎において，MLs耐性*M. pneumoniae*が関与した重症例が増加している状況にはなく，治療においても深刻な問題となることはないようである．一方で，国内におけるMLs耐性*M. pneumoniae*の検出率は15％程度と推定され[12]，耐性菌感染患者においては症状改善の遅延など，薬剤治療効果の低下を招いていることも事実であり[57]，今後の耐性菌拡大の防止は必須である．

まとめ

マイコプラズマ肺炎は，現時点においては重症例や死亡例こそ少ないものの，小児科領域では重要な疾患であり，毎年多数の患者が発生していることは国の感染症発生動向調査による成績が示している通りである．本疾患を含めて最近の感染症は，抗菌・抗ウイルス薬などの開発・普及によりその治療法が大きく進歩したが，一方で，病原体の遺伝子変異に伴う病原性の変化や薬剤耐性化などが脅威になってきていることも事実である．*M. pneumoniae*は一般細菌に比べ遺伝子構造がより単純であるが故に，変異を起こし易いとも考えられ，MLs耐性菌が2000年以降突然出現し始めたように，今後，新たな薬剤耐性や病原性の変化が起こる可能性は否定できない．また，*M. pneumoniae*を取り扱う機関が極めて少なかったため，本細菌の病原性を含めた細菌学的性状は不明な点が少なくないことから，今後，それらが解明されると，既存の疾患などとの新たな関係が見出される可能性もあろう．いずれにしても，病原体の変化を迅速に

把握し，適切な治療と予防対策を講ずるには，*M. pneumoniae*の培養検査を国内のどこかの機関で今後も実施し，同時に検出菌株の保存を継続していく必要がある．長年，マイコプラズマ肺炎の検査・調査研究に携わった1人として，将来もその機関の一つが神奈川衛研であることを望みたい．

尚，本稿の内容は，著者が平成21年度日本マイコプラズマ学会北本賞を受賞した際に講演したものである．

謝辞

稿を終わるに当たり，著者の長年にわたるマイコプラズマ肺炎に関する調査研究において，懇篤なる指導と助言をいただいた元国立感染症研究所細菌第二部第四室長佐々木次雄博士，元札幌鉄道病院小児科医長成田光生博士（現札幌徳州会病院小児科医長）及び元埼玉医科大学第二小児科学教室講師山崎 勉博士（現若葉こどもクリニック院長），検査・調査研究業務を進める上でご協力いただいた国立感染症研究所細菌第二部主任研究官佐々木裕子博士，同主任研究官見理 剛博士，神奈川県衛生研究所微生物部（旧細菌病理部を含む）及び同微生物部旧呼吸器系細菌グループの皆様に深謝する．また，検体の採取などにご協力をいただいた神奈川県感染症発生動向調査（旧感染症サーベイランスを含む）病原体定点病院，神奈川県立循環器呼吸器病センター（現神奈川県立病院機構神奈川県立循環器呼吸器病センター），神奈川県立こども医療センター（現神奈川県立病院機構神奈川県立こども医療センター）及び茅ヶ崎市立病院小児科の皆様に深謝する．

（平成23年８月５日受理）

参考文献

1) Okazaki, N., Narita, M., Yamada, S., Izumikawa, K., Umetsu, M., Kenri, T. *et al.* : Characteristics of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* strains isolated from patients and induced with erythromycin in vitro, Microbiol. Immunol., **45**, 617-620 (2001)

2) 泉川欣一：重症マイコプラズマ肺炎の病態，病原微生物検出情報，**28**，33-35（2007）

3) 永山洋子：肺炎マイコプラズマと喘息・喘鳴との関係について，病原微生物検出情報，**28**，37-38（2007）

4) Dandekar, T., Huynen, M., Regula, J.T., Ueberle,C., Zimmermann, C.U., Andrade, M.A. *et al.* : Re-annotating the *Mycoplasma pneumoniae* genome sequence: adding value, function and reading frames, Nucleic Acids Res., **28**, 3278-3288(2000)

5) Inagaki, Y., Bessho, Y. and Osawa, S. : Lack of peptide-release activity responding to codon UGA in *Mycoplasma capricolum*, Nucleic Acids Res., **21**, 1335-1338 (1993)

6) Waites, K.B. and Talkington, D.F. : *Mycoplasma pneumoniae* and its role as a human pathogen, Clin. Microbiol. Rev., **17**, 697-728 (2004)

7) Razin, S. and Jacob, E. : Mycoplasma adhesin, J. Gen. Microbiol., **138**, 407-422(1992)

8) Seto, S., Kenri, T., Tomiyama, T.and Miyata, M. : Involvement of P1 adhesin in gliding motility of *Mycoplasma pneumoniae* as revealed by the inhibitory effects of antibody under optimized gliding conditions, J. Bacteriol., **187**, 1875-1877 (2005)

9) 岡崎則男，見理 剛，佐々木次雄，成田光生：肺炎マイコプラズマ，荒川宜親，渡辺治雄監修，佐々木次雄編，呼吸器系細菌感染症，pp. 45-65，じほう，東京（2006）

10) 国立感染症研究所感染症情報センター：マイコプラズマ肺炎，感染症発生動向調査週報，第9週（2003）

11) 田中裕士：重症マイコプラズマ肺炎の機序，病原微生物検出情報，**28**，35-37（2007）

12) 国立感染症研究所感染症情報センター：マイコプラズマ肺炎，2006年現在，病原微生物検出情報，**28**，31-32（2007）

13) 国立感染症研究所感染症情報センター：マイコプラズマ肺炎，感染症発生動向調査週報，第31週（1999）

14) 新津泰孝，長谷川純男，堀川雅浩，小松茂夫，州崎 健，末武富子：肺炎マイコプラズマ感染症流行の規則正しい4年周期性，抗研誌，**30**，57-64（1978）

15) 岩崎博圓，真崎美矢子，山下景子，須山尚史，富田弘志，小森宗敬ほか：過去15年間の長崎市における*Mycoplasma pneumoniae*感染症の発生状況についての検討，第11回日本マイコプラズマ学会記録，p.93-96（1984）

16) 岡崎則男，明間鯉一郎，滝沢金次郎：分離検査による*Mycoplasma pneumoniae*肺炎の追跡，感染症学雑誌，**61**，47-554（1986）

17) Okazaki, N., Ohya, H. and Sasaki, T. : *Mycoplasma pneumoniae* isolated from patients with respiratory infection in Kanagawa prefecture in

1976-2006: emergence of macrolide-resistant strains, Jpn. Infect. Dis., **60**, 325-326 (2007)

18) 岡崎則男，明間鯉一郎，宮本　泰：肺炎マイコプラズマの発育に及ぼす馬血清，鶏卵黄液および酵母エキス濃度の影響，神奈川衛研報告，**9**，37-39 (1979)

19) Chanock, R.M., Hayflic, L. and Barile, M. : Growth on artificial medium of an agent associated with atypical pneumonia and its identification as a PPLO, Proc. Nat. Acad. Soc. U.S.A., **48**, 41-49 (1962)

20) 中村昌弘，尾形　学：PPLO寒天培地，佐々木正五，尾形　学，中村昌弘編，マイコプラズマ，pp. 154-158，講談社，東京 (1975)

21) 早津栄蔵，吉岡守正，木原光城，有馬重純：正常ウマ血清中のMycoplasma 発育阻害因子，医学と生物学，**73**，141-14 (1966)

22) Okazaki, N. and Fujiwara, K. : Some observations on Mycoplasma-cidal activity of horse serum, J. Vet. Med. Sci., **54**, 359-361 (1992)

23) 中村昌弘，伊藤　亨，市丸弘子：ヒト・マイコプラズマの分離と同定，日本細菌学会教育委員会編，細菌学技術叢書2，ヒト・動物および植物マイコプラズマの分離と同定，pp.2－39，菜根出版，東京 (1982)

24) 輿水　馨，小谷　均：動物マイコプラズマの分離と同定，日本細菌学会教育委員会編，細菌学技術叢書2，ヒト・動物および植物マイコプラズマの分離と同定，pp.42-96，菜根出版，東京 (1982)

25) 岡崎則男，佐々木次雄：呼吸器感染症，マイコプラズマ，臨床とウイルス，**23**，247-250 (1995)

26) 岡崎則男，山井志朗，佐々木次雄，佐々木裕子，小島幸司，矢野靖子：PCR法による咽頭スワブからの*Mycoplasma pneumoniae*の検出，感染症学雑誌，**69**，723-728 (1995)

27) 岡崎則男，山井志郎，佐々木裕子，佐々木次雄：二段階PCR法による咽頭スワブからの*Mycoplasma pneumoniae*検出，感染症学雑誌，**72**，742-746 (1998)

28) Ieven, M., Uris, D., Van Bever, H., Quint, W., Niesters, H.G.M. and Goossens, H. : Detection of *Mycoplasma pneumoniae* by two porymerase chain reactions and role of *M. pneumoniae* in acute respiratory tract infections in pediatric patients, J. Infect. Dis., **173**, 1445-1452 (1996)

29) 岡崎則男，大屋日登美，見理　剛，佐々木次雄：肺炎マイコプラズマの培養検査，PCR法による検出及びP1蛋白遺伝子型別法，病原微生物検出情報，**28**，38-40 (2007)

30) 岡崎則男，明間鯉一郎，滝沢金次郎，広岡義郎，小島幸司：*Mycoplasma pneumoniae*感染患者における*M. pneumoniae*分離とIHA抗体価，感染症学雑誌，**63**，714-719 (1989)

31) Fernald, G.W., Collier, A.M. and Clyde, W.A. Jr. : Respiratory infections due to *Mycoplasma pneumoniae* in infants and children, Pediatrics, **55**, 327-335 (1975)

32) 岡崎則男，明間鯉一郎，滝沢金次郎，矢野靖子，小島幸司，広岡義郎：肺炎マイコプラズマ感染症の家族内発生について，神奈川衛研報告，**21**，16-18 (1991)

33) 成田光生：マイコプラズマ感染症診断におけるIgM抗体迅速検出法の有用性と限界，感染症学雑誌，**81**，149-154 (2007)

34) Smith, C.B., Fernald, W.T. and Chanock, R.M. : Inactivated *Mycoplasma pneumoniae* vaccine. Evaluation in volunteers, J.M.C.A., **199**, 353-358 (1967)

35) Taylor-Robinson, D., Purcell, R.H., Wong, K.G. and Chanock, R.M. : A color test for the measurement of antibody to certain mycoplasma species based upon the inhibition of acid-production, J. Hyg. Cambrige, **64**, 91-104 (1966)

36) 泉川欣一：マイコプラズマ肺炎の診断と治療，病原微生物検出情報，**19**，3－5 (1998)

37) Fernald, G.W., Clyde, W.A. Jr. and Denny, F.W. : Nature of the immune response to *Mycoplasma pneumoniae*, J. Immunol., **98**, 1028-1038 (1967)

38) Fernald, G.W., Clyde, W.A., Jr. and Denny, F.W. : Factors influencing growth inhibition of *Mycoplasma pneumoniae* by immune sera, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **126**, 161-166 (1967)

39) 岡崎則男，明間鯉一郎，滝沢金次郎：モルモット補体を利用した*Mycoplasma pneumoniae*の代謝阻止抗体測定法，日細菌誌，**45**，931-935 (1990)

40) Okazaki, N., Akema, R. and Takizawa, K. : A sensitive method for detecting the fermentation-inhibition antibody to *Mycoplasma pneumoniae*, Microbiol. Immunol., **35**, 871-878 (1991)

41) Gordero, L., Florey, C. du V. and Horstmann, D.M. : Persistence of antibodies to *Mycoplasma pneumoniae* following naturally acquired

infections, Amer. J. Epidemiol., **98**, 428-432 (1968)

42) 岡崎則男，山井志朗，佐々木次雄：ヒト血清の抗肺炎マイコプラズマ発育阻止抗体分布，神奈川衛研報告，**27**，31-33（1997）

43) Su, C.J., Dallo, S.F. and Baseman, J.B.: Molecular distinction among clinical isolates of *Mycoplasma pneumoniae,* J. Clin. Miclobiol., **28**, 1538-1540 (1990)

44) Sasaki, T., Kenri, T., Okazaki, N., Iseki, M., Yamashita, R., Shintani, M. *et al.*: Epidemiological study of *Mycoplasma pneumoniae* infections in Japan based on PCR-restriction fragment length polymorphism of the P1 cytadhesin gene, J. Clin. Miclobiol., **34**, 447-449 (1996)

45) Kenri, T., Okazaki, N., Yamazaki, T., Narita, M., Izumikawa, K., Matsuoka, M. *et al.*: Genotyping analysis of *Mycoplasma pneumoniae* clinical strains in Japan between 1995 and 2005: type shift phenomenon of *M. pneumoniae* clinical strains, J. Med. Miclobiol., **57**, 469-475 (2008)

46) 大屋日登美，岡崎則男：肺炎マイコプラズマ感染症の疫学と実験室診断法，化学療法の領域，**26**，20-27（2010）

47) 岡崎則男，見理　剛，佐々木祐子，佐々木次雄：最近の*Mycoplasma pneumoniae*分離成績，分離株のP1蛋白遺伝子及び血清代謝阻止抗体保有の動向，日本マイコプラズマ学会雑誌，**24**，131-133（1997）

48) 見理　剛，山崎　勉，岡崎則男，成田光生，佐々木次雄：マイコプラズマ肺炎患者の血清に見られる菌型特異的な血球吸着阻害活性，日本マイコプラズマ学会雑誌，**32**，10-12（2006）

49) 成田光生，中山雅之，山田　諭，岡崎則男，佐々木次雄：肺炎マイコプラズマ感染症における臨床的クリンダマイシン耐性について，臨床小児医学，**48**，123-127（2000）

50) 岡崎則男，大屋日登美，佐々木次雄，成田光生：肺炎マイコプラズマの分離培養と薬剤感受性，日本マイコプラズマ学会雑誌，**33**，60-63（2006）

51) Morozumi, M., Hasegawa, K., Kobayashi, R., Inoue, N., Iwata, S., Kuroki, H. *et al.*: Emergence of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* with a 23S rRNA gene mutation, Antimicrob. Agents Chemother., **49**, 2302-2306 (2005)

52) 岡崎則男，明間鯉一郎，広岡義郎，滝沢金次郎：*Mycoplasma pneumoniae*の抗生物質感受性について，神奈川衛研報告，**17**，8-13（1987）

53) 岡崎則男，大屋日登美，渡辺祐子，佐々木次雄：肺炎マイコプラズマの凍結保存温度と凍結保存株の薬剤感受性試験への利用，神奈川衛研報告，**34**，32-33（2004）

54) 岡崎則男，佐々木次雄：*Mycoplasma pneumoniae*分離株の試験管内におけるエリスロマイシン耐性獲得と遺伝子変異，日本マイコプラズマ学会雑誌，**28**，84-87（2006）

55) Ludwig, W., Kirchof, G., klugbauer, N., Weizenegger, M., Betzl, D., Ehrmann, M. *et al.*: Complete 23S ribosomal RNA sequence of gram-positive bacteria with a low DNA G+C content, Syst. Appl. Microbiol., **15**, 487-501 (1992)

56) Matuoka, M., Narita, M., Okazaki, N., Ohya, H., Yamazaki, T., Ouchi, K. *et al.*: Characterization and molecular analysis of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* clinical isolates obtained in Japan, Antimicrob. Agents Chemother., **48**, 4624-4630 (2004)

57) Satowa, S., Yamazaki, T., Narita, M., Okazaki, N., Suzuki, I., Andoh, T. *et al.*: Clinical evaluation of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae,* Antimicrob. Agents Chemother., **50**, 709-712 (2006)

神奈川県衛生研究所研究報告　No. 41（2011）
Bull. Kanagawa Ins. of P.H.

短報

神奈川県域において分離された結核菌のVNTR法による遺伝子型別について（2008-2011）

高橋智恵子[1]，近内美乃里[2]，古川一郎[1]，浅井良夫[1]，大屋日登美[1]，黒木俊郎[1*]，古屋由美子[1]

Genotyping by variable numbers of tandem repeats (VNTR) analysis for *Mycobacterium tuberculosis* isolated in Kanagawa from September,2008 to February,2011

Chieko TAKAHASHI, Minori KONNAI, Ichiro FURUKAWA, Yoshio ASAI, Hitomi OHYA, Toshiro KUROKI and Yumiko FURUYA

緒言

全世界の人口の3分の1が結核に感染していると言われ，2008年におけるWHOの推定によれば940万人が発症し，130万人が死亡している．日本における2009年の結核の統計[1)]では，24,170人が発症し，2,155人が死亡しており，罹患率（人口10万人当たり）は19.0となっている．罹患率からみた我が国の結核は，統計が確立された1961年の高蔓延期（罹患率：445.9）から1980年代以降の中蔓延期（罹患率：50）へと移行して順調に低下したものの，低下が鈍化し，現在も先進諸国の3～5倍の罹患率を示し，中蔓延状況が続いている．このような状況の中で，国はもとより，各地方自治体においても，保健予防担当所管課，保健所および地方衛生研究所等において，現状に沿ったより効果的な結核対策の実施が求められているところである．

最近の法的な結核対策としては，2008年に従来の結核予防法が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（感染症法）へ統合されたことにより，より効果的に推進するための法的背景が整備された．また，この法律に基づく結核の接触者健康診断の手引き（改訂第4版2010年）においては，積極的な結核感染経路の解明が奨励されており，その手段として，restriction fragment length polymorphism（RFLP)法やvariable numbers of tandem repeats（VNTR）法による結核菌分離株の分子疫学的解析を実施すべきことが明記されている．

今回，著者らは，神奈川県域（以下，県域と略す）における集団感染疑い事例や散発事例において分離された結核菌株を収集し，VNTR法による結核菌の遺伝子型別を実施し，さらに分子疫学的解析（Minimum spanning trees；MST）を試みたので報告する．

材料と方法

（1）散発事例から菌株を収集するシステムの構築

結核菌株収集については，各保健福祉事務所の保健予防課，関係医療機関および県健康危機管理課と連携を図りながら結核菌株収集のシステムを構築した．菌株の使用については患者から書面による同意を得ることとし，倫理審査委員会の承認を受けた．

県域における2009年の結核新規登録患者は584名であり，これらの患者から分離された全結核菌株の遺伝子型別検査を行うことは困難であるため，収集する菌株には一定の条件を付けた．最近の感染による発症例の動向を探るために，既感染率の低い50歳以下とし，その上で，初回治療患者に絞ることにより，再感染例を除外した．また，塗抹陽性患者からの分離株とすることで，感染を広く伝播させると予測される株に絞った．つまり，このシステムにおいて収集する菌株は，県域の結核登録患者のうち初回治療，塗抹陽性，50歳以下に該当する菌株とした．この条件を満たすのは年間100株程度と推定されたが，菌株収集システムを構築するために日数を要したことから，実際にこのシステムで収集した菌株は，６株に留まった．

（2）供試菌株

システムにより収集した6株のほかに，2008年9月から2011年2月までに保健福祉事務所から遺伝子型別検査を依頼された結核菌（集団感染疑い事例を含む）30株および対照株として2株（標準株37Ra，首都圏を中心に流行している通称M株[2)]）の計38株を用いた．

（3）VNTR法による遺伝子型別と型別結果の解析

結核菌からのDNA抽出はインスタジーンマトリックス（Bio-Rad）を用いた．結核菌DNA上の遺伝子解析部位は，前田ら[3)]の報告した12か所（JATA 12），即ち，Mtub 04，MIRU 10，Mtub 21，Mtub 24，QUB 11 b，VNTR 2372，MIRU 26，QUB 15，ETR-E，VNTR

1神奈川県衛生研究所　微生物部
〒253-0087茅ヶ崎市下町屋1-3-1
Chieko.vvme@pref.kanagawa.jp
1＊神奈川県衛生研究所　現企画情報部
2神奈川県衛生研究所　企画情報部

3336，QUB 26，VNTR 4156とし，これらの部位をPCR法により増幅した．PCR反応は既報[3]に従い，Ex Taq HS（Takara）およびGC buffer I（Takara）を用い，94℃で5分加熱処理後，94℃で30秒の熱変性，63℃で30秒のアニーリングおよび72℃で3分の伸長反応を35サイクル実施し，最後に72℃で7分の加熱処理を行った．PCR増幅産物は2％NuSieve 3:1（Takara）を使用したアガロースゲル電気泳動で解析し，産物サイズの大きさから反復塩基配列の反復数を求めた．VNTR法で得られた各結核菌株の反復数について，遺伝子解析ソフト（Bio Numerics ）を用い，MSTを行った．

結果および考察

表に示すように，システムで収集した6株を含む36株が分離された患者の性別は男女比が2：1で，2009年の結核統計[1]で示された1.6：1に比べると男性が若干多かった．今回は，収集システムにより50歳以下の患者由来の菌株を積極的に収集したが6株と少なく，患者全体(36人)の年齢分布は，日本全体の結核統計における年齢分布とほとんど同様であった．

表　結核菌提供結核患者の性別および年代別分布

（人）

	10代	20代	30代	40代	50代	60代	70代	80代	不明	合計
男性		1	4	4	6	2	1	5	1	24
女性	1	4		1	1	2	1	2		12
計	1	5	4	5	7	4	2	7	1	36

今回供試した36株と対照株2株，計38株のVNTR遺伝子型に基づきMSTを行った結果，図に示すような遺伝系統となり，M株を分岐点として，3方向へ延びる傾向が伺えた．M株は2003～2004年にかけて首都圏で広く流行した株で，ストレプトマイシン（SM）にのみ耐性

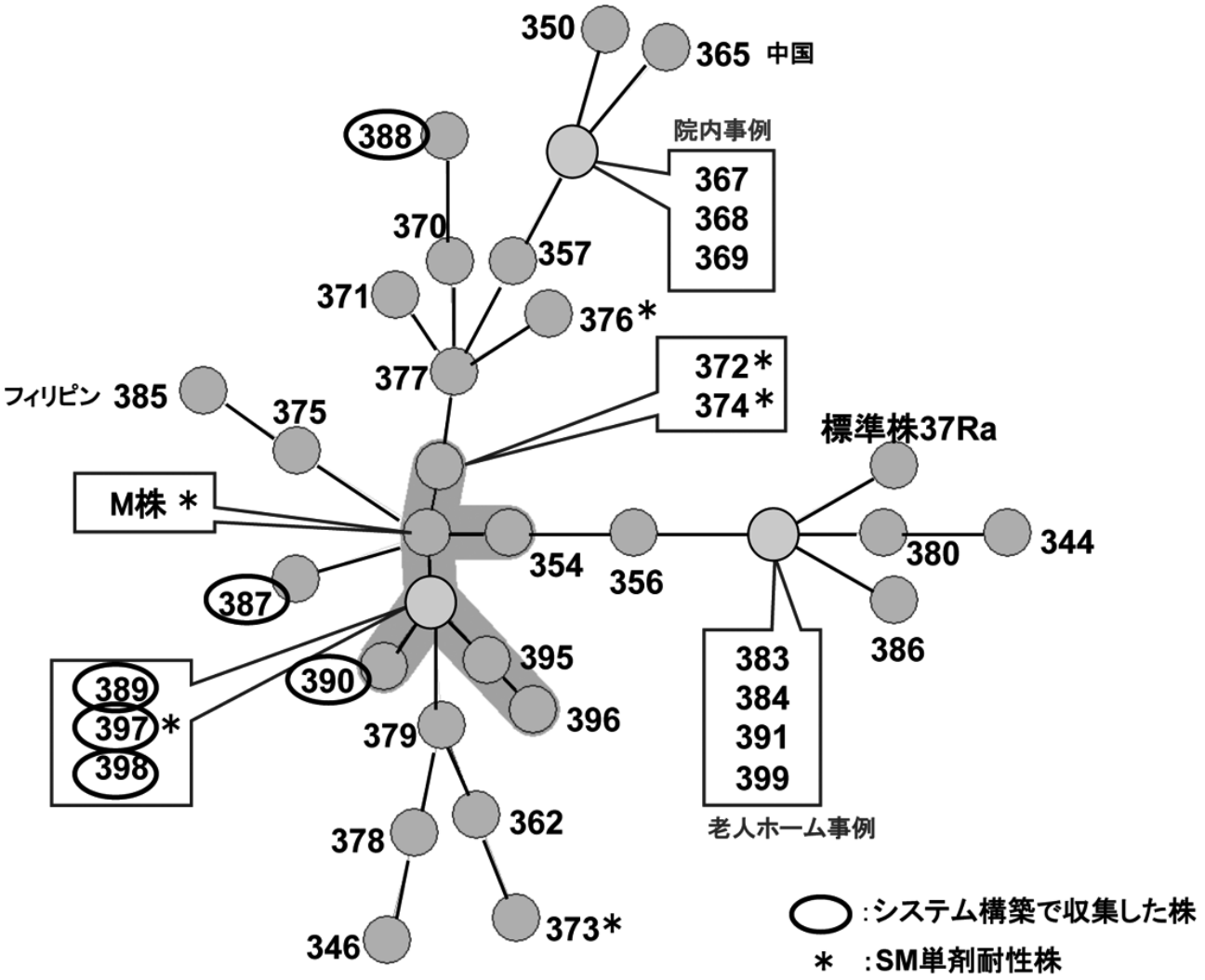

図　県域における結核菌分離株のVNTR（JATA12）型別結果に基づくMinimum spanning tree

を示す株である[2]．また，医療機関からの情報ではSM単剤耐性の株は図に示したNo.372，373，374，376，397の5株で，1株(No.373)を除いては比較的M株に近いところに位置していた．また，システムにより収集した6株(No.387，388，389，390，397，398）の内，1株(No.388)を除いてはM株の周辺に位置しており，遺伝子型のパターンがM株に類似していることから，近年の流行遺伝子型と推察できた．特に，No.389，397，398の3株のそれぞれが係わる感染事例は，管轄保健福祉事務所が異なり患者の居住地が離れていることなど，疫学上の共通点も見られなかったにもかかわらず，遺伝子型は完全に一致していた．これら3株の提供患者の年齢は20代，30代，50代と異なっており，50歳以下は結核既感染率が低いこと，社会的な活動範囲が広いことなどから，この遺伝子型の結核菌が現在蔓延している可能性があり，今後の動向を注視する必要があると考えられた．

また，SM耐性株のNo.372および374は同じ保健福祉事務所依頼の菌株であったが，感染源患者情報および保健福祉事務所結核担当者からの情報においては疫学上の共通点は見られなかった．No.374は20代の患者からの分離株で，患者は都内にある学校に通学しており，当該患者を感染源患者とした接触者健診において14名にQFT検査を実施したところ，陽性が1名，判定保留が2名との結果であり，周囲に感染を広めていたことが示唆され，さらに，他へ伝播する可能性も考えられた．

これらのように，これまで疫学的関連が把握できなかった結核菌が，分子疫学的解析により関連性を推測できるようになった．No.372および374の株は流行株のひとつと考えられ，多発性大規模感染[4]の可能性も視野に入れて結核対策を実施する必要があると思われる．

一方，疫学的に関連が濃厚であった院内感染事例の分離菌株（No.367，368，369）および老人ホーム感染事例の分離株（No.383，384，391，399）は，いずれも集団感染疑い例で，各事例で分離された結核菌の遺伝子型がそれぞれにおいて同一型を示したことより，集団感染として厚生労働省に報告された．MSTにおいてM株を含む近年の流行株と考えられる株らからはやや距離をおいてクラスターを形成した．老人ホーム事例の初発患者は88歳と高齢であることから，若い頃に感染を受け，最近になって発症した再燃例と推察された．その初発患者から排出された菌の感染力が強く，施設内に感染を伝播させた可能性があり，老人ホームのような施設においては，過去の病歴の把握も必要と考える．この事例における接触者健診として，当所で57名についてQFT検査を実施した結果，陽性が16名，判定保留が10名であった．その後も，陽性者の中から発症者が3名も出現していることから，今後も継続的な経過観察が必要であると考えられた．

No.365および385は，外国籍（中国・フィリピン）の患者由来で，これら2株は38株のMSTの末端に位置したことより，患者が母国で感染した後，日本で発症した可能性も考えられる．今後は，中国，フィリピンの流行株を加えて解析していきたい．

当所において，VNTR法を導入し始めた当時は，結核菌DNA上の解析部位をMIRUの12か所とETRの4か所とし，必要に応じて解析部位を追加（7か所）して合計23か所で実施してきた[5,6]が，今回はそれらと6か所の共通解析部位をもつJATA12を使用した．JATA12は，国内分離株を広く集めて検討され，特に集団感染事例における菌株の遺伝学的異同を判定する際に高い信頼性が報告されている[3]．Supplyら[7]のVNTR法（15か所）は国際標準法として認識されつつあるが，国内株の解析についてはクラスター率が高く出るため，日本ではJATA12の方が有用である．しかしながら，JATA12のみで解析すると，地域によってはクラスター率が高くなることが示唆されており[8]，解析部位を追加することにより広域的な結核の伝播や監視の調査に用いることが提案されている．

今後，県内の自治体が連携をして広域的な分子疫学調査への取り組みを進めるためには，これらの問題を認識した上で，解析部位の統一を含めたVNTR法の標準化が必要であり，それに向けた今後の検討が必要である．

結核におけるVNTR法などの分子疫学は，実地疫学により感染拡大を防いできた時代から科学的・実証的な分析を進めることを可能にした．さらに，VNTR法は迅速かつ簡便で，結果を数値化できることから，現在，国内各自治体の保健所等においても，結核対策に利用されつつある．迅速な結果は，接触者健診などを効率化することが可能となるとともに，自治体間が連携して取り組むことで，結核の広域的な疫学的解明をも可能にすることが期待できる．

今回，VNTR解析結果を保健福祉事務所および健康危機管理課等へフィードバックし，保健福祉事務所で保有する患者情報と当所の遺伝子型別解析結果を共有するために報告会を開催した．このことにより，現在の流行株の把握，感染経路・感染源の解明および患者管理に役立つと考えられた．今後も，速やかに結果を保健福祉事務所等へ戻すとともに，継続して菌株の収集・解析を進めていくことが重要と思われた．

今後の取り組みとして，集積した結核菌株の遺伝子型別データで，県域のデータベース化を図る必要があり，データベースは県庁LANを使用し，保健福祉事務所お

よび健康危機管理課においても活用できるように今後検討を進める予定である．さらに，県域に止まらず生活圏を共用している周辺地域（横浜市，川崎市，横須賀市，相模原市，藤沢市）との情報交換を可能にすることにより，県全体の結核対策につなげていきたい．

謝　辞

最後になりましたが，本研究を進めるに当たり，結核菌株収集にご協力いただきました各保健福祉事務所保健予防課，関係医療機関および県健康危機管理課の皆様に深謝します．

本研究は，地域保健推進特別事業および財団法人公衆衛生振興会特別研究助成により実施されたものである．

（平成23年8月5日受理）

参考文献

1）結核予防会結核研究所疫学情報センター：結核の統計，〈http://www.jata.or.jp/rit/ekigaku/toukei/adddata/〉

2）Ohkado, A., Y. Murase, M. Mori, N. Hasegawa, G. Otsuka and M. Nagamine：Transmission of specific genotype streptomycin resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* in the Tokyo metropolitan area in Japan, BMC Infect. Dis., **138**, 1-9 (2009)

3）前田伸司，村瀬良朗，御手洗　聡，菅原　勇，加藤誠也：国内結核菌型別のための迅速，簡便な反復配列多型（VNTR）分析システム，結核，**83**, 673-378 (2008)

4）岩本朋忠，藤山理世，白井千香，前田信司，松本智成，和田崇之，他：分子疫学情報の蓄積から示唆される多発性大規模感染事例の存在とその検証，結核，**85**, 411 (2010)

5）高橋智恵子，富岡敏昭，綿貫祐司，西森　敬，岡﨑則男：VNTR法を利用した結核菌の遺伝子型別，神奈川衛研報告，**36**, 4-7　(2006)

6）高橋智恵子，近内美乃里，大屋日登美，渡辺祐子，岡﨑則男：結核集団感染事例におけるクォンティフェロンTB-2Gと結核分離菌株の遺伝子型別，神奈川衛研報告，**39**, 1-3 (2009)

7）Supply, P., C. Allix, S. Lesjean, M. Cardoso-Oelemann, S. Rüsch-Gerdes, E. Willery *et al.*：Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*, J. Clin. Microbiol., **44**, 4498-4510 (2006)

8）和田崇之，長谷　篤：結核菌の縦列反復配列多型（VNTR）解析に基づく分子疫学とその展望，結核，**85**, 845-852 (2010)

神奈川県衛生研究所研究報告　No. 41（2011）
Bull. Kanagawa Ins. of P.H.

短報

食中毒疑い事例におけるウイルスの検出と解析

－患者，従事者，検食および拭き取り検体での検討－

片山　丘，鈴木理恵子，須永　悟，
齋藤隆行，古屋由美子

Detection and analysis of viruses in suspected food poisoning cases

－Examination of the patients, cooking workers, cooking ingredients and wipe off specimens－

Takashi KATAYAMA, Rieko SUZUKI,
Satoru SUNAGA, Takayuki SAITO
and Yumiko FURUYA

はじめに

近年，検査法の発展により下痢や嘔吐を主症状とする感染症において，ウイルスを原因とする感染性胃腸炎の動向が明らかとなってきた．神奈川県域（川崎市，横浜市，横須賀市，相模原市，藤沢市を除いた地域）ではノロウイルス（NV）やA群ロタウイルス（GARV）を中心として，サポウイルス（SV），アストロウイルス（AstV），C群ロタウイルス（GCRV）およびアデノウイルス（AdV）による胃腸炎が見られている[1-4]．このなかでもNVを原因とした食中毒や感染性胃腸炎が毎年多数発生し，さらにSV，GARVおよびGCRVの集団事例なども発生しており[5, 6]，社会的問題となっている[7-9]．

そこで県域で発生した食中毒を疑われた事例において患者，調理従事者（従事者），検食および拭き取り検体の関連性を調べるために，検出されたウイルスの遺伝子配列を決定し，それぞれの遺伝子について比較検討を行った．

材料および方法

1．検査材料

平成20年度から平成22年度に発生した食中毒を疑われた事例のなかで，同一事例で患者，従事者，検食および拭き取りなどからウイルスが検出された6事例の53検体（患者便29検体，従事者便15検体，検食1検体，拭き取り8検体）および他県からの関連調査1事例の患者5検体の合計58検体を用いた（表1）．

表１　検出ウイルスの塩基配列決定を行った事例

事例	発生場所	検出ウイルス	塩基配列決定	
			検体	数
H20A	居酒屋	NV GⅠ	患者	9
			従事者	4
H20B	旅館	NV GⅡ	患者	3
			従事者	2
			拭き取り	1
			検食	1
H21A	旅館	NV GⅡ	患者	4
			従事者	1
			拭き取り	3
H21B	飲食店	NV GⅡ	患者	3
			従事者	3
			拭き取り	1
H22A	運動施設	NV GⅡ	患者	5
H22B	飲食店	NV GⅡ	患者	6
			従事者	5
			拭き取り	1
H22C	老健施設	GARV	患者	4
			拭き取り	2

2．解析用cDNAの作製

患者および従事者便は滅菌リン酸緩衝液（PBS(-)）で10％乳剤とし，検食および拭き取り検体は40,000rpm，2時間超遠心分離後の沈渣をPBS(-) 140μlで再浮遊したものを用い，既報[10]に従いcDNAを作製した．

3．解析用遺伝子の増幅

NV遺伝子の増幅は，厚生労働省の「ウイルス性下痢症診断マニュアル」（マニュアル）[11]に従ったプライマーを用いて行った．反応容量は25μlを基準とし，反応条件は95℃5分間Taq DNA polymerase活性化後，94℃1分間，50℃1分間，72℃1分間を40サイクル行い，75℃10分間の伸長反応を行った．検食および拭き取り検体などで1st PCRで目的バンドが検出されない場合は，マニュアルに従ったプライマーを用いた反応条件35サイクルの2nd PCRを行った．

GARV遺伝子の増幅は，マニュアル[11]に従ったプライマーを用いて行った．反応容量は25μlを基準とし，反応条件は95℃5分間Taq DNA polymerase活性化後，94℃1分間，42℃1分間，72℃2分間を30サイクル行い，75℃10分間の伸長反応を行った．

4．ウイルス遺伝子の解析

得られたPCR産物から1.5％アガロースゲル電気泳動によりそれぞれNV genogroupⅠ（GⅠ）は381bp，NV genogroupⅡ（GⅡ）は387bpおよびGARVは1062bpの目的バンドを切り出し，BigDye Terminator v1.1

神奈川県衛生研究所　微生物部
〒253-0087　茅ヶ崎市下町屋1-3-1

Cycle Sequencing Kit（ABI）を用いて，キット添付のマニュアルに従って塩基配列の決定を行った．

遺伝子の塩基配列が決定された検体についてはGENETYX-MACプロトコールに従い，ABI PRISM 3100-Avant Genetic Analyzer（ゼネティックス）を用いてそれぞれの事例で得られた他の遺伝子と比較検討すると共に，NVについてはGⅠ/1からGⅠ/15，GⅡ/1からGⅡ/18の塩基配列[12]を基に感染株の解析を行った．GARVについてはG genotype（G）1からG12の塩基配列を基に感染株の解析を行った．

結　果

平成20年度に発生した事例H20Aは原因施設が居酒屋で，NV GIが検出された事例であった．この事例の患者9検体（H20A患者1からH20A患者9）および従事者4検体（H20A従事者1からH0A従事者4）のNV遺伝子の塩基配列を決定し比較したところ，13検体すべての塩基配列は一致した．検出されたNVは，2007年に中国で確認されたGuangxi/NN07230/2007に近縁でGI/8に属するNVであった（図1）．事例H20Bは原因施設が旅館で，NV GⅡが検出された事例であった．この事例の患者3検体（H20B患者1からH20B患者3），従事者2検体（H20B従事者1，H20B従事者2），拭き取り1検体（トイレドアノブ：H20B拭き取り1）および検食（朝食：H20B検食1）1検体のNV遺伝子の塩基配列を決定し比較したところ，7検体すべての塩基配列は一致した．検出されたNVは，2006年に秋田県で確認されたakita4/2006と同一でGⅡ/4に属するNVであった（図2）．

平成21年度に発生した事例H21Aは原因施設が旅館で，NV GⅡが検出された事例であった．この事例の患者4検体（H21A患者1からH21A患者4），従事者1検体（H21A従事者1）および拭き取り3検体（トイレ引き戸取っ手，食堂入口ドアノブ，3F男子トイレドアノブ：H21A拭き取り1からH21A拭き取り3のNV遺伝子の塩基配列を決定したところ，患者4検体の遺伝子はすべて一致した．また従事者1検体および拭き取り3検体の計4検体はすべて一致したが，患者とは325塩基中7塩基異なっていた．患者より検出されたNVは，2007年に舞鶴市で確認されたMaizuru/7764/2007に近縁でGⅡ/4に属するNVであり，従事者および拭き取りより検出されたNVは，2007年中国で確認されたBeijing/362/2007に近縁でGⅡ/4に属するNVであった（図3）．事例H21Bは原因施設が飲食店で，NV GⅡが検出された事例であった．この事例の患者3検体（H21B患者1からH21B患者3），従事者3検体（H21B従事者1からH21B従事者3）および拭き取り1検体（トイレドアノブ：H21B拭き取り）のNV遺伝子の塩基配列を決定し比較したところ，7検体すべての塩基配列は一致した．検出されたNVは，2010年に中国で確認されたCHO-032304/CHN/2010と近縁でGⅡ/4に属するNVであった（図4）．

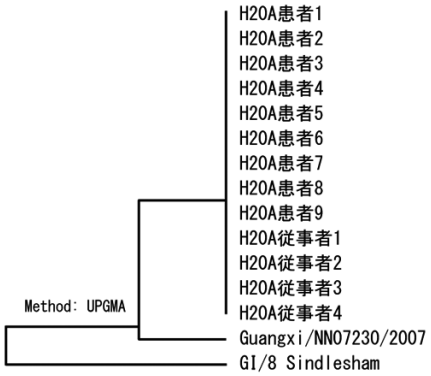

図１　事例H20Aの系統樹

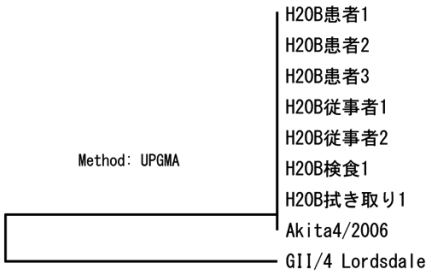

図２　事例H20Bの系統樹

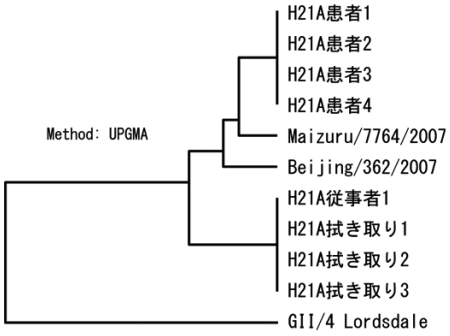

図３　事例H21Aの系統樹

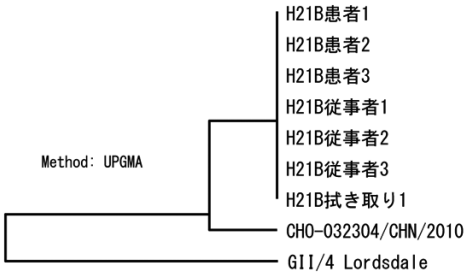

図４　事例H21Bの系統樹

平成22年度に発生した事例H22Aは運動大会で発生した集団胃腸炎で，NV GⅡが検出された事例であった．この事例の患者5検体（H22A患者1からH22A患者5）のNV遺伝子の塩基配列を決定し比較したところ，H22A患者5以外の4検体の塩基配列は一致したが，H22A患者5は339塩基中85塩基異なっていた．患者4検体より検出されたNVは，2010年に中国で確認されたCHO-032304/CHN/2010と近縁でGⅡ/4に属するNVであり，H22A患者5より検出されたNVは，2009年に韓国で確認されたSeoul/0561/2009と近縁でGⅡ/2に属するNVであった（図5）．事例H22Bは原因施設が飲食店で，NV GⅡが検出された事例であった．この事例の患者6検体（H22B患者1からH22B患者6），従事者5検体（H22B従事者1からH22B従事者5）および拭き取り1検体（冷蔵庫取っ手：H22B拭き取り）のNV遺伝子の塩基配列を決定し比較したところ，患者6検体，従事者2検体および拭き取り1検体の塩基配列は一致したが，従事者の3検体（H22B従事者3，H22B従事者4，H22B従事者5）は同一で，患者などの9検体とは339塩基中95塩基異なっていた．患者6検体，従事者2検体および拭き取り1検体より検出されたNVは，2007年に中国で確認されたBeijing/54023/2007と同一でGⅡ/4に属するNVであり，従事者の3検体（H22B従事者3，H22B従事者4，H22B従事者5）より検出されたNVは，2009年に中国で確認されたShanghai/SH312/2009と近縁でGⅡ/3に属するNVであった（図6）．事例H22Cは原因施設が老健施設で，GARVが検出された事例であった．この事例の患者4検体（H22C患者1からH22C患者4）および拭き取り2検体（洗面所蛇口，トイレの手すり：H22C拭き取り1，H22C拭き取り2）のGARV遺伝子の塩基配列を決定し比較したところ，6検体すべての塩基配列は一致した．検出されたGARVは，2006年に米国で確認されたVanderbilt/VU06-07-32/2006と近縁でG1P[8]に属するGARVであった（図7）．

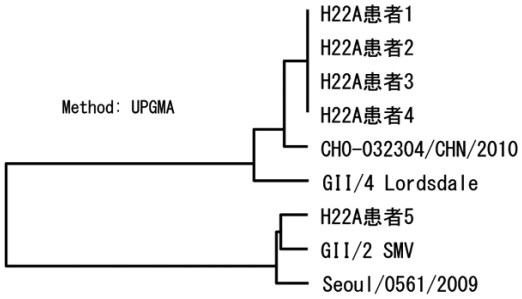

図５　事例H22Aの系統樹

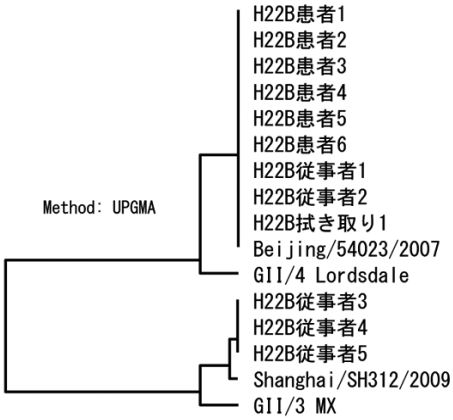

図６　事例H22Bの系統樹

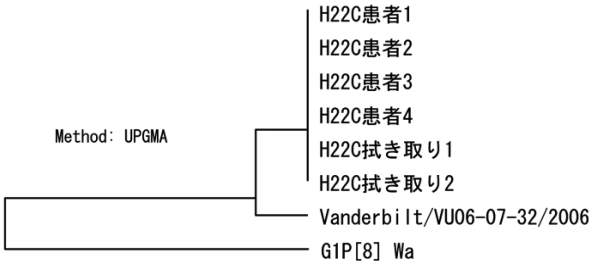

図７　事例H22Cの系統樹

考　察

近年全国的に問題となっているNVやGARVによる食中毒事例や集団感染症事例において，検出された遺伝子の塩基配列を決定し比較検討したところ，それぞれの事例に関して興味深い知見が得られた．

NVが検出された事例H20A，H20BおよびH21Bは患者と従事者あるいは拭き取りの遺伝子が一致し，従事者から患者への感染が示唆された．事例H22CはGARVが原因で，ウイルスの検出は，患者もしくは患者の使用していた洗面所とトイレの拭き取りのみであったため,患者同士で洗面所やトイレなどを介して広まった感染症事例である可能性が考えられた．

事例H21Aは旅館で発生した事例で患者，従事者および拭き取り検体よりNV GⅡが検出された．疫学情報では，患者が1グループに限られていることなどから感染症を疑い，検査は客室付近のトイレなどの拭き取りも行わ

れた．この事例の患者4検体，従事者1検体および拭き取り3検体のNV遺伝子の塩基配列は，患者4検体は一致したが，従事者および拭き取りは患者とは異なった配列で一致した．このことより患者の発症ウイルスと原因施設とされる旅館の従事者や施設との関連性は低い事が示唆され，疫学調査で感染症を疑った事例の裏付けとなった．しかし，従事者検体と同じNV株が旅館内部の数カ所を汚染していることも明らかとなり，患者発生とは別の型のNVによる感染の発生を予防するための注意喚起を行う必要性が明らかとなった．

事例H22Bは飲食店で発生した食中毒疑い事例で患者，従事者および拭き取り検体からNV GⅡが検出され,疫学調査においてこの施設を原因とする食中毒と判断された．この事例の患者6検体，従事者2検体および拭き取り1検体のNV遺伝子の塩基配列は一致しており,このNVが食中毒の原因であることが示唆された．しかし,従事者3検体より異なった遺伝子型が検出されたことから食中毒の原因ウイルスとは異なる型のNVがこの飲食店の従事者間で流行していたと推測された．これは，ウイルス遺伝子の検出のみの検査ではなく，塩基配列の決定や解析の重要性を示す結果であった．また，これらの結果は一つの事例でもそれぞれの患者や従事者によって異なるNVが検出される可能性を示唆するものであった．

今回検討した7事例のうちH22Aは他県からの関連調査事例であり，その他の6事例は県域で発生した食中毒疑い事例であった．関連調査事例H22Aは大規模な運動大会であったため大勢の学生や関係者がいろいろな地域から集まってきた．ここで起こった集団胃腸炎であり，検出されたウイルスはNV GⅡのみであり，NV GⅡの集団感染症事例と考えられた．しかし検出されたNV遺伝子の塩基配列から，患者の中にはGⅡ/4とGⅡ/2と単一の暴露ではない症例があったことが明らかになった．この事例が単一の暴露であるとすれば複数のNVに汚染されていた感染源の存在が考えられる．今回我々が行った検査は患者5検体のみであり，5例中1例のみの塩基配列が異なっていることが全体の状況を表している事なのか，1例の患者がたまたまこの事例とは無関係のNV GⅡに感染していたのかは不明である．このように他地域から多くの人間が集まるスポーツ大会などを行うような集団では，ウイルスを広める原因や機会が多く存在していると考えられた．

食中毒疑い事例は，行政指導などの処分が行われる場合が多く，原因物質の検出速度，検出感度および精度が高いことが要求される．これらを考えながら，クローニング技術の導入など今後もさらなる精度の向上に向けた検討が必要である．また今後も引き続き解析を行う事例数を増やすとともに他の領域の遺伝子の検討も加えることにより，県域における食中毒疑い事例でのウイルスの動向をさらに詳しく探ることが可能であると考えられた．

謝　辞

最後になりましたが，検体および患者情報の収集にご協力いただきました小児科定点医療機関の先生方に深謝いたします．さらに検体搬入や情報提供にご尽力いただきました各保健福祉事務所，県健康危機管理課および食品衛生課の方々に深謝いたします．

（平成23年８月５日受理）

文　献

1）宮原香代子，片山　丘，原田美樹，古屋由美子：感染性胃腸炎患者からの原因ウイルス検出状況（平成19年度），神奈川衛研報告，**38**，69-71（2008）
2）片山　丘，原田美樹，宮原香代子，古屋由美子：感染性胃腸炎患者からの原因ウイルス検出状況（平成20年度），神奈川衛研報告，**39**，30-32（2007）
3）片山　丘，宮原香代子，古屋由美子：感染性胃腸炎患者からの原因ウイルス検出状況（平成21年度），神奈川衛研報告，**40**，43-45（2010）
4）片山　丘，古屋由美子，岡崎則男：研修施設で発生したC群ロタウイルスによる集団胃腸炎事例-神奈川県，病原微生物検出情報，**30**，185-186（2009）
5）宮原香代子，片山　丘，古屋由美子：神奈川県におけるウイルス性集団胃腸炎の発生状況（平成17年度），神奈川衛研報告，**36**，48-50（2006）
6）宮原香代子，片山　丘，古屋由美子：神奈川県におけるウイルス性集団胃腸炎の発生状況（平成18年度），神奈川衛研報告，**37**，72-74（2007）
7）食品衛生専門監視班編：食中毒，かながわの食品衛生，**14**，12（2009）
8）食品衛生専門監視班編：ノロウイルスを知って防ごう食中毒，かながわの食品衛生，**15**，12（2010）
9）ノロウイルスの流行 2006/07シーズン，病原微生物検出情報，**28**，1-2 （2007）
10）片山　丘，宮原香代子，古屋由美子：神奈川県域で検出されたノロウイルスの解析，神奈川県衛研報告，**38**，8-11 （2008）
11）国立感染症研究所ウイルス第二部衛生微生物技術協議会レファレンス委員会：ウイルス性下痢症診断マニュアル，第3版，pp25-66（2004）
12）Okada, K., Ogawa, T., Kaiho, I. and Shinozaki, K.: Genetic analysis of norovirus in Chiba Prefecture, Japan, between 1999 and 2004. J. Clin. Microbiol., **43**, 4391-4401（2005）

神奈川県衛生研究所研究報告　No. 41 (2011)
Bull. Kanagawa Ins. of P.H.

短報

イオンクロマトグラフを用いた食品中の亜硫酸分析

関戸晴子，田中由紀子，酒井康宏
岸　弘子，藤巻照久

Analysis of sulfite in foods using ion chromatography

Haruko SEKIDO, Yukiko TANAKA, Yasuhiro SAKAI, Hiroko KISHI and Teruhisa FUJIMAKI

はじめに

二酸化硫黄および亜硫酸塩類は，漂白や酸化防止の目的で様々な食品に利用されている食品添加物である．食品中の亜硫酸の分析には，通常食品衛生検査指針食品添加物編[1]（以下指針と略す）に示されているアルカリ滴定法や比色法が多くの検査機関で採用されている．指針では，亜硫酸(SO_2)の含有量として約0.1g/kg以上の食品にはアルカリ滴定法を用い，約0.1g/kg以下の食品には比色法を用いることを推奨しているが，酢酸などの揮発性の酸を多く含む食品は，アルカリ滴定法では滴定に影響を及ぼし適用することは困難である．一方，比色法は，前述のアルカリ滴定法では測定できない食品やSO_2含有量が低い食品に限って使用されるが，検量線の範囲が狭く，操作が煩雑であり，また回収率の悪い食品が多い等の問題点を多く含んでいる．

そこで今回，衛生試験法・注解[2]に収載されている高速液体クロマトグラフィー(HPLC)法をもとに測定条件・カラムの選択等の検討を実施し，検出器に紫外部吸収検出器(UV検出器)と電気伝導度検出器(CD検出器)を用いたイオンクロマトグラフィー(IC)について，分析への応用を検討したところ，良好な結果が得られたので報告する．

方　法

1.　試料

神奈川県内で購入した亜硫酸塩類を食品添加物として使用可能である食品11種類22検体を用いた．

2.　試薬および試液

水：超純水を煮沸して脱気し，冷却したものを使用した．

神奈川県衛生研究所　理化学部
〒253-0087　茅ヶ崎市下町屋1-3-1

1％トリエタノールアミン(TEA)溶液：TEA10gを水に溶かして1000mlとした後，窒素ガス(N_2)を5分間通気して脱気した．

亜硫酸水素ナトリウムの標定およびSO_2標準溶液の調製：松本らの方法[3]に従った．即ち，SO_2としての力価を標定した亜硫酸水素ナトリウムを量って1％TEA溶液に溶解し，1ｍｌ中に100μｇのSO_2を含む溶液を調製して標準原液とした．標準溶液は，標準原液を用時1％TEA溶液で適宜希釈して用いた．

IC法用試薬：炭酸ナトリウム(無水)および炭酸水素ナトリウム

アルカリ滴定法および比色法用試薬：指針[1]に従った．

試薬はすべて市販特級品を使用した．

3.　器具および装置

イオンクロマトグラフ：DIONEX社製DX-320，サプレッサー(ASRS-300)付

電気バーナー：HORO Dr Hofmann GmbH社製ELECTRO-BURNER-SYSTEM

通気蒸留装置：指針の二重冷却管付通気蒸留装置を用いた．SO_2の捕集には，25ml共栓試験管(内径20mm)，加熱は松本らの方法[3]に従い電気バーナーを用いて蒸留フラスコとの距離は6cmとした．

0.45μｍフィルター：アドバンテック東洋㈱製DISMIC-13HP045AN

4.　測定条件

分析カラム：DIONEX社製IonPac　AS9-SC(4mmi.d.×250mm)およびIonPac　AS12A(4mmi.d.×250mm)

ガードカラム：DIONEX社製IonPac　AG9-SC(4mmi.d.×50mm)およびIonPac　AG12A(4mmi.d.×50mm)

溶離液：炭酸ナトリウムおよび炭酸水素ナトリウムの混液

カラム温度：40℃，注入量：50μl，流速：0.7～1.5ml/min

検出器：UV検出器およびCD検出器

5.　試験溶液の調製

(1) IC法

衛生試験法・注解の通気蒸留-液体クロマトグラフィーによる定量の項に準じた．通気蒸留装置を用いて亜硫酸を二酸化硫黄として留出させ，25ml共栓試験管に入れた約9mlの1％TEA溶液に捕集し，捕集した液量を10mlとした後0.45μｍのフィルターでろ過したものを試験溶液とした．

(2) アルカリ滴定法および比色法

指針に準じた．通気蒸留装置を用いて亜硫酸を二酸化硫黄として留出させ，アルカリ滴定法は過酸化水素に捕集，比色法は0.1mol/l水酸化ナトリウム溶液に捕集した

ものをそれぞれ試験溶液とした.

6. 定量

(1) IC法

SO_2標準原液を1%TEA溶液で希釈し，調製した0.1～100μg/mlの標準溶液各々50μlをICに注入し，得られたピーク面積より検量線(UV検出器およびCD検出器)を作成した.

試験溶液50μlをICに注入し，得られたピーク面積よりあらかじめ作成した検量線よりSO_2含有量を求めた.

(2) アルカリ滴定法および比色法

アルカリ滴定法は，試験溶液を0.01mol/l水酸化ナトリウム溶液で滴定し計算によりSO_2含有量を求めた．比色法は，試験溶液をパラロザニリンおよびホルムアルデヒドと反応させ生じた赤紫色色素を吸光度測定し，試験溶液と同様に操作したSO_2標準溶液により作成した検量線からSO_2含有量を求めた.

結果および考察

1. IC法による測定

(1) UV検出器による定量

SO_2は水溶液中では亜硫酸イオンとして存在する．亜硫酸イオンは紫外部領域(UV)に吸収をもつことから，陰イオン交換カラムとUV検出器を用いたHPLC測定法が衛生試験法・注解に記載されている．しかし，記載に従って，分析カラムにIonPac AS9-SCを用いて1.8mmol/l炭酸ナトリウム／1.7mmol/l炭酸水素ナトリウム溶液を溶離液に使用し240nmで測定を実施したところ，SO_2濃度100μg/mlの標準溶液を測定しても十分な感度が得られなかった．そこで波長を210nmに変更したところ，ピーク面積値が10倍以上大きくなり，十分な感度と良好なピーク形状が得られた(図1)．しかし，波長210nm付近は，食品中に含まれる多くの有機酸の妨害を受けることが知られている[3]．食品中に含まれる可能性が高い有機酸8種(酢酸，クエン酸，乳酸，リンゴ酸，酒石酸，シュウ酸，コハク酸，マロン酸)およびUV吸収を持つ陰イオン3種(硝酸イオン，亜硝酸イオン,臭素イオン)を分析したところ，前述の条件では亜硫酸イオンの付近にリンゴ酸および酒石酸の妨害を受けた．移動相の割合や流速を変更し検討したが，リンゴ酸および酒石酸は亜硫酸イオンとほぼ同じ挙動を示し，特にリンゴ酸とは完全に分離することができなかった．そこでカラムをIonPac AS12Aに変更し，溶離液の条件を検討した(表1)．その結果AS12Aを使用することにより，亜硫酸イオンのピークはどの条件でもリンゴ酸および酒石酸と完全に分離することができた．また，他の有機酸の妨害も認められなかった．亜硫酸イオンおよび有機酸8種の中で最後に出てくるシュウ酸の保持時間を鑑み，1検体の測定に要する分析時間を考えると，流速を1.5ml/minとした場合の条件A，Bが有用であると考えられた(図2)．

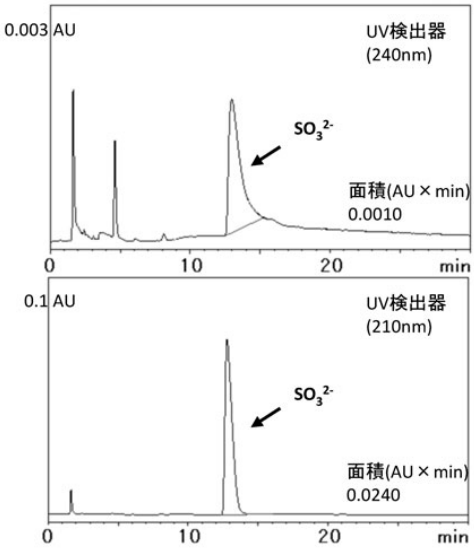

図1 亜硫酸(SO_2)標準溶液100μg/mlのクロマトグラム

表1 ＩＣ法測定条件

	条件A	条件B	条件C
カラム	IonPac AS12A(4mmi.d.×250mm)		
ガードカラム	IonPac AG12A(4mmi.d.×50mm)		
溶離液	2.7mmol/lNa_2CO_3／0.3mmol/l$NaHCO_3$	1.8mmol/lNa_2CO_3／1.2mmol/l$NaHCO_3$	0.9mmol/lNa_2CO_3／2.1mmol/l$NaHCO_3$
流速	0.7～1.5ml/min		
カラム温度	40℃		
注入量	50μl		

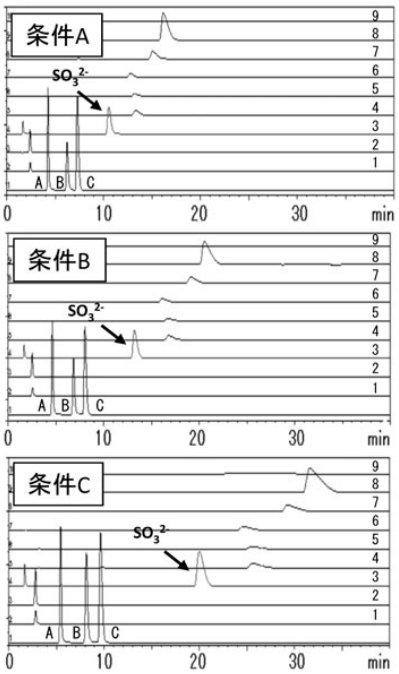

図2 亜硫酸, UV吸収を持つ陰イオン3種および有機酸8種のクロマトグラム(UV検出器測定, 流速1.5ml/min)
A:NO_2^-, B:Br^-, C:NO_3^-, 1:酢酸, 2:乳酸, 3:亜硫酸, 4:リンゴ酸, 5:コハク酸, 6:マロン酸, 7:酒石酸, 8:シュウ酸, 9:クエン酸

試料中の不揮発性の有機酸は前処理の蒸留操作で捕集液である1％TEA溶液に移行する可能性は低いと考えられているが，これらの影響を完全に除去し十分な検出感度を得るために，カラムはIonPac　AS12Aを使用し，波長210nmで測定するのがよいと思われた．作成した条件における検量線は，0.5～100μg/mlで相関係数0.999以上の良好な直線性を示した．

(2) CD検出器による定量

亜硫酸イオンは無機の陰イオンであるため，CD検出器を用いたICにより測定が可能である．CD検出器でSO_2標準溶液を定量したところ，前述のUV検出器(波長210nm)よりも感度がよく，SO_2濃度0.1μg/mlの標準溶液でも十分な感度と良好なピーク形状が得られた(図3)．

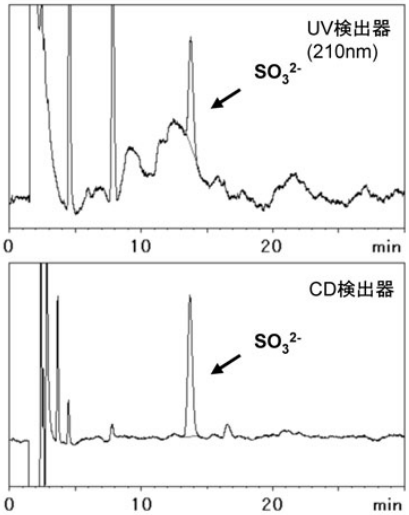

図3　亜硫酸(SO_2)標準溶液0.5μg/mlのクロマトグラム

しかしCD検出器では，食品中の様々な陰イオンがピークとして検出されることが懸念されたため，陰イオン7種(フッ素イオン，塩素イオン，臭素イオン，硝酸イオン，亜硝酸イオン、リン酸イオン、硫酸イオン)との分離を確認した．その結果，条件Aでは亜硫酸イオンのピークはリン酸イオンと近接していて，リン酸イオンが多量に含まれていた場合分離しなくなる可能性が考えられた．条件B，Cはリン酸イオンや硫酸イオン，また前述の8種の有機酸ともよく分離し，測定に問題は認められなかった(図4)．検量線は0.1～100μg/mlで相関係数0.999以上の良好な直線性を示し，UV検出器測定よりも広い範囲で直線性が得られた．

以上のことからIC法による測定は，カラムにIonPac AS12A，溶離液に1.8mmol/l炭酸ナトリウム／1.2mmol/l炭酸水素ナトリウム溶液を用いることにより，UV検出器またはCD検出器のどちらを使用しても，食品中に含まれる可能性の高い有機酸や陰イオンの妨害を受けることなく測定することが可能であった．

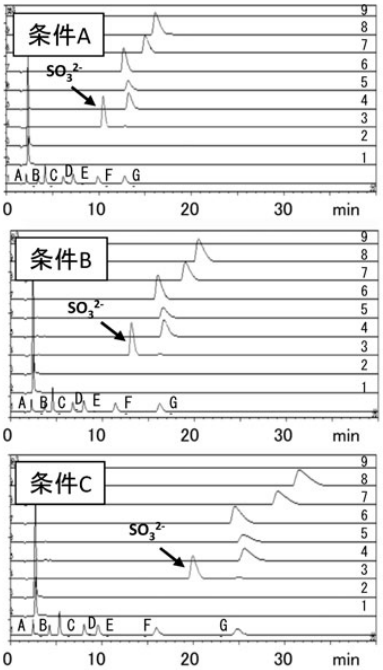

図4　亜硫酸，陰イオン7種および有機酸8種のクロマトグラム
(CD検出器測定，流速1.5ml/min)
A:F^-, B:Cl^-, C:NO_2^-, D:Br^-, E:NO_3^-, F:PO_4^{3-}, G:SO_4^{2-} 1:酢酸，2:乳酸，3:亜硫酸，4:リンゴ酸，5:コハク酸，6:マロン酸，7:酒石酸，8:シュウ酸，9:クエン酸

2.　添加回収

砂糖を試料として2.0gに$SO_2$10μgを添加して添加回収試験(n=5)を実施した．回収率はUV検出器測定において71～79％，変動係数(CV)4.7％，CD検出器測定において73～76％，CV2.6％であった．本法における定量限界はSO_2としてUV検出器使用の場合は0.0025g/kg(2g採取)，CD検出器使用の場合は0.0005g/kg(2g採取)であった．

3.　アルカリ滴定法および比色法との比較

神奈川県内で購入した食品11種類22検体を用いて，検討したIC法とアルカリ滴定法，比色法における測定値の結果を表2に示した．

バルサミコ酢やワインビネガーを除いて，測定値は3法ともほぼ類似した結果が得られた．バルサミコ酢，ワインビネガーでは，IC法や比色法では1検体を除いて不検出であったがアルカリ滴定法では3検体とも数値が得られた．従来から知られているように，これらの食品は酢酸を多く含んでいることがアルカリ滴定法の結果に影響を及ぼしたものと考えられた．また比色法は，検量線の範囲が0～2μg/mlと狭いために，SO_2含有量が0.02g/kg(2g採取)を超えた検体については試料液を2倍～100倍希釈しなければならなかったためか，若干の差がみら

表２　試験法による各種食品中の亜硫酸（SO_2）測定値の比較

食品	亜硫酸塩類使用の表示	SO_2測定値(g/kg)			
		アルカリ滴定法	比色法	IC法	
				UV検出器(210nm)	CD検出器
赤ワイン1	有	0.044	0.034	0.034	0.039
赤ワイン2	有	0.062	0.056	0.058	0.063
白ワイン1	有	0.096	0.084	0.077	0.073
白ワイン2	有	0.12	0.10	0.12	0.11
バルサミコ酢	有	0.0082	0.0012	不検出	0.0011
赤ワインビネガー	有	0.012	不検出	不検出	不検出
白ワインビネガー	有	0.0080	不検出	不検出	不検出
タピオカ	有	不検出	不検出	不検出	不検出
かんぴょう1	有	1.5	1.4	1.3	1.3
かんぴょう2	無	不検出	不検出	不検出	不検出
乾燥果実マンゴー	有	0.31	0.28	0.38	0.39
乾燥果実あんず	有	0.83	0.84	0.88	0.89
真だこ	有	不検出	0.0039	0.0040	0.0038
冷凍エビ	有	不検出	不検出	不検出	不検出
山菜水煮1	有	不検出	不検出	不検出	不検出
山菜水煮2	有	不検出	不検出	不検出	不検出
たけのこ水煮	無	不検出	不検出	不検出	不検出
白きくらげ1	無	不検出	不検出	不検出	不検出
白きくらげ2	無	不検出	不検出	不検出	不検出
塩漬くらげ	無	不検出	不検出	不検出	不検出
煮豆1	有	不検出	不検出	不検出	不検出
煮豆2	無	不検出	不検出	不検出	不検出

亜硫酸塩類使用の表示(有)の食品は3試行の平均、(無)の食品は1試行

＜定量下限値＞
アルカリ滴定法：0.0008g/kg(試料20ｇ採取、滴定量1滴(0.05ml)としたものを定量下限値とした)
比色法：0.0005g/kg(食品衛生検査指針食品添加物編2003の解説に記載されているものを使用した)
ＩＣ法(ＵＶ検出器)：0.0025g/kg(試料2ｇ採取、捕集液量10ml、検量線の最小濃度0.5μg/ml検出としたものを定量下限値とした)
ＩＣ法(ＣＤ検出器)：0.0005g/kg(試料2ｇ採取、捕集液量10ml、検量線の最小濃度0.1μg/ml検出としたものを定量下限値とした)
定量下限値未満を不検出とした

れた．かんぴょうや乾燥果実のような固体試料は，検体そのもののSO₂含有量のばらつきが大きい可能性も考えられた．

ICによる測定は，アルカリ滴定法のように酢酸などの有機酸の影響を受けることは少なく，また，比色法と違って検量線の範囲が広いため，多大な希釈をせずに測定することが可能であった．

まとめ

食品中の亜硫酸分析について，通気蒸留装置を用いたICによる定量試験を検討した．カラムにIonPacAS12A，移動相に1.8mmol/l炭酸ナトリウム／1.２mmol/l炭酸水素ナトリウム溶液を使用することにより，UV検出器，CD検出器のどちらでも酢酸などの揮発性有機酸や夾雑イオンの影響をほとんど受けずに，従来法よりも広い検量線範囲で測定することが可能であった．また，CD検出器測定による検量線はUV検出器よりも広い範囲で直線性が得られた．以上のことから本分析法は，ほぼすべての食品で適用可能であると思われた．

本分析法はIC法のみならず，前述のカラムおよび移動相を用いることにより，UV検出器もしくはフォトダイオードアレイ検出器付の高速液体クロマトグラフ(HPLC)においても適用可能である．

（平成23年８月５日受理）

文　献

１）厚生労働省監修：食品衛生検査指針 食品添加物編，pp. 100-109，社団法人日本食品衛生協会，東京(2003)
２）日本薬学会編：衛生試験法・注解2010，pp. 340-347，金原出版(株)，東京(2010)
３）松本ひろ子，小川仁志，鈴木敬子，鈴木　仁，斎藤和夫：通気蒸留装置及びHPLCを用いた食品中の残留亜硫酸の分析，食品衛生学雑誌，42，329-334(2001)

神奈川県衛生研究所研究報告　No. 41 (2011)
Bull. Kanagawa Ins. of P.H.

短報

飲料水中のNa測定における ガラス器具からの汚染

佐藤　学，長谷川一夫，桑原千雅子，上村　仁

Pollution in Na measurement in drinking water from glassware tool

Manabu SATO, Kazuo HASEGAWA,
Chikako KUWAHARA and Hitoshi UEMURA

はじめに

飲料水中のナトリウム及びその化合物（以下Na）の測定は，告示[1]によりフレームレス－原子吸光光度計，フレーム－原子吸光光度計，誘導結合プラズマ発光分光分析装置，誘導結合プラズマ－質量分析装置，陽イオンクロマトグラフによる分析法が示されている．当所では分析方法の効率化，迅速化のため陽イオンクロマトグラフによる一斉分析法でNa，Mg，Caの同時測定を行っている．

陽イオンクロマトグラフ法では市販のNa，Mg，Caの混合標準原液を希釈して標準試料を作成している．この標準試料を用いて検量線を作成したところ，図1，表1のように低濃度においてNaが希釈操作によって期待される濃度よりも高い濃度となり，検量線が原点を通らなくなる現象が認められた．Mg，Caではこのような現象は認められず，適正な検量線が得られた．

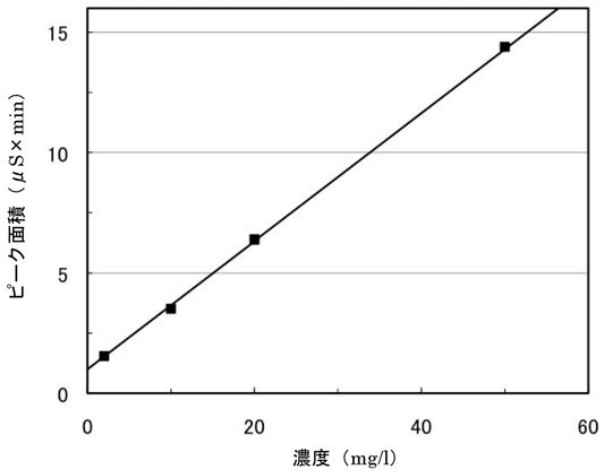

図１　ガラス器具を用いたNa検量線

神奈川県衛生研究所　理化学部
〒253-0087　茅ヶ崎市下町屋1-3-1
satou.fpg@pref.kanagawa.jp

表１　ガラス器具を用いたNa検量線

標準液の濃度 (mg/l)	検量線上の値* (mg/l)
2	5.53
10	12.6
20	22.8
50	51.4
100	98.4

*) 原点を通る検量線として計算した値

一方，ガラス器具を使用しない誘導結合プラズマ－質量分析法（以下ICP-MS法）ではNaの検量線は適正となったため，陽イオンクロマトグラフ法に用いた標準試料に汚染が起きていると考えられた．そこで，汚染の原因について検討を行ったところ，測定に用いられるガラス器具からのNa汚染について若干の知見を得たので報告する．

方　法

１．試薬・標準液

超純水は超純水製造装置で作成したものを用いた．ICP-MS測定のNa，Mg及びCa標準液には関東化学社製の原子吸光分析用1000mg/l溶液を混合し，1%v/v硝酸で希釈したものを用いた．硝酸は関東化学製の超高純度試薬（Ultrapur）を用いた．内部標準液は，関東化学製の原子吸光分析用又は化学分析用Be，Co，Y，I及びTl各1000mg/l溶液を5%v/v硝酸で希釈し，各濃度を0.1 mg/lに調製したものを用いた．

使用した内部標準物質と対象とする元素の関係を表2に示した．

表２　ICP-MSの測定元素

測定元素（質量数）	内部標準物質（質量数）
Na(23)	Be(9)
Mg(24)	Be(9)
Ca(44)	Co(59)

陽イオンクロマトグラフの標準液には関東化学社製の陽イオン混合標準液iv（Na，Mg，Ca：各100mg/l）を超純水で希釈したものを用いた．標準溶液の調製にはガラス器具を使用せず，5%v/v硝酸及び超純水で洗浄したテフロン製ビーカー，ポリメチルペンテン製メスフラスコ，マイクロピペットチップ等を用いた．

２．装置及び分析条件

測定に用いた陽イオンクロマトグラフとICP-MSの測定条件を表3，表4に示した．ICP-MS測定の測定質量数は表2に示した．

表３　陽イオンクロマトグラフの測定条件

イオンクロマトグラフ	:	Dionex ICS-1000
分離カラム	:	IonPac®CS12-A
ガードカラム	:	IonPac®CG12-A
溶離液	:	20 mmol/l メタンスルホン酸水溶液
再生液	:	20 mmol/l 水酸化テトラメチルアンモニウム水溶液
サプレッサー	:	カチオンマイクロメンブランサプレッサー CMMS-300
検出器	:	電気伝導度検出器
流量	:	1.0 ml/min
試料導入量	:	25 μl
バックグラウンド	:	3 μS以下

表４　ICP-MSの測定条件

ICP-MS	:	Agilent 7500cx
RFパワー	:	1550 W
プラズマガス(Ar)	:	15 l/min
キャリアガス(Ar)	:	0.90 l/min
メイクアップガス(Ar)	:	0.22 l/min
ネブライザー	:	マイクロミスト
測定	:	内部標準法

３．試料溶液の調製

(1) ICP-MS測定

陽イオンクロマトグラフ法の標準試料汚染の原因を検討するため，以下の試料を作成した．また，測定ブランクには1%v/v硝酸を用いた．

・超純水をホウケイ酸ガラス製100mlメスフラスコに採取して1時間静置した後ポリプロピレンバイアルに直接移し，硝酸濃度が1%となるように硝酸を添加したもの
・超純水をパスツールピペットでポリプロピレンバイアルに移し，硝酸濃度が1%となるように硝酸を添加したもの

(2) 陽イオンクロマトグラフ測定

種々のガラス器具からの汚染の影響を検討するため，以下の試料を作成した．

・超純水をホウケイ酸ガラス製100mlメスフラスコに採取して1時間静置した後，ポリプロピレンバイアルに直接移したもの
・パスツールピペットを用いて超純水をポリプロピレンバイアルに移したもの
・超純水をガラス製アンプルに採取して1時間静置した後，マイクロピペットを用いてポリプロピレンバイアルに移したもの
・超純水をガラス製のオートサンプラー用スクリューバイアルに直接採取して1時間静置したもの

同じ材質の器具でも製品によって汚染の影響が異なるかを検討するため，メスフラスコについては２種類，パスツールピペット，ガラス製のオートサンプラー用スクリューバイアルについては３種類の製品について比較を行った．

また，ガラス器具からのNa汚染に対する超純水によるとも洗い洗浄の効果を検討するため，以下の試料を作成した．

・パスツールピペットを用いて，とも洗いをせずに超純水をポリプロピレンバイアルに採取したもの
・パスツールピペットを用いて，5回，20回とも洗いをした後，超純水をポリプロピレンバイアルに採取したもの

結果及び考察

１．標準試料汚染の原因の検討

Naの適正な検量線が得られるICP-MSを用いて，陽イオンクロマトグラフ法で使用するガラス器具からの汚染を検討した結果を表5に示す．

表５　各種ガラス器具によるナトリウムの溶出

サンプル	容器の材質	Na	Mg (mg/l)	Ca
ブランク	―	<0.01	<0.01	<0.01
100ml メスフラスコ	ホウケイ酸ガラス	0.03	<0.01	0.02
パスツールピペットA	ソーダ石灰ガラス	2.08	<0.01	0.04
パスツールピペットB	ホウケイ酸ガラス	2.44	<0.01	<0.01

(ICP-MSによる測定)

表６　各種ガラス器具によるナトリウムの溶出

サンプル	容器の材質	Na	Mg (mg/l)	Ca
100ml メスフラスコA（未洗浄）*	ホウケイ酸ガラス	0.26	<0.05	0.32
100ml メスフラスコA（洗浄済）**	ホウケイ酸ガラス	<0.05	<0.05	<0.05
10ml メスフラスコA（未洗浄）*	ホウケイ酸ガラス	0.06	<0.05	0.16
10ml メスフラスコB（未洗浄）*	ホウケイ酸ガラス	0.34	<0.05	0.25
パスツールピペットA	ソーダ石灰ガラス	2.64	<0.05	<0.05
パスツールピペットB	ホウケイ酸ガラス	2.54	<0.05	<0.05
パスツールピペットC	ホウケイ酸ガラス	0.22	<0.05	<0.05
2ml アンプル	ホウケイ酸ガラス	0.20	<0.05	<0.05
1.5ml スクリューバイアルA	ホウケイ酸ガラス	0.71	<0.05	<0.05
1.5ml スクリューバイアルB	ホウケイ酸ガラス	2.21	<0.05	<0.05
1.5ml スクリューバイアルC	ホウケイ酸ガラス	0.16	<0.05	<0.05

（陽イオンクロマトグラフによる測定）

*）新品で一度も洗浄していないもの

**）水道水、超純水で洗浄後，室温で乾燥したもの

パスツールピペットA，BからNaが2.08，2.44mg/l検出された．メスフラスコからもNaが0.03mg/l検出されたが，パスツールピペットに比べて非常に低い濃度であった．したがって，陽イオンクロマトグラフ測定の標準試料の汚染の主な原因はパスツールピペットによるものであることが考えられる．また，Naの他にもパスツールピペットAからはCaが検出された．

２．ガラス器具からの汚染の検討

ガラス器具を使用しない方法で検量線を作成し，陽イオンクロマトグラフ法によって種々のガラス器具による汚染について検討した結果を表6に示す．

ほとんどの試料溶液からNaが検出され，その濃度はガラス器具の種類等によって差がみられた．Caは3試料から検出されたが，Mgはすべて定量下限値未満であった．洗浄済みの100mlメスフラスコのNaは定量下限値未満であったが，未洗浄のメスフラスコからはすべて検出された．洗浄されずに使用されることが多いパスツールピペットやバイアルについては同じ材質でも製品による違いが見られた．ホウケイ酸ガラス製のパスツールピペットBはNaが2.54mg/lで，ソーダ石灰ガラス製のパスツールピペットAとほぼ同じ濃度となった．化学用の実験器具に用いられるガラスは主にソーダ石灰ガラスとホウケイ酸ガラスで，一般的にホウケイ酸ガラスはソーダ石灰ガラスに比べてNa，Ca，Mg等の成分が少ないと言われている[2]が，Na濃度は同程度のものもあった．

このようにガラス器具の試料溶液でNa，Caの濃度が高くなる原因として，ガラスが空気中の水分とイオン交換を起こし，NaやCaを炭酸塩の形で表出させる[3,4]ガラスの「やけ」と呼ばれる現象が考えられる．使い捨てのパスツールピペットやバイアル等の表面には，「やけ」の進行によりNa，Ca等が表出していると考えられる．

「やけ」の進行状態はガラスの組成や器具の置かれている水分，温度などの雰囲気に依存し，時間とともに進行する[5]．Naが2.54mg/lと高い値のパスツールピペットBはCよりも１年ほど前に購入されたものであった．

３．超純水によるとも洗い洗浄の検討

「やけ」の進行そのものを防ぐことは難しいが，「やけ」によって生じたガラス表面のアルカリ元素は洗浄，光励起による処理やエッチング法等によって除去できることが知られている[6]．そこで陽イオンクロマトグラフ測定の標準試料の汚染の主な原因と考えられたパスツールピペットについて，超純水でのとも洗いによる洗浄と試料溶液のNa濃度の検討を行った結果を表7に示す．

試料を採取する前に，超純水で十分な回数のとも洗いを行うことで，Naの濃度が減少することが認められた．Naの溶出の少ないパスツールピペットCでは5回のとも洗いでNaの濃度は0.05mg/l未満になったが，パスツールピペットAでは20回のとも洗いで0.05mg/l未満のNa濃度になった．このように洗浄によってガラス器具に表出したNa等を除去することはできるが，器具によっては洗浄に手間がかかり実用的ではないと考えられる．したがって，Na分析の際にはガラス器具を使用しないことが望ましいと思われる．

プラスチック製器具だけを用いて作成した陽イオンク

表７　パスツールピペットのとも洗い回数とNa濃度の変化

サンプル	容器の材質	とも洗い回数（回）		
		なし	5	20
パスツールピペットA	ソーダ石灰ガラス	2.43	0.16	<0.05
パスツールピペットB	ホウケイ酸ガラス	2.54	0.06	−
パスツールピペットC	ホウケイ酸ガラス	0.22	<0.05	−

（陽イオンクロマトグラフによる測定）

ロマトグラフ標準試料の検量線を図2に示した.

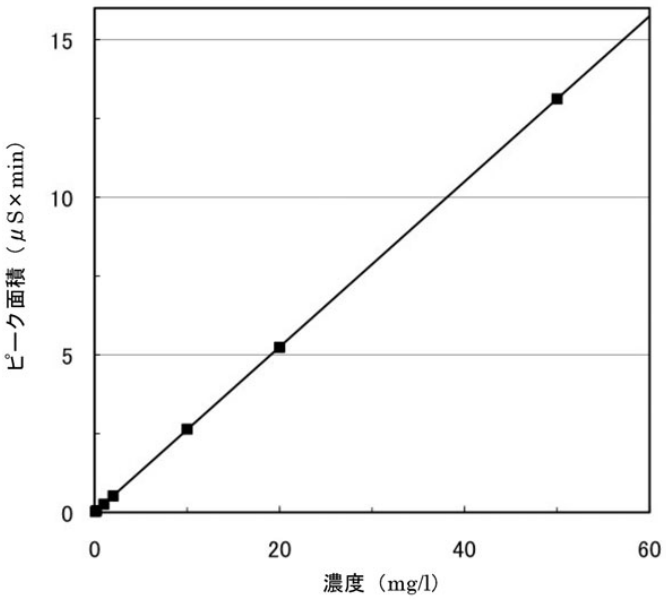

図２　ガラス器具を使用しないNa検量線

50mg/lから0.1mg/lまでの幅広い濃度範囲で，直線性が良好で原点を通過する適正な検量線が得られた．ガラス器具を用いて作成した検量線では適正な値が得られなかった低濃度領域でも改善がみられた.

これにより陽イオンクロマトグラフ法においても，定量下限値に近い低濃度まで精度良く測定ができた.

まとめ

新品の使い捨てパスツールピペットを含むガラス器具からのNaの汚染が確認された.

その原因はガラス器具を長期間，空気中に放置することで空気中の水分と反応してガラス表面にアルカリ元素のイオンや炭酸塩が生じる「やけ」と呼ばれる現象と考えられる.

とも洗い等でガラス器具の表面を洗浄することでNa汚染の影響を少なくすることができるが，陽イオンクロマトグラフ法などNaを含む測定には，ガラス器具の使用を控えるのが望ましい.

（平成23年８月５日受理）

文　献

１）「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」（厚生労働省告示第二百六十一号，平成15年7月22日付）
２）日電理化硝子株式会社：ガラスQ&A 〈http://www.nichiden-rika.com/page016.html〉
３）財団法人ニューガラスフォーラム用語集 〈http://www.newglass.jp/interglad_n/glossary/G01_50on.htm〉
４）日本板硝子テクノリサーチ株式会社：Glass University「ガラスのやけ」 〈http://www.nsg-ntr.com/column/g_univ/univ07.html〉
５）坂井俊彦，但田典子，滝沢一貴：Na_2O・$2SiO_2$ガラスの溶出前期におけるアルカリ溶出速度とクラックの進行　Ceramic Society of Japan, **102**(8), 758-764 (1994)
６）大和田薫，角田光雄：ガラスの洗浄技術　NEW GLASS 89, **23**(2), 7-20 (2008)

神奈川県衛生研究所研究報告　No. 41（2011）
Bull. Kanagawa Ins. of P.H.

資料

神奈川県における腸管出血性大腸菌の検出状況（平成22年度）

古川一郎，石原ともえ，黒木俊郎

Occurrence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in Kanagawa Prefecture (April,2010-March,2011)

Ichiro FURUKAWA, Tomoe ISHIHARA and Toshiro KUROKI

腸管出血性大腸菌（enterohemorrhagic *Escherichia coli*：以下，EHECと略す）感染症は平成11年4月に施行された「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」（平成10年10月2日法律第114号）（以下，感染症法と略す）で三類感染症に分類され，EHEC症の患者と診断した医師は，保健所長を経由して都道府県知事に届け出なければならない．これを受けて，保健所は分離された菌株をそれぞれの地方衛生研究所（以下，地研と略す）に送付している．地研は集められた菌株について生化学的性状，血清型，毒素型等を確認したのち，「病原性大腸菌O-157の検体提供依頼について」（平成8年6月19日付，衛食第160号）および「飲食店における腸管出血性大腸菌食中毒対策について」（平成19年5月14日付，食安監発第0514001）に基づき，国立感染症研究所（以下，感染研と略す）細菌第一部に送付している．全国から送付された菌株について感染研は，分子疫学的調査の手法としてパルスフィールド・ゲル電気泳動（以下，PFGEと略す）解析を実施して，全国レベルの大規模な集団発生や散発的集団発生（diffuse outbreak），すなわち「一見散発事例の多発に見えるが，実は同じ原因で起こっている集団事例」を探知し，感染の拡大と大規模化の抑止に力を注いでいる．また，感染研で得られたPFGEの結果は，それぞれの地研に還元されている．当所においても，地域における感染拡大防止のため，送付されたすべてのEHEC菌株についてPFGE解析を実施した．

平成22年度の菌株受領状況とその内訳は，横浜市，川崎市，横須賀市，相模原市および藤沢市をのぞく神奈川県内（県域）の医療機関や保健福祉事務所から当所に送付されたヒト由来20株，当所地域調査部において家族内等の検便で分離された6株，食肉衛生検査所から送付されたウシ由来7株，藤沢市から送付されたヒト由来9株を含めた計42株であった（表1）．血清型およびVero毒素(VT)の違いによる内訳は，O157(VT1&2）15株，O157(VT2）18株，O26(VT1）5株，O145(VT2）3株，O121(VT2）1株であった．食肉衛生検査所分離株7株を除くヒト由来35株における患者および保菌者の性別および年齢構成を比較した（表2）．年齢の範囲は男性1～84歳，女性2～73歳，平均は男性18.8歳に対し，女性は26.0歳であった．1～10歳では女性4例に対し男性が11例となり，10歳以下の男女構成比に差が認められた．

表１　施設別菌株受領状況（42株）

施　設	O157 VT1&2	O157 VT2	O26 VT1	0145 VT2	O121 VT2	菌株数
厚木保健福祉事務所		2			1	3
茅ヶ崎保健福祉事務所	3	3				6
大和保健福祉事務所	3	1	1			5
小田原保健福祉事務所	5					5
足柄上保健福祉事務所	3					3
鎌倉保健福祉事務所		1				1
平塚保健福祉事務所		3				3
藤沢市保健所	1	1	4	3		9
食肉衛生検査所		7				7
計	15	18	5	3	1	42

神奈川県衛生研究所　微生物部
〒253-0087　茅ヶ崎市下町屋1-3-1

表2　患者・保菌者の年齢構成および性別

年　齢	男性	女性	計
1 - 5	6	3	5
6 - 10	5	1	5
11-20	3	5	4
21-30	2	2	3
31-40		1	4
41-50		1	2
51-60	1	1	5
61-70		1	3
>70	2	1	2
計	19	16	35

PFGEには制限酵素として*Xba* I を使用し，6V/cm，パルスタイム2.2 - 54.2秒，12℃の条件で19時間電気泳動を行った．PFGEパターンの解析にはBioNumerics（Applied Maths社）を用い，Pearsonの相関係数で類似度を算出し，UPGMAによりクラスター解析を行った．

O157(VT1&2) 15菌株についてPFGEパターンを解析した結果（図1），家族内の事例から分離された菌株である菌株No.3および5は，クラスター解析の結果，92%以上の類似度を示し，さらに，異なる施設で分離された菌株No.4についても高い類似度を示したが，この菌株との疫学的関連は不明であった．菌株No.6および7は，菌株の搬入時期は異なるものの家族内関連の菌株であり93%以上の高い類似度を示した．

O157（VT2）18菌株の解析では（図2），菌株No.27，28および29は家族内あるいは関係者間の事例であり，No.27および28は95%以上の高い類似性を示したが，No.29はこれら2菌株との共通バンドをすべて含んでいるもののバンド数が多く，類似度は約90%であった．菌株No.20，21，22，24，25，26および33は，食肉衛生検査所において分離されたウシ由来株であり，このうち菌株No.20は，ヒト由来株であるNo.19と93%以上の高い相同性を示したものの，疫学的関連は不明であった．

O26（VT1）5菌株およびO145（VT2）3菌株のPFGE解析では，O26の事例では家族内および関係者間以外では高い類似度を示す菌株は認められず，すべて散発事例由来であったO145についても類似度の高い菌株は確認されなかった．

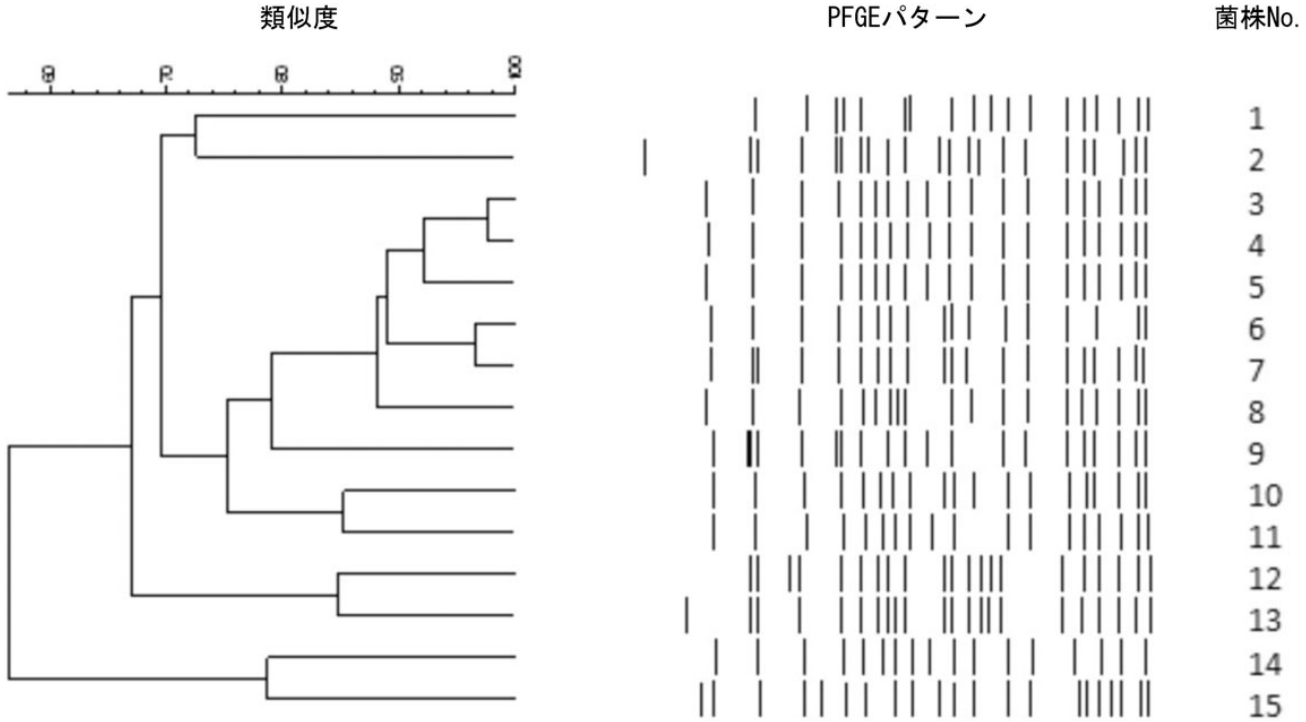

図1　EHEC O157（VT1&2）のデンドログラムおよびPFGEパターン

次に，受領した42菌株について，アミノベンジルペニシリン(ABPC)，セフォタキシム(CTX)，クロラムフェニコール(CP)，ホスホマイシン(FOM)，ゲンタマイシン(GM)，カナマイシン(KM)，ナリジクス酸(NA)，シプロフロキサシン(CPFX)，ストレプトマイシン(SM)，スルファメトキサゾール・トリメトプリム合剤(ST)およびテトラサイクリン(TC)の11薬剤についてCLSI（米国臨床検査標準化協会）法[1)]に準拠して薬剤感受性試験を実施した（表3）．その結果，ABPC，SM，ST，TCの4剤耐性は2菌株，同様にABPC，SM，STあるいはABPC，

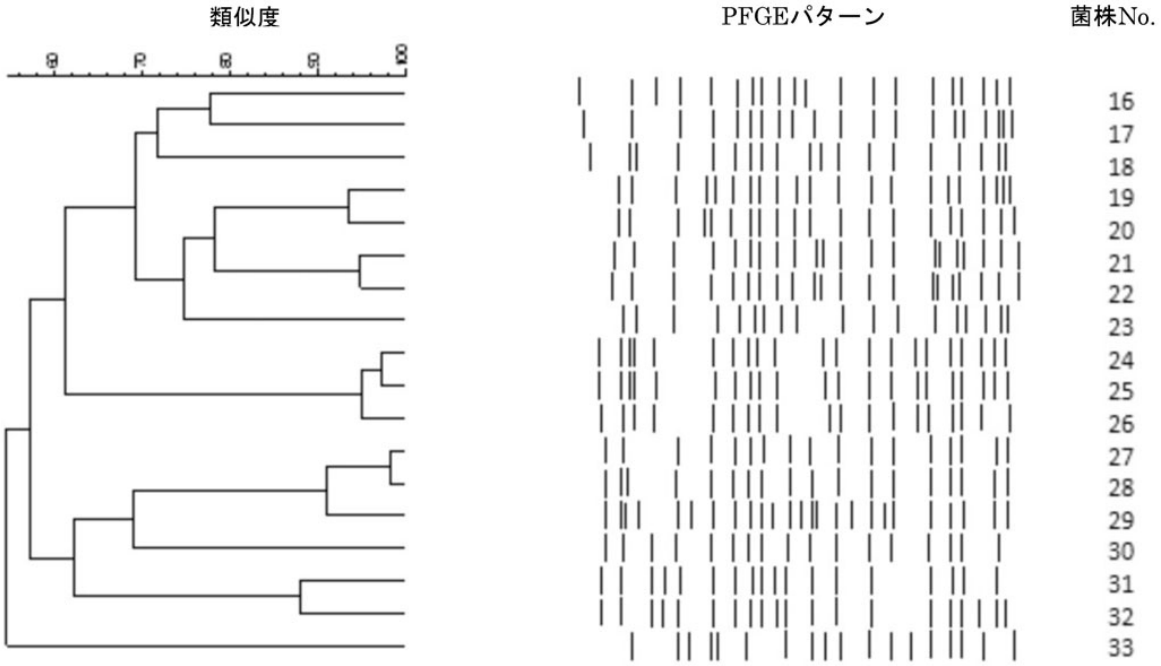

図２　EHEC O157（VT2）のデンドログラムおよびPFGEパターン

SM，TCの3剤耐性がそれぞれ3菌株，ABPC，SMあるいはSM，TCの 2剤耐性がそれぞれ1菌株および2菌株，CPの単剤耐性が3菌株で， 42株中28株が供試した11薬剤に感受性であった．さらに， CP単剤耐性3菌株は，前述のPFGEパターンの解析結果において類似度の高い菌株（菌株No.3，4および5）であった．

表３　薬剤感受性試験結果（42株）

	耐性薬剤					菌株数
４剤	ABPC		SM	ST	TC	2
３剤	ABPC		SM	ST		3
	ABPC		SM		TC	3
２剤	ABPC		SM			1
			SM		TC	2
単剤		CP				3
感受性						28
計	9	3	11	5	7	42

今回，県内保健所設置市を除く県域内において，平成22年度のEHECの集団感染事例は，家族内および関係者間の事例以外は認められなかったが，感染した場合に重症化しやすい小児における事例が多く認められており，EHECの分離状況を今後も注視する必要がある．

EHECの集団感染事例では，広域的な事例も多く，迅速に探知して拡大を防止しなければならない．PFGEによる解析は，菌株を識別し共通の菌株を探知する有効な手段として今後も利用されると考える．

なお，この報告の一部は，厚生労働科学研究費補助金（広域における食品由来感染症を迅速に探知するために必要な情報に関する研究　新興・再興感染症研究事業）において実施した．

最後に，ご協力を頂きました各医療機関，医療検査機関，衛生研究所地域調査部および菌株搬入にご尽力いただきました各保健福祉事務所，食肉衛生検査所，県食品衛生課および健康増進課，藤沢市保健所の方々に深謝いたします．

（平成23年８月５日受理）

文　献

１）Clinical and laboratory standards institute; methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria; approved guideline, CLSI document M45-A1, Wayne, Pa., (2007)

神奈川県衛生研究所研究報告　No. 41（2011）
Bull. Kanagawa Ins. of P.H.

資料

感染性胃腸炎患者からの原因ウイルス検出状況（平成22年度）

鈴木理恵子，片山　丘，齋藤隆行，古屋由美子

Surveillance of viral gastroenteritis in Kanagawa Prefecture (April, 2010－March, 2011)

Rieko SUZUKI, Takashi KATAYAMA, Takayuki SAITO and Yumiko FURUYA

我々は，感染症予測監視事業の一環として，感染性胃腸炎の原因ウイルスを把握する目的で，神奈川県域（川崎市，横浜市，横須賀市，相模原市および藤沢市を除く）の各小児科定点医療機関から得られた感染性胃腸炎患者の検体から原因ウイルスの検索を行っている．ウイルスを原因とする感染性胃腸炎は，例年冬期に多くの流行がみられ，冬期前半には乳幼児から成人に至るまで幅広い年齢層でノロウイルス（図1-1）による胃腸炎，冬期後半を中心に乳幼児にみられるロタウイルス（主にA群：図1-2）による胃腸炎の流行が良く知られている．定点医療機関からの検体では，これらのウイルスの他にアデノウイルス（図1-3），サポウイルス（図1-4），アストロウイルス（図1-5），C群ロタウイルスも検出されている．また，過去には冬期以外の5月，6月，10月に神奈川県域の幼稚園や小学校および老人福祉施設でノロウイルス，A群ロタウイルス，サポウイルスおよびC群ロタウイルスによる感染性胃腸炎の集団発生があったことから，時期・年齢に関わらず原因ウイルスの検索を行った．

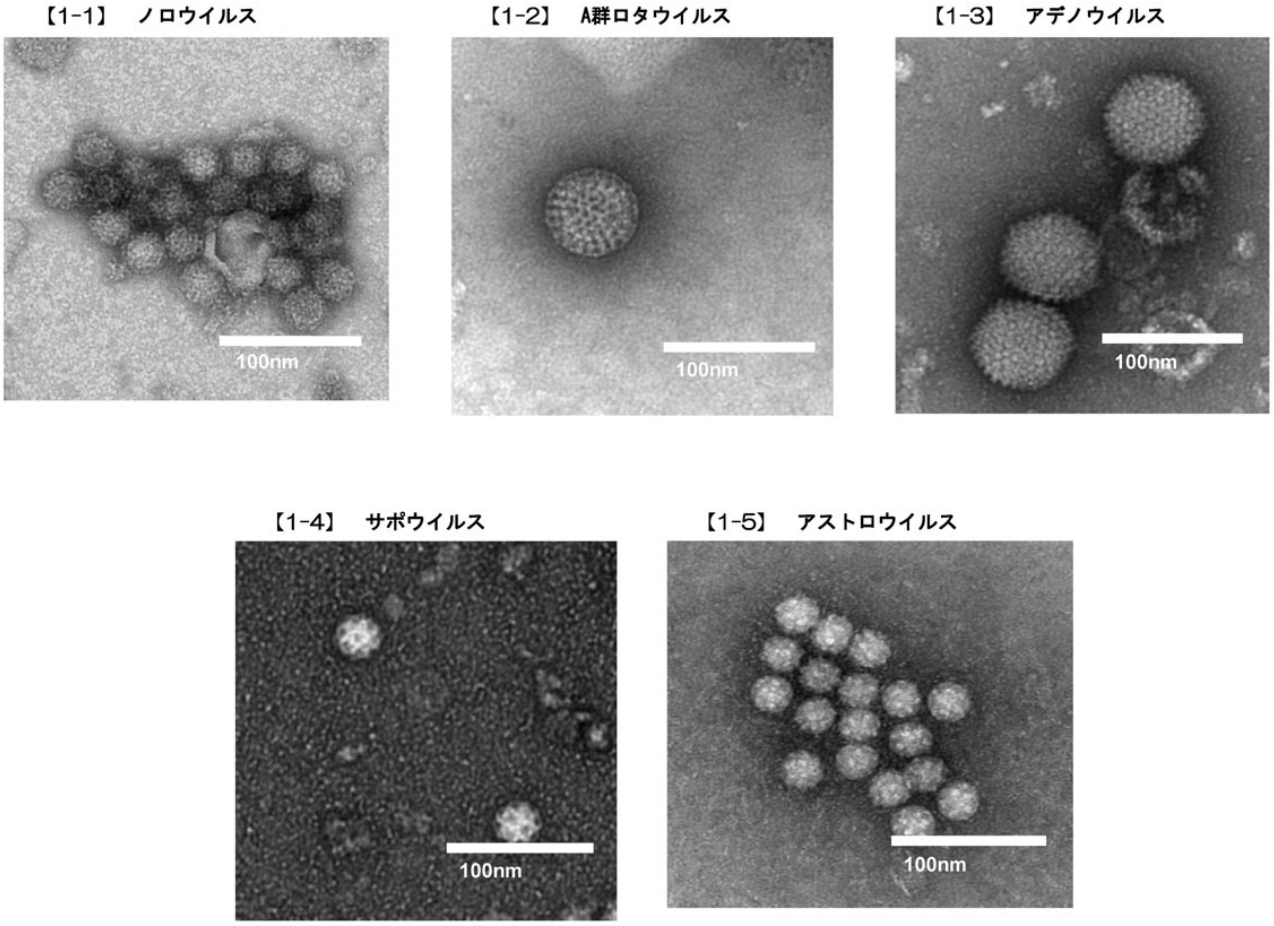

図１　平成22年度に検出されたウイルスの電子顕微鏡像

神奈川県衛生研究所　微生物部
〒253-0087　茅ヶ崎市下町屋1-3-1

平成22年4月から平成23年3月に感染性胃腸炎と診断された患者の便293検体を用いた．ウイルスの検出はノロウイルス，　A群ロタウイルス，アデノウイルス，サポウイルス，アストロウイルスおよびC群ロタウイルスを対象とした．ウイルスの検出は，ノロウイルスには定量PCR，A群ロタウイルスおよびアデノウイルスにはラピッドテスタロターアデノ（積水メディカル），サポウイルスおよびアストロウイルスには PCR，C群ロタウイルスにはC群ロタウイルス検出用試薬（デンカ生研）を用い，併せて電子顕微鏡によるウイルス検索も行った．また，サポウイルスについてはPCRによる型別と併せてダイレクトシークエンスにより塩基配列を決定し型別した．

検査の結果，293検体中136検体から感染性胃腸炎の原因ウイルスが検出された．検出数は，ノロウイルスが78検体，　A群ロタウイルスが13検体，アデノウイルスが6検体，サポウイルスが24検体およびアストロウイルスが15検体で，C群ロタウイルスは検出されなかった．

ウイルスの検出状況を年齢別にみると，6歳以下は214検体，7歳～12歳は25検体，13歳～22歳は10検体，23歳～64歳は37検体および65歳以上は7検体で，検出されたウイルスの大多数が6歳以下の幼児からの検出であった．ノロウイルスは64歳以下の各年齢層で検出された．A群ロタウイルスは6歳以下からの検出数が多く，7歳～12歳からも1例が検出された．アデノウイルスは6歳以下でのみ検出された．サポウイルスは64歳以下の各年齢層で検出された．アストロウイルスは6歳以下および23歳～64歳の年齢層から検出された（表1）．

表１　年齢別ウイルス検出状況（平成22年４月～平成23年３月）

	検体数	陽性数						検出数
		ノロウイルス	A群ロタウイルス	アデノウイルス	サポウイルス	アストロウイルス	C群ロタウイルス	
6歳以下	214	56	12	6	17	14	0	105
7～12歳	25	7	1	0	2	0	0	10
13～22歳	10	4	0	0	1	0	0	5
23～64歳	37	11	0	0	4	1	0	16
65歳以上	7	0	0	0	0	0	0	0
合計	293	78	13	6	24	15	0	136

月別の検出状況をみると，平成22年4月から平成23年3月の全ての月でウイルスの検出が認められた．9月から11月はノロウイルスのみであったが，その他の月では2種類以上のウイルスが検出された．

ウイルスごとの検出状況をみると，ノロウイルスは通常，冬期前半から検出数が増加することが知られているが，平成22年度は春期から夏期には検出数は減少していたものの，　5月および8月を除き年間で検出された．ノロウイルスのgenogroup（以下，G）をみると，78例のうち77例がGⅡ，1例がGⅠで，ノロウイルスに汚染された貝類等を摂食したことに起因する食中毒に多いGⅠとGⅡの同時検出例はなかった．A群ロタウイルスは，平成22年4月から6月および平成23年2月，3月に検出され，例年，冬期後半から春期に流行するA群ロタウイルスの流行傾向と一致していた．検出されたA群ロタウイルス13例についてPCRによる型別を実施したところ，3型が5例，1型が3例，2型および9型が1例ずつ，型別不能が2例であった．3型はいずれの月でも検出されており流行型であったと考えられた．アデノウイルスは4月，5月，8月に検出されたものの大きな流行はみられなかった．サポウイルスは9月から11月を除き，アストロウイルスは8月から12月を除いて検出されており，例年に比べ検出数が多かった．そこで今年度の検出数が多かったサポウイルスについて，PCRとダイレクトシークエンスの2つの方法によるgenogruop（以下、G）型別を実施した．PCRでは，24例のうち12例がGⅠ，11例がGⅡ，1例が型別不能であった．ダイレクトシークエンスでは，PCRで型別不能の1例がGⅠに型別された結果，サポウイルス24例のうち13例がGⅠ，11例がGⅡと型別された．一方，GⅢ，GⅣおよびGⅤは両方法ともに検出されなかった．4月から7月にかけてGⅠ，8月以降はGⅡへ検出型に変化がみられた．再びGⅠが検出された平成23年2月には，神奈川県域内でサポウイルスGⅠによる食中毒が発生し,ダイレクトシークエンスの結果からも近縁なウイルスが検出されており，この時期にGⅠによる地域的な流行があったものと推察された．今回の調査ではPCRで検出不能であった1検体がダイレクトシークエンスで型別されたことから，PCRによる型別はダイレクトシークエンスと比較して短時間で型別成績が得られ有用であると思われるが，詳細な疫学解析を

行う上ではダイレクトシークエンスによる塩基配列を決定する必要があると思われる．（表2）．

今後も引き続き本調査を継続するにあたり，定点医療機関への検査結果の迅速な還元や病原微生物検出情報等により広く情報の提供に努めていきたい．

最後に，検体および患者情報の収集にご協力いただきました各小児科定点医療機関の先生方および本事業にご尽力いただきました県健康危機管理課の方々に深謝いたします．

（平成23年８月５日受理）

表２　発病月別ウイルス検出状況

年　月	陽性数								検出数
	ノロウイルス		A群ロタウイルス	アデノウイルス	サポウイルス		アストロウイルス	C群ロタウイルス	
	ＧⅠ	ＧⅡ			ＧⅠ	ＧⅡ			
平成22年　4月	0	1	4	1	2	0	2	0	10
5月	0	0	2	3	3	0	3	0	11
6月	0	1	2	0	4[1)]	0	1	0	8
7月	1	0	0	0	2	0	1	0	4
8月	0	0	0	2	0	1	0	0	3
9月	0	3	0	0	0	0	0	0	3
10月	0	4	0	0	0	0	0	0	4
11月	0	23	0	0	0	0	0	0	23
12月	0	18	0	0	0	1	0	0	19
平成23年　1月	0	15	0	0	0	4	3	0	22
2月	0	9	3	0	2	2	2	0	18
3月	0	3	2	0	0	3	3	0	11
小計	1	77	13	6	13	11	15	0	136
合計	78				24				

1)：PCRでの型別不能の1例を含む

神奈川県衛生研究所研究報告　No. 41 (2011)
Bull. Kanagawa Ins. of P.H.

資料

発症時間に差が見られた食中毒疑い事例での遺伝子学的アプローチ

平井有紀[1]，片山　丘[2]，鈴木理恵子[2]，
佐藤　健[1]，古屋由美子[2]

Genetic analysis of a food poisoning doubt case with two different onset times

Yuki HIRAI, Takashi KATAYAMA,
Rieko SUZUKI, Ken SATO and Yumiko FURUYA

近年，ノロウイルス（NV）の研究の進歩により遺伝子解析が可能になり，NVを原因とした集団感染性胃腸炎事例の発生において，感染源，感染経路を特定するためなど，関連性を判断する一つの方法として遺伝子解析が行われている．

今回，飲食店が原因施設として疑われた集団感染性胃腸炎が発生し，当該店を利用した2つのグループよりNV genogroup Ⅱ（GⅡ）が検出された．しかし，当該店を原因施設とした場合，2つのグループ間の潜伏時間に1日から2日の差があり，単一の暴露による感染ではない可能性も示唆された．そのため，両グループから検出されたNVについて遺伝子解析を行い遺伝子型の比較を試みた．さらにこの事例の発生する2週間以前に一方のグループの勤務先で集団感染性胃腸炎が発生しており，その際に検出されたNVや近郊地域で発生した集団感染性胃腸炎事例で検出されたNVについても参考に遺伝子解析を行ったので併せて報告する．

事例の概要は，藤沢市内の飲食店で喫食したAグループ5名中5名が2日後から嘔吐，下痢等の急性胃腸炎症状を呈し，その後の調査で，同時刻に同店を利用した別のBグループも9名中4名が下痢などの症状を呈していることが分かった．それぞれの潜伏時間はAグループで29.5～44.5時間で平均36.6時間，Bグループは62.5～95.5時間で平均75.6時間とグループ間で差があった．当該飲食店では生食用のカキを提供しており，Aグループは全員生食用のカキを喫食しているが，Bグループは生食用のカキの喫食はなかった(表1).

表１　患者聞き取り調査結果

Group	No.	生食用カキ喫食	発症	潜伏期間（時間）	平均（時間）	症状（回数等）
A	A-1	○	○	34	36.6	吐き気、嘔吐(5)、下痢(5)等
	A-2	○	○	33.5		吐き気、嘔吐(2)、発熱等
	A-3	○	○	41.5		嘔吐(4)、下痢(1)、腹痛等
	A-4	○	○	44.5		吐き気、下痢(5)、寒気等
	A-5	○	○	29.5		吐き気、嘔吐(6)、下痢(3)等
B	B-1	×	○	74	75.6	下痢(2)、吐き気、腹痛等
	B-2	×	○	62.5		腹痛、発熱(37.4℃)等
	B-3	×	○	95.5		下痢(6)、頭痛
	B-4	×	○	70.5		下痢(5)、吐き気、腹痛等
	B-5	×	×			
	B-6	×	×			
	B-7	×	×			
	B-8	×	×			
	B-9	×	×			

この事例における患者便7検体（Aグループ４名，Bグループ3名），従事者便7検体，施設の拭き取り8検体について食中毒菌の検査を、施設拭き取りを除く検体についてNVの検査を行った．NVはノロウイルスの検出法について（食安監発第0514004号）に準じた．　またAグループの勤務先で2週間以前に発生した食中毒事例の患者2検体（Cグループ）および今回の事例と同時期に近郊地域で発生した集団感染性胃腸炎事例の患者6検体（Dグループ）より検出されたNV遺伝子も用いた．

患者と従事者の糞便はリアルタイムPCRを用いてNVの検出を行い，陽性検体については，PCRダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定した．

検査の結果，全ての検体から食中毒菌は検出されなかったが，Aグループ患者4名中4名，Bグループ3名中2名の糞便からNVGⅡが検出された．従事者7名からはNVは検出されなかった（表2).

表２　病原体検出結果

検体名	検体数	食中毒菌	ノロウイルス 陽性	ノロウイルス 陰性	備考
拭き取り	8	不検出	ND	ND	
従事者	7	不検出	0	7	
患者Aグループ	4	不検出	4	0	GⅡ
患者Bグループ	3	不検出	2	1	GⅡ

ND：検査せず

1. 藤沢市保健所　衛生検査課
〒251-0022　藤沢市鵠沼2131-1
2. 神奈川県衛生研究所　微生物部

```
      1                                                        60
A-1   GTTTTCTGACTTGAGCACGTGGGAGGGCGATCGCAATCTGGCTCCCAATTTTGTGAATGA
A-2   GTTTTCTGACTTGAGCACGTGGGAGGGCGATCGCAATCTGGCTCCCAATTTTGTGAATGA
A-3   GTTTTCTGACTTGAGCACGTGGGAGGGCGATCGCAATCTGGCTCCCAATTTTGTGAATGA
A-4   GTTTTCTGACTTGAGCACGTGGGAGGGCGATCGCAATCTGGCTCCCAATTTTGTGAATGA
B-1   GTTTTCTGACTTGAGCACGTGGGAGGGCGATCGCAATCTGGCTCCCAATTTTGTGAATGA
B-2   GTTTTCTGACTTGAGCACGTGGGAGGGCGATCGCAATCTGGCTCCCAATTTTGTGAATGA
     61                                                       120
A-1   AGATGGCGTCGAATGACGCCGCTCCATCTACTGATGGTGCAGCCGGCCTCGTGCCAGAAA
A-2   AGATGGCGTCGAATGACGCCGCTCCATCTACTGATGGTGCAGCCGGCCTCGTGCCAGAAA
A-3   AGATGGCGTCGAATGACGCCGCTCCATCTACTGATGGTGCAGCCGGCCTCGTGCCAGAAA
A-4   AGATGGCGTCGAATGACGCCGCTCCATCTACTGATGGTGCAGCCGGCCTCGTGCCAGAAA
B-1   AGATGGCGTCGAATGACGCCGCTCCATCTACTGATGGTGCAGCCGGCCTCGTGCCAGAAA
B-2   AGATGGCGTCGAATGACGCCGCTCCATCTACTGATGGTGCAGCCGGCCTCGTGCCAGAAA
    121                                                       180
A-1   GTAACAATGAGGTCATGGCTCTTGAACCCGTGGCTGGTGCCGCCTTGGCAGCACCGGTCA
A-2   GTAACAATGAGGTCATGGCTCTTGAACCCGTGGCTGGTGCCGCCTTGGCAGCACCGGTCA
A-3   GTAACAATGAGGTCATGGCTCTTGAACCCGTGGCTGGTGCCGCCTTGGCAGCACCGGTCA
A-4   GTAATAATGAGGTCATGGCTCTTGAACCCGTGGCTGGTGCCGCCTTGGCAGCACCGGTCA
B-1   GTAACAATGAGGTCATGGCTCTTGAACCCGTGGCTGGTGCCGCCTTGGCAGCACCGGTCA
B-2   GTAACAATGAGGTCATGGCTCTTGAACCCGTGGCTGGTGCCGCCTTGGCAGCACCGGTCA
    180                                                       240
A-1   CCGGTCAAACAAATATTATAGACCCTTGGATTAGAGCAAATTTTGTCCAGGCCCCCAATG
A-2   CCGGTCAAACAAATATTATAGACCCTTGGATTAGAGCAAATTTTGTCCAGGCCCCCAATG
A-3   CCGGTCAAACAAATATTATAGACCCTTGGATTAGAGCAAATTTTGTCCAGGCCCCCAATG
A-4   CCGGTCAAACAAATATTATAGACCCTTGGATTAGAGCAAATTTTGTCCAGGCCCCCAATG
B-1   CCGGTCAAACAAATATTATAGACCCTTGGATTAGAGCAAATTTTGTCCAGGCCCCCAATG
B-2   CCGGTCAAACAAATATTATAGACCCTTGGATTAGAGCAAATTTTGTCCAGGCCCCCAATG
    241                                                       300
A-1   GCGAATTTACAGTCTCTCCCCGTAATGCCCCTGGTGAAGTGCTATTAAGTCTAGAGTTGG
A-2   GCGAATTTACAGTCTCTCCCCGTAATGCCCCTGGTGAAGTGCTATTAAGTCTAGAGTTGG
A-3   GCGAATTTACAGTCTCTCCCCGTAATGCCCCTGGTGAAGTGCTATTAAGTCTAGAGTTGG
A-4   GCGAATTTACAGTCTCTCCCCGTAATGCCCCTGGTGAAGTGCTATTAAGTCTAGAGTTGG
B-1   GCGAATTTACAGTCTCTCCCCGTAATGCCCCTGGTGAAGTGCTATTAAGTCTAGAGTTGG
B-2   GCGAATTTACAGTCTCTCCCCGTAATGCCCCTGGTGAAGTGCTATTAAGTCTAGAGTTGG
    301                                   338
A-1   GTCCAGAATTAAATCCTTATCTGGCACATTTAGCAAGA
A-2   GTCCAGAATTAAATCCTTATCTGGCACATTTAGCAAGA
A-3   GTCCAGAATTAAATCCTTATCTGGCACATTTAGCAAGA
A-4   GTCCAGAATTAAATCCTTATCTGGCACATTTAGCAAGA
B-1   GTCCAGAATTAAATCCTTATCTGGCACATTTAGCAAGA
B-2   GTCCAGAATTAAATCCTTATCTGGCACATTTAGCAAGA
```

図１　2グループより検出されたNV遺伝子の塩基配列

陽性検体についてPCRダイレクトシーケンスを実施し338bpの塩基配列を比較したところ，A4の1検体は1bp異なった配列であったものの，その他すべての株において塩基配列が一致した（図1）.

当該事例において，2つのグループより検出されたNV6株の遺伝子型は塩基配列がすべてGⅡ/2で2003年にチュニジアで確認されたMonastir/310/2003と近縁であった．系統樹を図2に示す．A1-A4がAグループ，B1-B2がBグループの株である．C1-C2は，この事例の2週間以前に，Aグループの勤務先で発生した事例からのもので，この2株の遺伝子型は共にGⅡ/3で2007年に富山県で確認されたToyama/115/2007/JPと近縁であった．この遺伝

子解析の結果から，当該事例患者とは株が異なることが分かり，勤務先の事例から発生した2次感染の可能性は低いと考えられた．また，D1-D6は同時期に近郊の地域で発生した事例で，NV陽性となった6名の塩基配列はすべてGⅡ/4で2010年に中国で確認されたCHD-032304/CHN/2010と近縁であり，これら近郊の地域でのNV株とも異なっていることが示唆された．

当該事例の場合，2グループの潜伏時間に差があることから，疫学的には単一暴露による食中毒とは断定出来ず，感染源，感染経路の特定にも至らなかった．しかしながら同時刻に同飲食店を利用した2グループの患者より検出されたNV遺伝子の6名中5名の塩基配列が一致し，残り1名も1塩基の違いで99.7％一致していることから，何らかの関連性が示唆された．現在のところ，それが飲食店に関連しているのか，この時期に藤沢市で流行していたNV株で，たまたまこの2グループが同じ流行株に感染していたのかは不明であった．

NVによる食中毒を正確に判断し，解明を行う上で，日頃からの食中毒疑い事例や感染性胃腸炎などの症例で遺伝子解析を取り入れ，地道なデータを蓄積していくことが重要で，近郊の流行株の把握にも役立つものと思われる．

（平成23年８月５日受理）

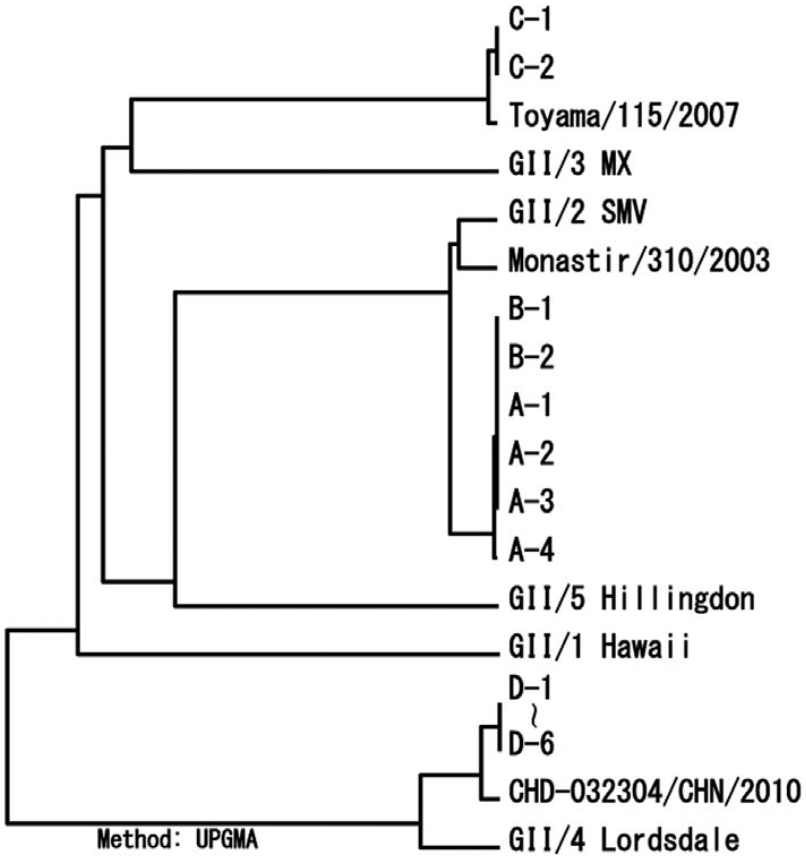

図２　検出されたウイルス遺伝子の系統樹

神奈川県衛生研究所研究報告　No. 41（2011）
Bull. Kanagawa Ins. of P.H.

資料

神奈川県域におけるインフルエンザの流行状況（2010/2011シーズン）

渡邉寿美，齋藤隆行，近藤真規子，古屋由美子

Epidemic of influenza in Kanagawa Prefecture (2010/2011 season)

Sumi WATANABE, Takayuki SAITO,
Makiko KONDO and Yumiko FURUYA

2009年4月に北米で新型インフルエンザ（pandemic influenza A(H1N1)2009，以下AH1pdm）の流行が確認され，日本では，2009年5月に関西地方で流行が確認された後，夏から秋にかけて全国で流行がみられた．神奈川衛研報告第40号（平成22年）で報告したとおり，2009/2010シーズンに神奈川県域では，2009年6月9日に初めてAH1pdmが検出された後，8月以降患者報告数が増加を始め，11月にピークを迎えて，2010年2月には沈静化し，例年の流行よりも3ヶ月ほど速いペースで進行した．また，この間に検出されたインフルエンザウイルスは，AH3の1例以外はすべてAH1pdmであり，季節性AH1とBは検出されなかった．2010/2011シーズンは，AH1pdmがどのような流行動向を示すのか，また，これまでの季節性インフルエンザがどのような動向を示すのかという点が注目された．

2010/2011シーズンの神奈川県域の患者報告は，流行開始の目安となる定点あたり患者報告数1.0人を超えたのが2010年50週（12/13～20），注意報の10.0人を超えたのが2011年2週(1/10～16)，警報の30.0人を超えた4週（1/24～1/30，38.57人）をピークとしてその後減少に転じたが，10週（3/7～13）に再度増加し，その後は緩やかに減少した．2009/2010シーズンは，パンデミック発生以前の9シーズン（2000/2001～2008/2009）の平均と比較して3～4ヶ月早いペースで推移したが，2010/2011シーズンは過去9シーズンと同様のペースで推移した（図1）．

ウイルス調査は，ウイルスサーベイランス（通常の病原体定点調査）と重症サーベイランス（インフルエンザと診断された重症例及び死亡例の調査）及び集団かぜ調査（県域及び藤沢市保健所管内の初発事例）で収集された検体を対象に行った．ウイルスサーベイランスの検体は637例，重症サーベイランスの検体は10例，集団かぜの検体は10集団45例であった．検査はリアルタイムRT-PCR法による遺伝子検出で行い，検出対象はインフルエンザウイルスのHA遺伝子（AH1pdm，AH1，AH3，B）とした．また，一部の検体についてはMDCK細胞によるウイルス分離を行い，AH1pdm分離株についてはOne-step RT-PCR法を用いてNA遺伝子のオセルタミビル耐性マーカー（275Y）の調査を行った．

インフルエンザウイルスの検出状況を見てみると，9月から12月にかけては，AH3が先行して検出された後，AH1pdmと Bも検出された．1月にはAH1pdmが主流

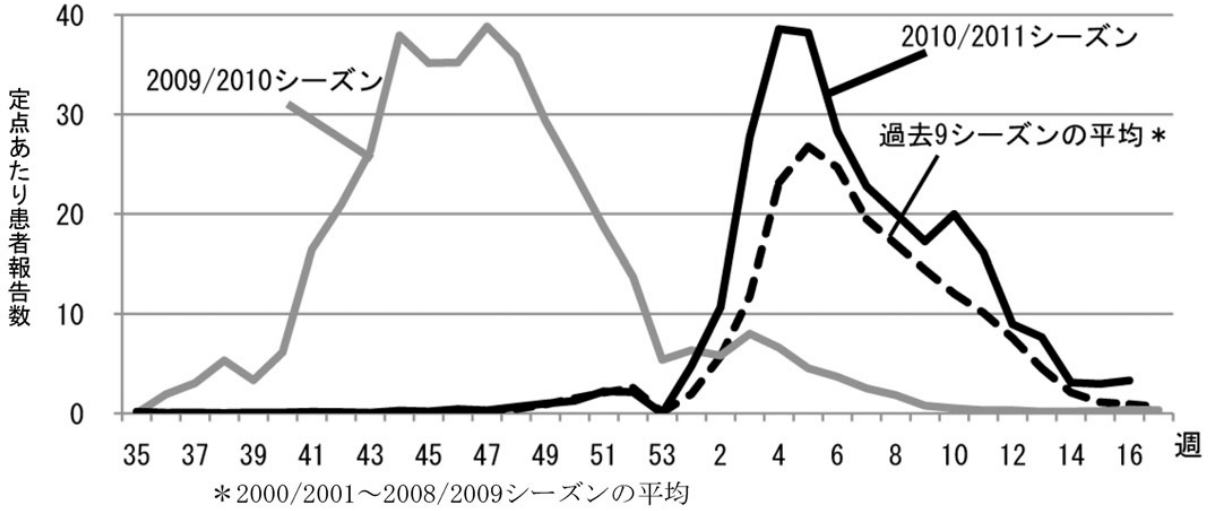

図１　インフルエンザの定点あたり患者報告数の推移

神奈川県衛生研究所　微生物部
〒253-0087　茅ヶ崎市下町屋1-3-1

となり，2月にはAH1pdmが減ってAH3とBが増え、3月以降はBが主流になった（図2）．検出されたインフルエンザウイルスの内訳は，AH1pdmが280例（51％），AH3が139例（25％），Bが130例（24％）となり，AH1pdmの単独流行となった2009/2010シーズンと異なり，3種類のウイルスが混在した流行であった（図3）．なお，季節性AH1は検出されなかった．

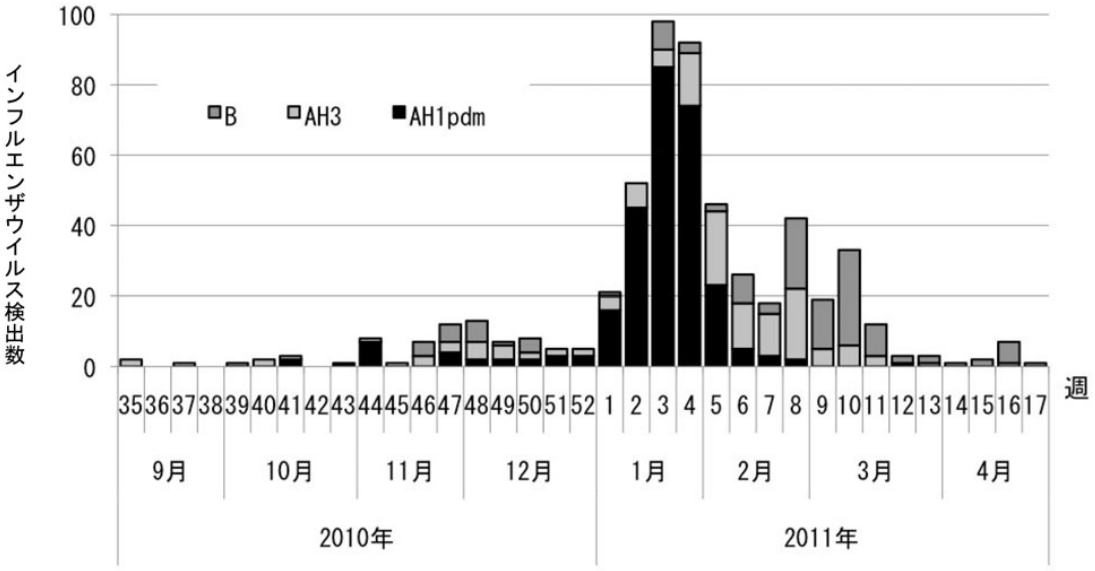

図２　インフルエンザウイルス検出数の推移

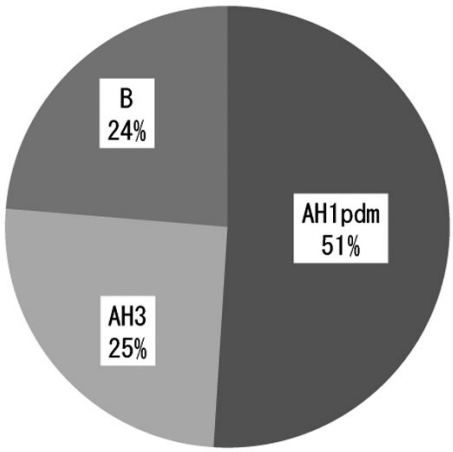

図３　インフルエンザウイルス検出数の型別内訳（N＝549）

インフルエンザ検出者の年齢構成は，0～4歳10％，5～9歳31％，10～14歳21％，15～19歳7％，20～29歳10％，30～39歳9％，40～49歳7％，50～59歳3％，60～69歳1％，70歳以上1％となり，5～9歳と10～14歳の割合が多く，全体の2分の1を占めていた（図4）．型別の年齢構成を見てみると，AH1pdmは0～4歳12%，5～9歳23%，10～39歳11～14%，40歳以上1～9%であった（図5）．AH3は0～4歳11%，5～9歳30%，10～14歳31%，15歳以上1～7%であった（図6）．Bは0～4歳5%，5～9歳48%，10～14歳30%，15～49歳4～5%，50歳以上は0%であった（図7）．AH1pdmはほかの2つの型と比較して広い範囲の年齢層で流行していたが，中でも5～9歳が23%と最も多かった．AH3とBでは5～14歳の割合が大変多く，AH3では 61%、Bでは78%であった．2010/2011シーズンのインフルエンザの流行は，5～14歳が中心であったと考えられた．

2007/2008シーズン以来，季節性AH1のオセルタミビル耐性株が世界各国で高頻度に分離されるようになった．2008/2009 シーズンには，全国的に季節性AH1の耐性株が流行し，県域でも調査した全例（46例）がすべて耐性株であった．そのため，2009/2010シーズンはAH1pdmの耐性株の出現に注目が集まり，全国で調査数の1.1％の耐性株が検出されたが，神奈川県域の144株からは検出されなかった．2010/2011シーズンは，67株について調査したところ，耐性株が2株検出され，ダイレクトシークエンス法で遺伝子配列を確認した．これら2株の耐性株は，感染症発生動向調査病原体定点からの検体であったが，検体採取時期，医療機関，居住地等が異なることから，関連性は無いと思われた．

厚生労働省は，2010/2011シーズンのAH1pdmの流行状況が，重症例や死亡例の患者年齢が2009/2010シーズンに比べて高い年齢層に移ってきていること，AH3及びBとの混合流行であり季節外れの流行ではなかったこと等の理由により，「新型インフルエンザ等感染症」として扱ってきたAH1pdmを2011年4月1日以降通常の季節性インフルエンザとして扱い，その名称を「インフル

エンザ(H1N1)2009」とすることを公表した（「新型インフルエンザ（A/H1N1）に係る季節性インフルエンザ対策への移行について」厚生労働省新型インフルエンザ対策推進本部事務局事務連絡，平成23年3月31日）．これに伴いAH1pdm（新型インフルエンザ）対策は季節性インフルエンザ対策へ移行となったが，今後，薬剤耐性株が増える，病原性が強くなるなどの変異が生じる可能性が考えられることから，今後も監視を続けることが重要である．

最後になりましたが，検体採取および患者情報の収集にご協力いただきました医療機関の先生方および検体搬送にご尽力いただきました保健福祉事務所職員の皆様に深謝いたします．

（平成23年８月５日受理）

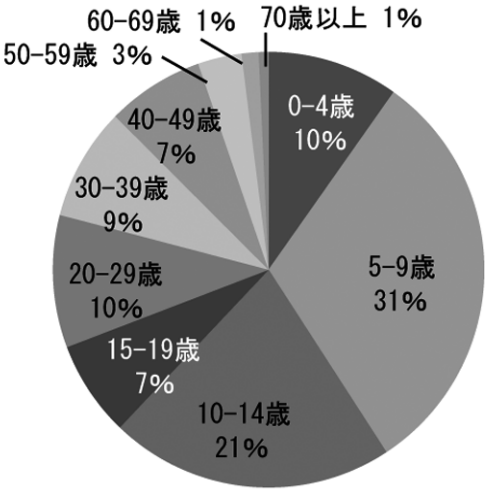

図４　インフルエンザウイルス検出者の年齢別内訳（N＝549）

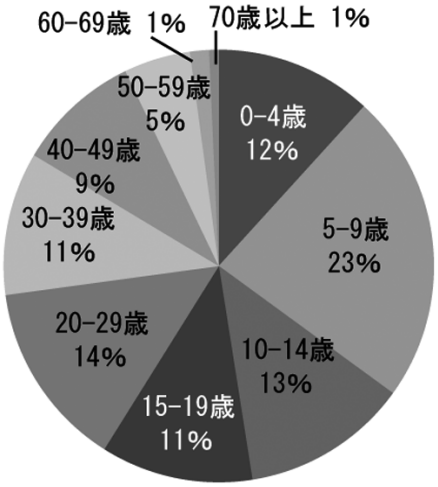

図５　AH1pdmの年齢別内訳（N＝280）

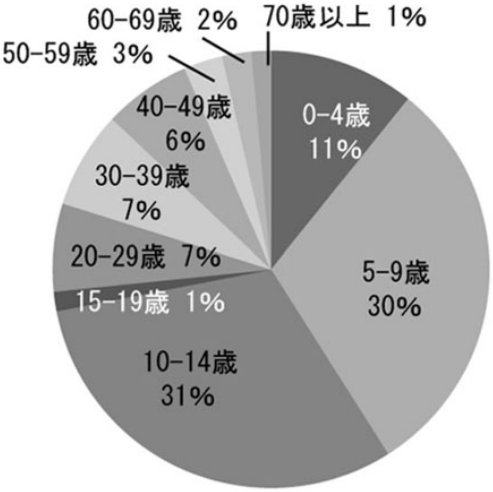

図６　AH3の年齢別内訳（N＝139）

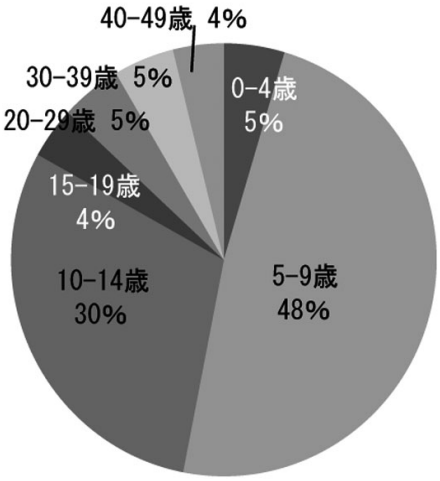

図７　Bの年齢別内訳（N＝130）

神奈川県衛生研究所研究報告　No. 41（2011）
Bull. Kanagawa Ins. of P.H.

資料

神奈川県におけるつつが虫病の発生状況（平成22年度）

片山　丘，鈴木理恵子，齋藤隆行，古屋由美子

Occurrence of tsutsugamushi disease in Kanagawa Prefecture（April, 2010～March, 2011）

Takashi KATAYAMA, Rieko SUZUKI,
Takayuki SAITO and Yumiko FURUYA

日本で発生しているつつが虫病は，秋田県，山形県および新潟県の特定河川流域で夏期にアカツツガムシが媒介する古典型と，日本各地で春期や秋期に非アカツツガムシが媒介する新型が知られているが，全国的な発生数は1951年をピークに1960年代後半には一桁となりほぼ制圧されたと考えられていた．しかし，1980年代になり各地で新型のつつが虫病患者発生が再び急増し，1984年には全国で約1,000名の患者発生に至った．その後やや減少したものの1990年にはまた1,000名近くまで増加した．1991年以降患者数は徐々に減少する傾向であったが，2000年には一時増加がみられ，2002年からの9年間の患者数は300から450名で推移している．神奈川県での患者発生数の推移は，全国の患者発生数とほぼ同じ傾向がみられ，1990年に112名の患者が報告された後減少傾向を示し，1996年および1997年には9名となった．1998年より増加傾向に転じ，1999年35名，2000年42名の患者が報告された．その後再び減少し，2003年には6名となり，2004年から2009年はやや増加して12名から25名で推移し，2010年は2009年と同様に18名の患者発生であった（図1）．

神奈川県では，1990年から1992年につつが虫病の検査体制の整備や地域の医療機関および住民への啓発活動を行った．検査はimmunofluorescence assay（IFA）による血清診断に加え，polymerase chain reaction（PCR）によるつつが虫病の迅速診断および感染株の型別，病原体の分離同定および解析を行っている．検査結果については，各保健福祉事務所の保健予防課の方々との連携により，医療機関に早期に結果報告が行われるなど，情報が速やかに還元されている．

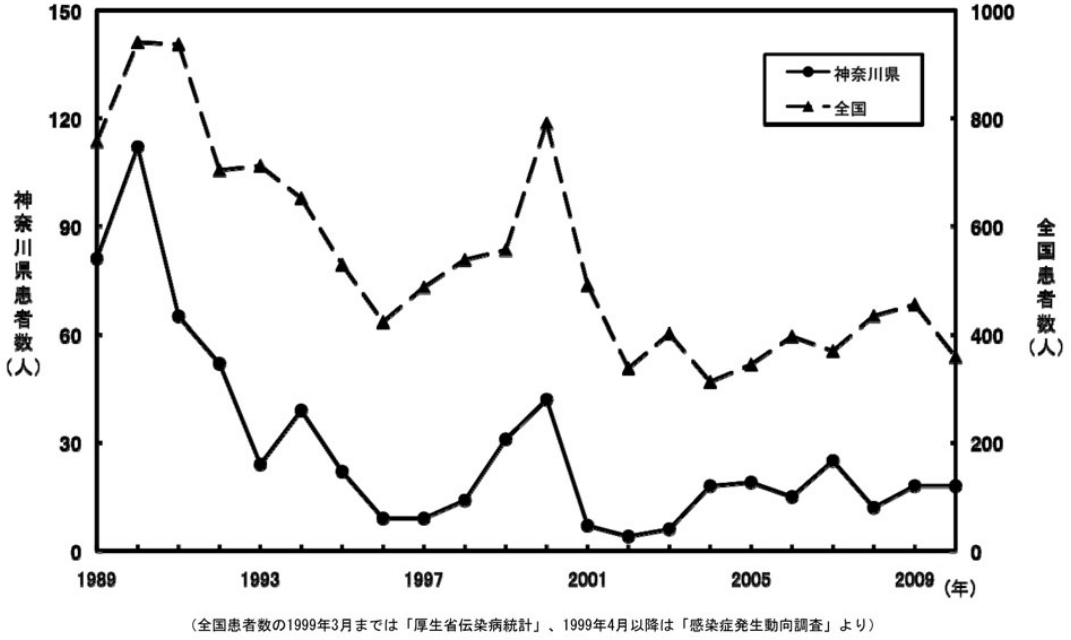

図１　つつが虫病患者発生状況

神奈川県衛生研究所　微生物部
〒253-0087　茅ヶ崎市下町屋1-3-1

2010年4月から2011年3月につつが虫病を疑われた患者は，足柄上保健福祉事務所管内18例，小田原保健福祉事務所管内1例，厚木保健福祉事務所管内1例，秦野保健福祉事務所管内1例，平塚保健福祉事務所管内1例，茅ヶ崎保健福祉事務所管内1例の合計23例であった．これらの検体について検査結果を表1に示し，過去10年間の検査結果を表2に示した．今年度衛生研究所の検査において陽性と判定されたのは18例であった．検査結果の詳細は，23例のIFA判定では，急性期・回復期の血清10例（H22-2～H22-5，H22-7，H22-8，H22-11，H22-13，H22-17，H22-19）中，抗体価の上昇（4倍以上の差）から9例（H22-3～H22-5，H22-7，H22-8，H22-11，H22-13，H22-17，H22-19）が陽性と判定された．また急性期・回復期の血清抗体価の上昇のない1例（H22-2）は陰性と判定された．急性期の血液のみの検査13例中8例（H22-6，H22-9，H22-10，H22-12，H22-16，H22-18，H22-20，H22-22）はIgM抗体価が80倍以上であったため陽性と判定され，計17例がつつが虫病と診断されたが，5例（H22-1，H22-14，H22-15，H22-21，H22-23）はIFAでは判定できず判定保留となった．

PCRによる急性期の血液を用いた *Orientia tsutsugamushi* DNAの検出では，IFAで陽性であった17例のうち，15例（H22-3～ H22-13，H22-16，H22-17，H22-19，H22-22）からDNAが検出された．またIFAで判定保留の5例中1例（H22-14）からもDNAが検出され，陽性と判定されたことから，合わせて検査しなかった1例を除いた22例中16例がDNA検出でつつが虫病と診断され，最終的に患者は18名となった（表1）．

表１　つつが虫病を疑われた患者のIFAとPCRによる検査結果

検体番号	性別	年齢	発病日	採血日	抗Gilliam株		抗Karp株		抗Kato株		抗Kawasaki株		抗Kuroki株		IFA判定	PCR判定	総合判定
					IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG			
H22-1	女	59	2010.6.7	2010.6.10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	保留	陰性	陰性
H22-2	男	76	2010.9.20	2010.9.30	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	陰性	陰性	陰性
				2010.10.14	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10			
H22-3	男	63	2010.10.26	2010.10.26	80	<10	<10	<10	<10	<10	160	<10	<10	<10	陽性	陽性(Kw)	陽性
				2010.11.1	≧320	≧320	40	20	40	20	≧320	≧320	80	20			
H22-4	男	62	2010.10.22	2010.11.1	40	<10	<10	<10	<10	<10	≧320	<10	<10	<10	陽性	陽性(Kw)	陽性
				2010.11.15	≧320	160	160	160	160	160	≧320	≧320	160	160			分離陽性
H22-5	男	52	2010.11.3	2010.11.8	160	<10	<10	<10	<10	<10	160	<10	<10	<10	陽性	陽性(Kw)	陽性
				2010.11.15	≧320	≧320	40	≧320	40	≧320	≧320	≧320	80	≧320			分離陽性
H22-6	女	50	2010.11.3	2010.11.11	≧320	<10	≧320	<10	≧320	<10	≧320	<10	≧320	<10	陽性	陽性(Kw)	陽性
																	分離陽性
H22-7	男	63	2010.11.15	2010.11.16	20	<10	<10	<10	<10	<10	80	<10	<10	<10	陽性	陽性(Kw)	陽性
				2010.11.24	160	40	40	<10	20	20	≧320	≧320	40	<10			分離陽性
H22-8	男	67	2010.11.20	2010.11.22	40	<10	<10	<10	<10	<10	160	<10	<10	<10	陽性	陽性(Kw)	陽性
				2010.12.6	80	40	40	80	160	80	≧320	160	80	160			分離陽性
H22-9	女	77	2010.11.15	2010.11.22	160	<10	<10	<10	<10	<10	160	<10	<10	<10	陽性	陽性(Kw)	陽性
																	分離陽性
H22-10	男	59	2010.11.15	2010.11.24	≧320	160	≧320	160	40	20	160	20	≧320	≧320	陽性	陽性(Kr)	陽性
H22-11	男	61	2010.11.20	2010.11.25	40	10	80	40	20	<10	10	<10	160	40	陽性	陽性(Kr)	陽性
				2010.12.2	80	20	160	≧320	160	40	40	20	≧320	≧320			
H22-12	男	57	2010.11.17	2010.11.26	20	<10	160	<10	20	<10	≧320	20	20	<10	陽性	陽性(Kw)	陽性
H22-13	男	80	2010.11.27	2010.11.29	<10	<10	<10	<10	<10	<10	20	<10	<10	<10	陽性	陽性(Kw)	陽性
				2010.12.10	≧320	≧320	40	≧320	80	≧320	≧320	≧320	40	≧320			分離陽性
H22-14	男	68	2010.11.25	2010.11.29	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	保留	陽性(Kw)	陽性
H22-15	女	47	2010.11.26	2010.11.29	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	保留	陰性	陰性
H22-16	女	69	2010.11.23	2010.11.29	40	<10	<10	<10	<10	<10	80	40	<10	<10	陽性	陽性(Kw)	陽性
H22-17	男	84	2010.11.29	2010.12.1	≧320	<10	80	10	<10	<10	≧320	10	<10	<10	陽性	陽性(Kw)	陽性
				2010.12.10	160	≧320	160	≧320	160	80	≧320	≧320	80	≧320			分離陽性
H22-18	女	65	2010.11.15	2010.12.2	≧320	80	≧320	≧320	160	80	80	20	≧320	≧320	陽性(Kr)	陰性	陽性
H22-19	女	72	2010.12.1	2010.12.7	160	160	160	80	160	80	≧320	≧320	160	160	陽性	陽性(Kw)	陽性
				2010.12.22	≧320	≧320	≧320	≧320	160	≧320	≧320	≧320	≧320	≧320			分離陽性
H22-20	女	61	2010.12.2	2010.12.8	≧320	<10	≧320	<10	160	<10	≧320	<10	160	<10	陽性(Kw)	陰性	陽性
H22-21	男	48	2010.12.15	2010.12.21	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	保留	陰性	陰性
H22-22	女	67	2010.12.12	2010.12.21	≧320	80	≧320	≧320	≧320	80	40	80	≧320	≧320	陽性	陽性(Kp)	陽性
H22-23	男	65	2011.2.2	2011.3.4	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	保留	NT	保留

Kw ： Kawasaki株　　Kr ： Kuroki株　　Kp ： Karp株　　NT ： 検査せず

このことからIFAとPCRの検査を併用することにより，早期に診断が可能なうえIFAで判定保留の例やPCRでDNAが検出されない例（H22-18，H22-20）についても診断が可能であった（表2）．

表２　神奈川県域のIFAおよびPCRによるつつが虫病患者数

検体数	陽性数			確定患者数
	IFAのみ	IFAおよびPCR	PCRのみ	
10	0	7	0	7
7	1	3	0	4
13	1	4	1	6
24	5	13	1	19
25	5※	13	0	18
24	4	11	0	15
34	2	20	3	25
25	1	9	2	12
35	2※	12	4	18
23	2	15	1	18
220	23	107	12	142

※：血清検査のみの検体を含む

つつが虫病はテトラサイクリン系薬剤が著効であり，これら薬剤の投与により完治する病気である．しかし，適切な治療が行われないと死亡する例もあり，他の病気との鑑別のために早期の確定診断が重要である．今後もPCRとIFAを併用し，つつが虫病の診断をより確実にする必要があると考えられた．今後は，PCRの感度向上や新たな株に対する迅速対応などが重要である．

PCRにより*O. tsutsugamushi* DNAの検出された16例について，型別用のプライマーを用いたPCRを行い，神奈川県内で発生しているつつが虫病の感染株について検索を行った（表1）．今回県内の患者に感染が見られた株は，Kawasaki，Kuroki，Karpの3株であり，それぞれ13例（81.2%），2例（12.5%）および1例（6.3%）であり，例年と同様にその大部分がKawasaki株による感染であることが判明した（表3）．

表３　神奈川県域で感染したと思われる患者感染株のPCR型別

年	検体数	型別		
		Karp	Kawasaki	Kuroki
2001	7	2	4	1
2002	3	0	3	0
2003	5	1	3	1
2004	14	0	10	4
2005	13	1	10	2
2006	11	0	8	3
2007	23	1	18	4
2008	11	2	8	1
2009	16	1	12	3
2010	16	1 (6.3)	13 (81.2)	2 (12.5)
合計	119	9 (7.6)	89 (74.8)	21 (17.6)

()内は%

今年度も培養細胞によるつつが虫病患者血液からの病原体の分離を実施した．急性期のPCRでDNAが検出された検体について，分離培養を行ったところ，今年度は9検体（H22-4～H22-9，H22-13，H22-17，H22-19）より病原体*O. tsutsugamushi* が分離された．この病原体は，患者血清と高い反応性を有していることからこの患者の病因であることが示唆された．またPCRによる型別により9株全て*O. tsutsugamushi* のKawasaki株であることが確認されたが，56kDaタンパク質をコードしている遺伝子のうち460塩基について解析した結果，今年度の分離株では一昨年度と同様に251番目のCがTに変化した8株とこれとは異なった265番目のAがGに変化している1株が確認された（図2）．これらの株については今後さらに別の遺伝子などの詳細な検討が必要である．病原体を分離し遺伝子の解析を行うことは，県内で発生しているつつが虫病の診断を行う上で重要なことであり，今後も病原体の分離を実施していく必要がある．

```
             1                                                        60
Kawasaki     CCTCAACCTACTATAATGCCTATAAGTATAGCGGATCGTGATTTGGGAGTTGATACTGAC
H20-8&14     CCTCAACCTACTATAATGCCTATAAGTATAGCGGATCGTGATTTGGGAGTTGATACTGAC
H22-4        CCTCAACCTACTATAATGCCTATAAGTATAGCGGATCGTGATTTGGGAGTTGATACTGAC
H22-others   CCTCAACCTACTATAATGCCTATAAGTATAGCGGATCGTGATTTGGGAGTTGATACTGAC
            61                                                       120
Kawasaki     ATTCTTGCTCAGGCTGCTGTTGGACAACAACAGCTTACTGTTGAGCAGCGGGCTGAAGAT
H20-8&14     ATTCTTGCTCAGGCTGCTGTTGGACAACAACAGCTTACTGTTGAGCAGCGGGCTGAAGAT
H22-4        ATTCTTGCTCAGGCTGCTGTTGGACAACAACAGCTTACTGTTGAGCAGCGGGCTGAAGAT
H22-others   ATTCTTGCTCAGGCTGCTGTTGGACAACAACAGCTTACTGTTGAGCAGCGGGCTGAAGAT
           121                                                       180
Kawasaki     AGGATTGCTTGGTTGAAGAATTATGCTGGTATTGACTATATGGTCCCAGATTCTCAGAAT
H20-8&14     AGGATTGCTTGGTTGAAGAATTATGCTGGTATTGACTATATGGTCCCAGATTCTCAGAAT
H22-4        AGGATTGCTTGGTTGAAGAATTATGCTGGTATTGACTATATGGTCCCAGATTCTCAGAAT
H22-others   AGGATTGCTTGGTTGAAGAATTATGCTGGTATTGACTATATGGTCCCAGATTCTCAGAAT
           181                                                       240
Kawasaki     CCTAATGCTAGAGTTGTAAATCCTGTATTGTTAAATATTACTCAAGGGGCACCTAATGTA
H20-8&14     CCTAATGCTAGAGTTGTAAATCCTGTATTGTTAAATATTACTCAAGGGGCACCTAATGTA
H22-4        CCTAATGCTAGAGTTGTAAATCCTGTATTGTTAAATATTACTCAAGGGGCACCTAATGTA
H22-others   CCTAATGCTAGAGTTGTAAATCCTGTATTGTTAAATATTACTCAAGGGGCACCTAATGTA
           241       251          265                                300
Kawasaki     AATCCTAGACCTCGGCAAAATCTTAATATACTTGATCATGATCAATGGAGGTATTTGGTA
H20-8&14     AATCCTAGACTTCGGCAAAATCTTAATATACTTGATCATGATCAATGGAGGTATTTGGTA
H22-4        AATCCTAGACCTCGGCAAAATCTTGATATACTTGATCATGATCAATGGAGGTATTTGGTA
H22-others   AATCCTAGACTTCGGCAAAATCTTAATATACTTGATCATGATCAATGGAGGTATTTGGTA
           301                                                       360
Kawasaki     GTTGGTGTTACCGCATTGTCAAATGCTAATAAACCTAGCGTTTCTTCTGTTAAAGTATTA
H20-8&14     GTTGGTGTTACCGCATTGTCAAATGCTAATAAACCTAGCGTTTCTTCTGTTAAAGTATTA
H22-4        GTTGGTGTTACCGCATTGTCAAATGCTAATAAACCTAGCGTTTCTTCTGTTAAAGTATTA
H22-others   GTTGGTGTTACCGCATTGTCAAATGCTAATAAACCTAGCGTTTCTTCTGTTAAAGTATTA
           361                                                       420
Kawasaki     AGTGACAAAATTACTCAGATATATAGTGATATAAGGCAATTCGCTAAGATAGCTAATATT
H20-8&14     AGTGACAAAATTACTCAGATATATAGTGATATAAGGCAATTCGCTAAGATAGCTAATATT
H22-4        AGTGACAAAATTACTCAGATATATAGTGATATAAGGCAATTCGCTAAGATAGCTAATATT
H22-others   AGTGACAAAATTACTCAGATATATAGTGATATAAGGCAATTCGCTAAGATAGCTAATATT
           421                                       460
Kawasaki     GAAGTTCCTGGCGCTCCTTTGCCTAATAGTGCATCTGTTG
H20-8&14     GAAGTTCCTGGCGCTCCTTTGCCTAATAGTGCATCTGTTG
H22-4        GAAGTTCCTGGCGCTCCTTTGCCTAATAGTGCATCTGTTG
H22-others   GAAGTTCCTGGCGCTCCTTTGCCTAATAGTGCATCTGTTG
```

図２　分離株とKawasaki株との遺伝子の比較

つつが虫病患者より聞き取り調査で得られた感染推定地域は，不明の2例を除き南足柄市と足柄上郡山北町に集中しており過去の発生状況と同じであったが，昨年度は南足柄市，足柄上郡山北町，足柄上郡大井町の3カ所と限られた地域であった患者発生が，今年度は6カ所に広がった（図3-A）．また感染推定地域に型別された病原体の株を示すと，南足柄市はKawasaki株4例およびKuroki株1例，山北町はKawasaki株5例およびKuroki株2例，小田原市，箱根町，松田町はKawasaki株1例，二宮町はKarp株1例であった（図3-B）．発生時期は10月から12月で，10月が2例で11.1％，11月が13例で72.2％，12月が3例で16.7％であった．感染時の行動は，山地の畑などでの農作業が多く，次に森林作業や山菜採りなど山での作業であった．

最後に，患者情報の収集に御協力いただきました各医療機関の先生方および衛生研究所への迅速な検体輸送に御尽力いただきました各保健福祉事務所保健予防課，県健康危機管理課の方々に深謝いたします．

（平成23年８月５日受理）

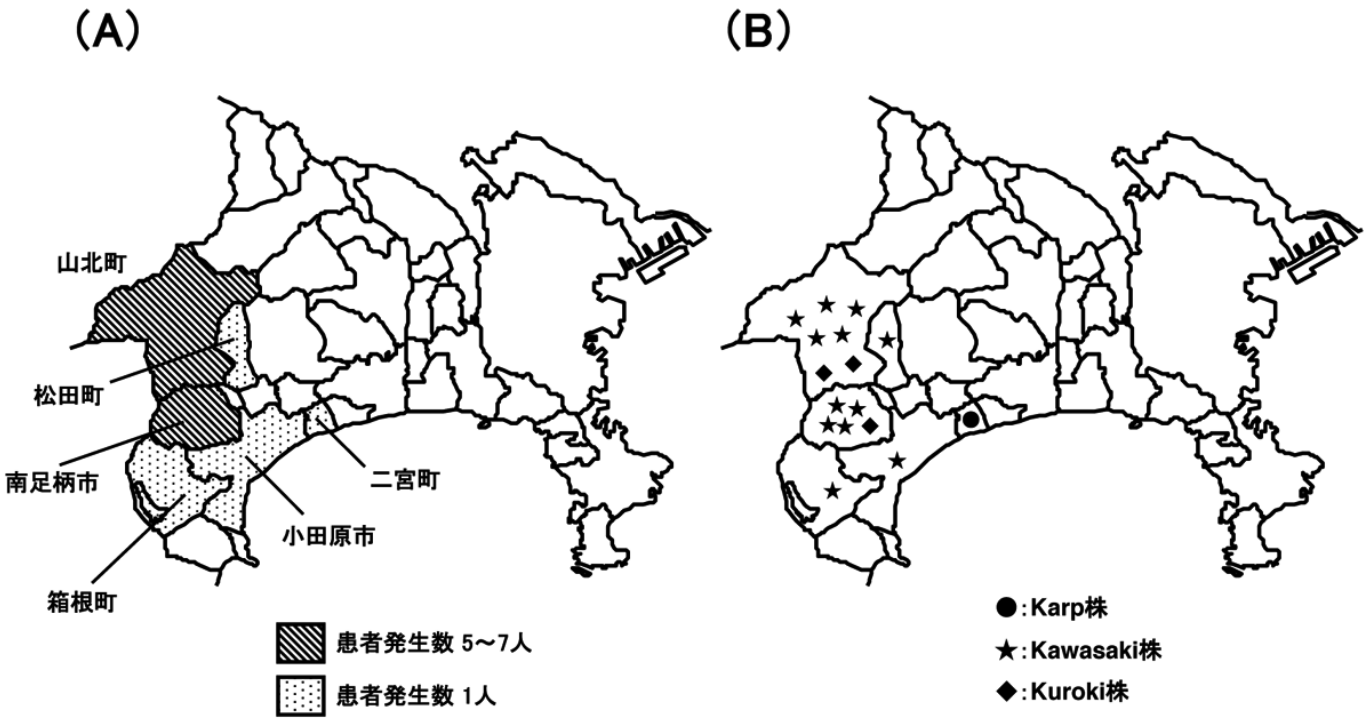

図３　つつが虫病発生地域と感染株（2010年）

神奈川県衛生研究所研究報告　No. 41（2011）
Bull. Kanagawa Ins. of P.H.

資料

苦情食品中の昆虫異物のカタラーゼ試験結果

宮澤眞紀[1]，渡邊裕子[1]，羽田千香子[1]，稲田貴嗣[2]

Results on catalase test of insects detected in foods

Maki MIYAZAWA, Hiroko WATANABE,
Chikako HADA and Takatsugu INADA

加工食品中に昆虫異物が発見された場合，異物の混入時期を推定するために，昆虫のカタラーゼ活性を生体反応の指標としたカタラーゼ試験が行われている．カタラーゼは加熱によって失活するため，食品製造工程で加熱処理が行われていれば，昆虫の混入時期を推定することが可能となり，混入原因を解明する上で有用であると考えられてきた．

カタラーゼ試験には，簡易検査法[1-3]，ガス容量測定法[4]や過酸化水素の吸光度を測定する方法（吸光度法）[5]等が報告されており，統一された試験方法はない．我々が行っている吸光度法は，簡易法と異なり定量的データが得られる方法である．平成13年から平成22年の間に実施した食品中の昆虫異物のカタラーゼ試験の結果について報告する．

試料液の調製およびカタラーゼ活性の測定は，光楽ら[5]の方法に準じて行った．昆虫に体重の50倍量の抽出用緩衝液（1%TritonX-100添加0.1mol/lリン酸緩衝液，pH7.2）を加え，テフロンホモジナイザーを用い，氷冷しながら2000～3000rpmで2分間ホモジナイズした後，6000rpm，4℃で10分間遠心した上清を試料液とした．30℃に加温した精製水6ml中に1.5%過酸化水素溶液0.4mlと試料液0.1mlを添加し，240nmでの吸光度を1分毎に4回測定した．この1分毎の吸光度の差の平均値をカタラーゼ活性値とした．カタラーゼ活性値が0.01未満の場合は，陰性と判断した．

1. 神奈川県衛生研究所　理化学部
〒253-0087　茅ヶ崎市下町屋1-3-1
miyazawa.c2q0@pref.kanagawa.jp
2. 神奈川県衛生研究所　微生物部

昆虫異物のカタラーゼ試験結果を表1に示した．

カタラーゼ活性は，13検体中5検体（No.1-5）で認められた．5検体中3検体（No.2-4）は，清涼飲料（缶コーヒーおよびペットボトル入り紅茶）中への混入で，製造工程で加熱処理が行われていた．また，冷凍スパゲッティ（No.1）への混入は，開封加熱調理後に発見されたものであった．従って，これら4例はいずれも食品開封後に昆虫が混入したものと推定された．一方，おにぎり（No.5）の事例は，食後に発見され，昆虫に食材の付着が認められなかったなどの情報から，昆虫がおにぎり中に混入していた可能性は低く，高いカタラーゼ活性が認められたことから，包装部分か喫食場所に付着していた死後間もない昆虫である可能性が高いと考えられた．

昆虫にカタラーゼ活性が認められない場合，①加熱によりカタラーゼ活性が失活した，②検査までの保存条件（酸性条件下，乾燥など）によりカタラーゼ活性が失活した，③死亡後日数が経過し，カタラーゼ活性が低下した昆虫が混入した，などの理由が考えられる．従って，カタラーゼ活性が認められなかった8検体での昆虫の混入時期の推定では，発見状況などの聞き取り情報がより重要となった．カニ缶（No.6）では，缶詰を開けたときに中に昆虫の混入を確認したとの情報と，カタラーゼ活性が認められなかったことから，製造工程中の混入と推定した．シラス干し（No.7）およびオレンジケーキ（No.8）では，カタラーゼが失活しており，食品中に埋まった状態で昆虫が発見されたとの情報から，包装前または製造中の混入である可能性が高いと推定された．トマト缶（No.9）および弁当（No.10）では，昆虫が開封加熱調理後に発見され，カタラーゼ活性が認められなかったため，カタラーゼ失活の原因が製造工程によるものか加熱調理によるものか判断できず，混入時期を推定することができなかった．コロッケ（No.11）では，昆虫がコロッケの表面に付着していたため，製造所で揚げたてのコロッケに昆虫が付着したことによりカタラーゼが失活した可能性の他に，すでに死亡してカタラーゼが失活していた昆虫が付着した可能性も考えられるため，混入時期の推定はできなかった．サラダ（No.12）では，製造工程で加熱処理が行われていないにもかかわらず昆虫のカタラーゼが失活しており，混入時期を推定できなかった．缶コーヒー（No.13）への混入事例ではカタラーゼ活性が認められなかったが，この事例では発見から検査を行うまで16日間かかっており，活性が認められなかった原因を推定することが困難であり、混入時期を推定することができなかった．

以上，昆虫異物のカタラーゼ活性が認められた5検体全例では，昆虫の混入時期を推定することができた．し

表１　昆虫異物およびカタラーゼ試験結果（2001-2010）

検体No.	昆虫異物	食品	発見状況（苦情受より）	発見から検査まで要した日数	カタラーゼ活性値	混入時期
1	モンキツノカメムシ成虫	冷凍スパゲッティ	加熱調理後の喫食中	6日	0.06	喫食中
2	タケトラカミキリ成虫	缶コーヒー	開封2時間後	6日	0.06	喫食中
3	クロゴキブリ成虫	ペットボトル紅茶	開封後，グラス内	6日	0.03	喫食中
4	チャバネゴキブリ	缶コーヒー	開封30分後	3日	0.05	喫食中
5	ケブカクロバエ成虫	おにぎり	喫食後	4日	0.13	包装中または喫食中
6	ハナバエ科の一種成虫	カニ缶	開封直後缶内	3日	<0.01	製造工程
7	シロヒトリ成虫	シラス干し	開封後，パック内	2日	<0.01	包装前
8	クロゴキブリ幼虫	オレンジケーキ	開封後，ケーキ内	7日	<0.01	製造工程
9	ヤガ科幼虫	トマト缶	加熱調理中	3日	<0.01	不明
10	ヤガ科幼虫	弁当	加熱調理後の喫食中	7日	<0.01	不明
11	クロゴキブリ幼虫	コロッケ	表面に付着	3日	<0.01	不明
12	ヤガ成虫	サラダ	喫食中，容器内	4日	<0.01	不明
13	チャバネゴキブリ幼虫	缶コーヒー	開封後	16日	<0.01	不明

かし，カタラーゼが失活していた8事例では，3例でしか混入時期の推定ができなかった．さらに，この3例では，発見状況などの聞き取り情報が混入時期を推定するための最も重要な要因であった．従って，カタラーゼ試験は，食品製造工程の昆虫の混入時期を推定するために有効な方法と考えられてきたが，むしろ，製造工程での混入ではないことを明らかにする場合に有効な試験であると考えられた．

（平成23年８月５日受理）

文　献

１）望月香，渡部泰弘，辻英明：昆虫死体のカタラーゼ活性簡易チェック法の基礎検討，ペストロジー学会誌，15，86-89（2000）

２）田中伸久，橋爪節子：昆虫死体におけるカタラーゼ活性の基礎的検討，ペストロジー学会誌，16，56-59（2001）

３）辻英明：昆虫死体のカタラーゼ簡易検査法基礎データの追加：飛来侵入昆虫その他における反応，家屋害虫，25，83-90（2003）

４）沼本敬直，望月敬夫，鈴木敏孝，溝口善則，大沢貞夫：不良食品（昆虫，毛髪等）の原因追及に対するカタラーゼ試験の応用について，食品衛生研究，28，50-53（1978）

５）光楽昭雄：食品・薬品の異物混入対策，緒方一喜，光楽昭雄編，食品・薬品の異物混入対策，pp.185-190，思潮社，東京（1984）

神奈川県衛生研究所研究報告　No. 41（2011）
Bull. Kanagawa Ins. of P.H.

資料

遺伝子組換え食品の分析結果（平成22年度）

大森清美，酒井康宏，関戸晴子，佐藤久美子，
田中由紀子，岸　弘子

Analytical results of genetically modified foods in Kanagawa Prefecture (2010)

Kiyomi OHMORI, Yasuhiro SAKAI, Haruko SEKIDO, Kumiko SATO, Yukiko TANAKA and Hiroko KISHI

遺伝子組換え（GM）作物は，2010年には29カ国で商業栽培が実施され，全世界におけるGM作物の作付面積は，栽培が開始された1996年の87倍に増加し1億4800万ヘクタールとなった[1]．日本国内では食品として商業栽培が認められたGM作物は未だ存在しないことから，安全性審査済みのGM作物のみが，GM作物である表示を行うことを前提として，輸入や国内流通が許可されている．しかしながら，これまでに安全性未審査のGM作物が海外から流入する事件がしばしば発生しており，それらの国内流通を防止するために種々の検査が行われている．日本では2001年（平成13年）4月からGM作物含有食品の表示が義務づけられ，安全性審査済みのGM作物については表示が適切に行われているか，安全性未審査のGM作物については食品中に混入が無いかを調べるために，厚生労働省および農林水産省から検知法が通知されている[2)-4)]．神奈川県では平成13年度から食品中の組換え遺伝子に関する検査を開始した．本報では，平成22年度に60検体の食品を対象として実施した組換え遺伝子 の検査結果について報告する．

試験方法は，厚生労働省通知[1,2)]およびJAS分析試験ハンドブック[4)]に従い，安全性未審査の組換え遺伝子については定性試験を，安全性審査済み組換え遺伝子については定量試験を実施した．表1に，平成22年度に検査を実施した品目および試験方法を示した．使用機器類は，既報のとおりである[5)]．

安全性未審査組換え遺伝子については，食品中への混入の有無を検知するため，トウモロコシ組換え系統；CBH351およびBt10，コメ組換え系統；Btコメの定性試験を行った．その結果，いずれの検体から得られたDNA試料液についても，それらの安全性未審査の組換え遺伝子は不検出であった（表2）．

安全性審査済み組換え遺伝子については，GM作物の表示が無く分別生産流通管理（IPハンドリング）の記録が添付されている作物，GM作物または不分別の原料表示が無い食品を対象とし，GM作物の意図せぬ混入として許容される上限の5％を超える含有の有無について定量試験を実施した．

トウモロコシの安全性審査済み組換え遺伝子（Event 176，Bt11，T25，Mon810およびGA21）については，Event176，Bt11，T25，Mon810に共通な35Sプロモーター配列の定量値および35Sプロモーター配列を含まないGA21の定量値の和から，スクリーニング試験を行うこととされている[2)]．平成22年度は，4検体のトウモロコシ穀粒について検査を実施した結果，アメリカ産の検体No.1で，35Sプロモーターが定量下限値（0.5%）[4)]未満の微量混入が認められた（表3）．

大豆の安全性審査済み組換え遺伝子であるRoundup Ready Soybean（RRS）の定量試験では，大豆穀粒12検体中，アメリカ産2検体で，定量下限値（0.5%）[6)]未満の微量混入が認められた．大豆加工食品については，厚生労働省通知では定量試験の対象外となっているが[2)]，大豆加工食品へのGM大豆「非表示」混入に対する消費者の不安が大きいことから，神奈川県では，比較的加工程度が低いと考えられる食品については通知法に準じた定量試験を実施しており，それらの結果で表示違反が疑われた場合には，原料とされた大豆穀粒について通知法に従った定量試験を実施し，最終判定を行うこととしている．平成22年度に試験を実施した大豆加工食品のうち，冷凍枝豆については，4検体中1検体で定量下限値未満の微量混入が認められた．平成20年度においても5検体中1検体で定量下限値未満の微量混入が認められているが，他の年度では全く混入は認められておらず，これまでに検査を実施した大豆加工品の中でも，冷凍枝豆はRRSの微量混入の検出頻度が低い品目であるといえる．一方，豆腐および厚揚げでは定量下限値未満の微量混入の検出頻度が高く，14検体中12検体で微量混入が認められた．豆腐もしくは厚揚げを対象としたRRSの検査は，平成17年度から継続しており，開始年度には10検体中1検体のみでRRSの微量混入が認められた．しかし，18

神奈川県衛生研究所　理化学部
〒253-0087　茅ヶ崎市下町屋1-3-1

年度には12検体中10検体，19年度は13検体全て，20年度は14検体中10検体，21年度は18検体中15検体でRRSの微量混入が認められており，豆腐および厚揚げにおける定量下限値未満のRRS微量混入は，平成18年度以降では高い頻度で検出されている．GM大豆はGM作物の中で耕地面積が一番広く，世界的には最も普及率が高いGM作物である[1]ことから，IPハンドリングが行われていても，非GM大豆へのGM大豆の微量混入は避けられない状況にあるものと考えられた．大豆以外にも，GMトウモロコシをはじめ各種GM作物の栽培面積は増加していることから[1]，非GM作物へのGM作物混入の可能性が高まることが危惧される．今後もGM作物の混入に対する検査を継続し，GM食品に関わる「表示」を監視していく必要があるものと考える．

（平成23年８月５日受理）

表１　平成22年度　組換え遺伝子検査品目及び試験方法

原料	品目	検体数	試験	試験方法	DNA抽出精製法	組換え系統	内在性遺伝子
コメ	米粉	2	定性	PCR－アガロースゲル電気泳動法	（NIPPON GENE）GM quicker2変法	Btコメ	SPS
	餅	4					
	ライスペーパー	1					
	ビーフン	1					
	煎餅	6					
トウモロコシ	トウモロコシ穀粒	4	定性	PCR－アガロースゲル電気泳動法	（QIAGEN）DNeasy Plant Mini Kit 法	CBH351・Bt10	Zein
	コーンスナック菓子	6			（QIAGEN）Genomic-tip Kit 法	CBH351	
	トウモロコシ缶詰	2					
	トウモロコシ穀粒	4	定量	リアルタイムPCR法	（QIAGEN）DNeasy Plant Mini Kit 法	35S＊・GA21	SSⅡb
大豆	大豆穀粒	12	定量	リアルタイムPCR法	（QIAGEN）DNeasy Plant Mini Kit 法 ／（QIAGEN）Genomic-tip Kit 法	RRS	Le1
	冷凍枝豆	4					
	豆腐	12					
	厚揚げ	2					
	合計	26	定性				
		34	定量				

＊Event176，Bt11，T25，Mon810のスクリーニング

表２　平成22年度　組換え遺伝子定性試験結果

No.	品目	原料産地	検査遺伝子	結果	GMに関する表示
1	米粉	記載なし	Btコメ	不検出	なし
2	米粉	記載なし	Btコメ	不検出	なし
3	餅	記載なし	Btコメ	不検出	なし
4	餅	記載なし	Btコメ	不検出	なし
5	餅	記載なし	Btコメ	不検出	なし
6	餅	記載なし	Btコメ	不検出	なし
7	ライスペーパー	ベトナム	Btコメ	不検出	なし
8	ビーフン	タイ	Btコメ	不検出	なし
9	煎餅	記載なし	Btコメ	不検出	なし
10	煎餅	記載なし	Btコメ	不検出	なし
11	煎餅	記載なし	Btコメ	不検出	なし
12	煎餅	記載なし	Btコメ	不検出	なし
13	煎餅	記載なし	Btコメ	不検出	なし
14	煎餅	記載なし	Btコメ	不検出	なし
15	トウモロコシ穀粒	フランス	CBH351/Bt10	不検出	遺伝子組換えでない
16	トウモロコシ穀粒	アメリカ	CBH351/Bt10	不検出	遺伝子組換えでない
17	トウモロコシ穀粒	アメリカ	CBH351/Bt10	不検出	遺伝子組換えでない
18	トウモロコシ穀粒	アメリカ	CBH351/Bt10	不検出	遺伝子組換えでない
19	コーンスナック菓子	記載なし	CBH351	不検出	遺伝子組換えでない
20	コーンスナック菓子	記載なし	CBH351	不検出	遺伝子組換えでない
21	コーンスナック菓子	記載なし	CBH351	不検出	遺伝子組換えでない
22	コーンスナック菓子	記載なし	CBH351	不検出	遺伝子組換えでない
23	コーンスナック菓子	記載なし	CBH351	不検出	遺伝子組換えでない
24	コーンスナック菓子	記載なし	CBH351	不検出	遺伝子組換えでない
25	トウモロコシ缶詰	アメリカ	CBH351	不検出	遺伝子組換えでない
26	トウモロコシ缶詰	記載なし	CBH351	不検出	遺伝子組換えでない

表３　平成22年度　組換え遺伝子定量試験結果

No.	品目	原料産地	検査遺伝子	結果	GMに関する表示
1	トウモロコシ穀粒	アメリカ	35S･GA21	不検出*	遺伝子組換えでない
2	トウモロコシ穀粒	アメリカ	35S･GA21	不検出	遺伝子組換えでない
3	トウモロコシ穀粒	アメリカ	35S･GA21	不検出	遺伝子組換えでない
4	トウモロコシ穀粒	フランス	35S･GA21	不検出	遺伝子組換えでない
5	大豆穀粒	アメリカ	RRS	不検出**	IPハンドリングあり
6	大豆穀粒	アメリカ	RRS	不検出**	IPハンドリングあり
7	大豆穀粒	アメリカ	RRS	不検出	IPハンドリングあり
8	大豆穀粒	カナダ	RRS	不検出	IPハンドリングあり
9	大豆穀粒	カナダ	RRS	不検出	IPハンドリングあり
10	大豆穀粒	カナダ	RRS	不検出	IPハンドリングあり
11	大豆穀粒	カナダ	RRS	不検出	IPハンドリングあり
12	大豆穀粒	カナダ	RRS	不検出	IPハンドリングあり
13	大豆穀粒	カナダ	RRS	不検出	IPハンドリングあり
14	大豆穀粒	カナダ産	RRS	不検出	IPハンドリングあり
15	大豆穀粒	中国	RRS	不検出	IPハンドリングあり
16	大豆穀粒	中国	RRS	不検出	IPハンドリングあり
17	冷凍枝豆	記載なし	RRS	不検出**	遺伝子組換えでない
18	冷凍枝豆	タイ	RRS	不検出	遺伝子組換えでない
19	冷凍枝豆	台湾	RRS	不検出	遺伝子組換えでない
20	冷凍枝豆	台湾	RRS	不検出	遺伝子組換えでない
21	豆腐	アメリカ･カナダ	RRS	不検出**	遺伝子組換えでない
22	豆腐	カナダ	RRS	不検出**	遺伝子組換えでない
23	豆腐	カナダ･アメリカ	RRS	不検出**	遺伝子組換えでない
24	豆腐	中国･アメリカ	RRS	不検出	遺伝子組換えでない
25	豆腐	記載なし	RRS	不検出**	遺伝子組換えでない
26	豆腐	記載なし	RRS	不検出**	遺伝子組換えでない
27	豆腐	記載なし	RRS	不検出**	遺伝子組換えでない
28	豆腐	記載なし	RRS	不検出**	遺伝子組換えでない
29	豆腐	記載なし	RRS	不検出**	遺伝子組換えでない
30	豆腐	記載なし	RRS	不検出**	遺伝子組換えでない
31	豆腐	記載なし	RRS	不検出**	遺伝子組換えでない
32	豆腐	記載なし	RRS	不検出	遺伝子組換えでない
33	厚揚げ	記載なし	RRS	不検出**	遺伝子組換えでない
34	厚揚げ	記載なし	RRS	不検出**	遺伝子組換えでない

＊　35S定量下限値0.5%（参考文献4）未満の微量検出
＊＊　RRS定量下限値0.5%（参考文献6）未満の微量検出

参考文献

1）ISAAA Clive, J.: Brief 42, 2010, ISAAA Report on Global Status of Biotech/GM Crops, International Service for the Acquisition of Agribiotech Applications 〈http://www.isaaa〉

2）厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知「組換えDNA技術応用食品の検査方法について」（食安発第0618001号，平成20年6月18日）

3）厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長通知「安全性未審査の中国産米加工品の検知法について」（食安監発第0220001号，平成19年2月20日）

4）JAS分析試験ハンドブック「遺伝子組換え食品検査・分析マニュアル」（農林水産消費技術センター，平成14年6月）

5）大森清美，服部愛希，酒井康宏，関戸晴子，岸弘子：遺伝子組換え食品の分析結果（平成20年度），神奈川県衛生研究所研究報告，39，37-40（2009）

6）米谷民雄：遺伝子組換え体の検知に関する調査研究，厚生労働科学研究費補助金　バイオテクノロジー応用食品の安全性確保に関する研究　平成15年度総括・分担研究報告書（H15－食品－003），65-97（2004）

他誌掲載論文抄録

（平成21年4月～平成23年3月）

Isolation and characterization of *Leptospira* spp. from raccoons in Japan
（わが国のアライグマからの*Leptospira* spp.の分離とその特徴）

小泉信夫（国立感染研），内田正紀（麻布大），牧野敬（自然環境保全センター），田栗利紹（長崎県環境保健研究センター），黒木俊郎（神奈川衛研），武藤真紀（国立感染研），加藤行男（麻布大），渡辺治雄（国立感染研），J. Vet. Med. Sci., **71**(4), 425-429 (2009)

国内に分布するアライグマが腎臓に*Leptospira* spp.を保有しているかどうかを調査した．神奈川県内で捕獲された71頭のうちの2頭と，長崎県の動物園の53頭のうちの1頭から*Leptospira*が分離された．抗体は神奈川県の124頭のうちの16頭（12.9%）と長崎県の53頭のうちの33頭（62.3%）から検出された．flaB遺伝子の塩基配列の解析によれば分離されたのは*L. interrogans*であり，血清型はCopenhageni/IcterohaemorrhagiaeとHebdomadisであった．輸入されたアライグマがわが国の新たな*Leptospira*の保有動物であることは明白であった．

Bathwater-associated cases of legionellosis in Japan, with a special focus on *Legionella* concentrations in water
（水中レジオネラ属菌数に注目した浴槽水が関連するわが国のレジオネラ症）

黒木俊郎，石原ともえ，伊藤久美子（神奈川衛研），倉　文明（国立感染研），Jpn. J. Infect. Dis., **62**(3), 201-205 (2009)

レジオネラ症の発生と浴槽水におけるレジオネラ属菌の菌数の関係を検討するために，国内の76の衛生研究所を対象にアンケート調査を実施した．35の衛生研究所が症例を経験していた．この調査により96症例が集められ，患者ならびに症例の発生に関与が疑われた施設の特徴，レジオネラ属菌の菌種，血清型および菌数などのデータ・情報が得られた．患者の年齢は13－89歳で中央値は67歳であった．患者にもっとも多くみられた病歴は糖尿病で，高血圧がこれに続いた．レジオネラ属菌の浴槽水における菌数は10－160,000cfu/100mlであった．患者由来株と浴槽水から分離された菌株のPFGE解析結果が一致した10症例の調査結果から，感染時の推計菌数は90-140,000CFU/100mlであった．

Spread of a chromosomal cefixime-resistant *pen*A gene among different *Neisseria gonorrhoeae* lineages
（淋菌系統間のCFIX耐性遺伝子保有の拡大）

大西　真（国立感染研），渡辺祐子（神奈川衛研），小野恵美（東京医歯大），高橋智恵子，大屋日登美，黒木俊郎（神奈川衛研），志牟田健（国立感染研），岡崎則男（神奈川衛研），中山周一，渡辺治雄（国立感染研），Antimicrob. Agents Chemother., **54**(3), 1060-1067 (2010)

淋菌では，PBP2に関連する*pen*A遺伝子のモザイクタイプは，経口セファロスポリン薬剤に対する感受性の低下に関連している．感受性が低下した臨床分離株32株の*pen*Aの塩基配列を決定した．その結果，感受性株に低感受性株から自然形質転換が起きていることが示唆され，少なくとも4-kbDNAが形質転換されていた．水平伝播において，*pen*A遺伝子内に点変異や置き替えが起きていた．これらの結果から，淋菌の自然形質転換が染色体性の薬剤耐性遺伝子の拡大や多様性の発現にある役割を担っているとする証拠が得られた．

試験管内でセレクションされたマクロライド耐性*Mycoplasma pneumoniae*について
－エリスロマイシンとクラリスロマイシンにおける耐性菌セレクションの比較－

大屋日登美（神奈川衛研），成田光生（JR札幌病院），鈴木五三男（茅ヶ崎市立病院），渡辺祐子，黒木俊郎，岡崎則男（神奈川衛研），日本マイコプラズマ学会雑誌，**36**, 58-61 (2009)

試験管内において，エリスロマイシンとクラリスロマイシンによる*Mycoplasma pneumoniae*の耐性菌のセレクションを調べるため，臨床分離感受性株99株及び標準株3株を用いて実験を行った．その結果，15株からマクロライド耐性株がセレクションされた．これらの耐性株について23SrRNA遺伝子のドメインＶ領域における変異を調べたところ，2063位のＡがＧに突然変異（A2063G）したものが6株，A2064Gが5株，C2617G

が1株及び不明が3株であった.

Quantitation of HIV-1 group M proviral DNA using TaqMan MGB real-time PCR
（TaqMan　MGBプローブを用いたリアルタイムPCR法によるHIV-1グループMプロウイルスDNAの高感度定量法の開発）

近藤真規子，佐野（嶋）貴子（神奈川衛研），須藤弘二，田中理恵（慶応大），相楽裕子（横浜市民病院），岩室紳也（厚木市立病院），武部　豊（国立感染研），今井光信（神奈川衛研），加藤真吾（慶応大），J. Virol. Methods，**157**，141-146（2009）

HIVプロウイルス量は抗HIV療法の長期的効果を判定する指標であり，HIVプロウイルスを正確，かつ高感度に定量することは重要である．我々はHIV-1グループMに属する多くのサブタイプを測定することが可能なプライマーおよびプローブを作製し，リアルタイムPCR法によるHIV-1プロウイルス定量法を開発した．本法は４～5000コピーの範囲で良好な直線性（slope：-3.43，R^2=0.984）が得られ，定量限界はサブタイプB，CRF01_AEともに4コピー/0.5μgDNA，再現性は実験内および実験間変動係数ともに32%以内であった．6種類のHIV-1サブタイプ（A，B，C，F，G，CRF01_AE），19株の定量値は希釈限界法によるポアソン分布法での計算値とほぼ一致しており，両法の間には良好な相関が認められた（R^2=0.988）．本法は定量感度，直線性，再現性，正確性に優れており，サブタイプBだけでなくB以外の定量にも有用であることが確認された.

妊娠とHIV感染

佐野（嶋）貴子，近藤真規子，今井光信（神奈川衛研），山田里佳（石川県立中央病院），谷口晴記（三重県立総合医療センター），塚原優己（国立成育医療センター），臨床検査，**53**(4)，467-471（2009）

日本のHIV感染者は年々増加し続けており，2004年以降は年間1,000例を超えるHIV感染者およびエイズ患者数が報告されている．現時点においては，HIV感染者は男性が9割以上を占めており，女性の割合は1割に満たないが，母子感染予防の点から多くの妊婦が妊娠初期検査の一環としてHIV検査を受検している．しかし，妊婦HIVスクリーニング検査は陽性的中率が低く，妊婦に精神的不安を与えた事例も報告されている．本稿では，妊婦におけるHIV検査の実態および実施上の問題点，HIV感染妊娠と母子感染の現状などについて概説した.

保健所等HIV検査機関におけるHIV即日検査の試みとその効果の検証およびホームページ「HIV検査・相談マップ」によるHIV検査の最新情報の提供

佐野（嶋）貴子（神奈川衛研），日本エイズ学会誌，**11**(3)，223-230（2009）

2000年当時，HIV感染は日本において確実にその広がりを拡大しつつある一方で，マスコミ等による報道機会の減少により，人々の「HIV /エイズ」に対する関心が低くなり，自らのリスクや感染そのものに気付かない人の増加について懸念されていた．実際に，HIV感染者は増加の一方であったが，保健所等検査機関の検査体制は検査希望者のニーズに十分応えられているとは言い難く，HIV感染者の早期発見・早期治療，また，感染拡大の防止のためには検査の受けやすい環境が必要であり，保健所でのHIV検査相談体制の見直しや民間クリニックでの検査希望者へのHIV検査の提供，また，HIV検査情報の提供方法に関して新たな工夫が必要となっていた．本稿では，それらの諸問題に対する取り組みとして行った，HIV迅速検査試薬を用いた即日検査の導入研究およびHIV検査機関を紹介するホームページ「HIV検査・相談マップ」による検査情報の提供について，実施の経緯および成果について紹介した.

A human immunodeficiency virus screening algorithm to address the high rate of false-positive results in pregnant women in Japan
（我が国における妊婦HIVスクリーニング検査の偽陽性例を減らすための検査アルゴリズムの検討）

佐野（嶋）貴子，近藤真規子，今井光信（神奈川衛研），山田里佳（石川県立中央病院），関田和代，ラーリ W. ハンキンズ（(株）保健科学研究所），堀　裕雅（堀病院），瀬戸　裕（瀬戸病院），河原和夫（東京医歯大），塚原優己（国立成育医療センター），稲葉憲之（獨協医大），加藤真吾，須藤弘二（慶応大），PLoS ONE，**5**(2)，e9382（2010）

妊婦におけるHIV検査は母子感染を予防する上で非常に重要である．しかし，HIVスクリーニング検査の偽陽性結果は，確認検査結果を待つ妊婦に対し，不必要な精神的ストレスを引き起こすことが指摘されている．このことから，スクリーニング検査の偽陽性を解消するための新しい検査アルゴリズムを構築することを目的に研究を行った．首都圏の2ヶ所の産婦人科病院において，妊娠初期検査としてHIV検査を希望した妊婦6,461件に対し1次スクリーニング検査を実施したところ，27件が陽性反応を示した．これら27件に対し，2次スクリーニング検査を行ったところ，1件は陽性，26件は陰性となっ

た．ウエスタンブロット法と核酸増幅検査を用いて確認検査を実施したところ，2次スクリーニング検査と一致する結果となった．1次スクリーニング検査に2次スクリーニング検査を追加することによって，偽陽性率は0.4%から0%，陽性的中率は3.7%から100%に改善した．以上の結果から，このHIVスクリーニング検査アルゴリズムは，日本のようなHIV感染率の低い地域での妊婦HIV検査に有用であると考えた．

Cell transformation activities of abietic acid and dehydroabietic acid: Safety assessment of possible contaminants in paper and paperboard for food contact use

（アビエチン酸およびデヒドロアビエチン酸の細胞形質転換活性：食品に接触して使用される紙の安全性評価）

大森清美（神奈川衛研），河村葉子（国立衛研），Food Addit. Contam., **26**(4), 568-573（2009）

アビエチン酸（Abietic acid：AA）およびデヒドロアビエチン酸（dehydroabietic acid：DHA）は，食品容器として用いられているバージンパルプおよびリサイクル紙製品から検出されている．これらAAおよびDHAについて，Bhas42細胞形質転換試験を用いて，発がんイニシエーション活性およびプロモーション活性の検討を行った．イニシエーション試験では，AAおよびDHAともに陰性結果であったが，プロモーション試験では，両化合物ともに濃度依存的な細胞形質転換フォーカス数の増大を示した．この結果は，AAおよびDHAが発がんプロモーション活性を有することを示唆している．

PCR法を用いた米加工品の安全性未審査遺伝子組換え米の検知法

穐山　浩（国立衛研），佐々木伸大（東京農工大）大木果林，中村文美，坂田こずえ，中村公亮（国立衛研），大森清美（神奈川衛研），中島安基江（広島県立総合技術研究所），橘田和美，小関良宏（（独）農研機構食品総合研究所），手島玲子（国立衛研），日本食品化学学会誌，**16**(3), 147-151（2009）

中国で開発された遺伝子組換え米(GM Shanyou63(63Bt米)）およびKemingdao系統のBt米（ＮＮＢt米）は，我が国では安全性未審査であるため，国内流通を防ぐために検査を行う必要がある．我々は，中国からの輸入ビーフンから，それらの組換え遺伝子を同定した．その遺伝子組換え米の解析結果をもとに，63Bt米とＮＮＢt米について検知可能なプライマー対を設計することにより，もち米およびビーフン加工品中の63Bt米とＮＮＢt米を検知するための定性試験法を開発した．

高速液体クロマトグラフィーによる化粧品中の防腐剤クロルフェネシンの定量

五十嵐良明（国立衛研），宮澤法政（埼玉衛研），島村公雄（カネボウ化粧品），佐藤信夫（コーセー），吉沢賢一（ポーラ化成），林　正人（資生堂），高野勝弘（粧工連），宮本道子（東京健安健センター），小島尚（神奈川衛研），坂口　洋（北里大），藤井まき子（昭和薬大），国立医薬品食品衛生研究所報告，**127**, 50-53（2009）

今回，衛生試験法香粧品試験法に防腐剤クロルフェネシンを新たに収載することから，高速液体クロマトグラフィーによる化粧品中の分析法を開発した．その方法はODSカラムを，移動相にはpH2.5に調製した水/メタノールあるいは水/アセトニトリル混液を用い，検出波長は280ｎｍで測定した．その結果，検量線は1-500μg/mLで直線性が得られ，検出限界は1-2μg/mL，各種化粧品における回収率は98-100%と，良好な方法であった．

トップアスリートの健康管理とコンディショニングに対する低反応レベルレーザー応用の可能性について
－長距離陸上選手及びプロサッカー選手を例として－

梅田　孝，高橋一平（弘前大），山本洋佑（日体大），古賀稔彦，田辺　勝（弘前大），小島新太（日体大），田中充洋，椿原徹也（弘前大），宮澤眞紀（神奈川衛研），中路重之（弘前大），日本レーザー治療学会誌，**8**, 90-97（2009）

プロサッカー選手及び大学長距離陸上選手を対象に，一過性運動負荷による身体疲労の発現と，試合後の慢性疲労の蓄積状況を筋機能及び好中球機能から観察検討した．その結果，高強度，長時間の運動負荷は筋組織を損傷し，これに付随した炎症反応として活性酸素種の産生亢進をもたらす可能性が示唆された．一過性の運動負荷後も疲労回復が不十分な場合は，慢性的な身体疲労の蓄積をもたらす可能性が示された．低反応レベルレーザー治療は，このような筋変性や損傷の回復に効果的に作用している可能性が考えられた．

健康茶から検出された加工センナに関する検討

高橋美津子（横浜市衛研），宮澤眞紀（神奈川衛研），桜井克巳，渡部健二朗（横浜市衛研），小島　尚（神奈川衛研），食品衛生学雑誌，**50**, 297-303（2009）

市販健康茶の中にセンノシドを検出するものがあったが，葉が変色しているためセンナ葉と確認することができなかった．そこで，茶や健康茶の製造法を参考に局方センナを焙煎あるいは加湿等を加えた加工センナを作製し比較した．その結果，製品中が変色した葉は，加工セ

ンナと形態および化学分析の結果は類似していた．更に，マウスにおける緩下作用も同様に認められたことなどから，変色した葉はセンナ葉に由来するものであることが推定された．

スルメイカの塩辛摂取後に発症したアニサキスアレルギーの１例：精製及び組み換えアレルゲンを用いたアレルゲン解析を含めて

繁平有希，猪又直子，中川原怜子，大川智子，澤城晴名，中村和子（横浜市大院），小林征洋（神奈川衛研，東京海洋大），塩見一雄（東京海洋大），池澤善郎（横浜市大院），アレルギー，**59**, 55-60（2010）

症例報告：症例は75歳，男性．スルメイカで作った塩辛を摂取後，全身の膨疹と舌の腫脹により緊急受診となる．血清総IgE値は456 IU/ml，特異的IgE値（ImmunoCAP）はアニサキスがclass 3，エビがclass 1，イカと回虫はclass 0であった．プリックテストではイカやエビは陰性だが，アニサキス粗抗原液とダニで陽性であった．以上よりイカ摂取によって発症したアニサキスアレルギーと診断した．さらに原因抗原の同定のために精製および組み換えアレルゲン6種（Ani s 1, 3, 4, 5, 6, 8）を用いプリックテストを施行したところ，Ani s 3（トロポミオシン）のみ陽性であり，アニサキストロポミオシンが原因抗原と推察した．

Electron microscopic study on lysis of a cyanobacterium *Microcystis*
（電子顕微鏡によるシアノバクテリア*Microcystis*の溶藻現象の観察）

尾崎恵子，田辺沙織，夏目香織（名城大），伊藤恵美子（千葉大），辻　清美（神奈川衛研），原田健一（名城大），J. Health Sci., **55** (4), 578-585（2009）

ラン藻類の溶藻活性因子として見いだしたβ-シクロシトラール等による溶藻現象を電子顕微鏡により観察し，作用機序解明を目指した．走査型電子顕微鏡による観察により，ラン藻由来揮発性化合物では細胞の縮小型や植物テルペノイドでは細胞表層の剥離型，塩基性アミノ酸では細胞の中央陥没型と3つのタイプに分けられた．さらに，透過型電子顕微鏡により細胞内小器官の観察を行い，作用点について検討した．

Blue color formation of cyanobacteria with β-cyclocitral
（β-シクロシトラールによるシアノバクテリアの青色化）

原田健一，尾崎恵子，都築さやか，加藤 創，長谷川真照（名城大），E. K. Kuroda（State University of Londrina），有井鈴江（名城大），辻　清美（神奈川衛研），J. Chem. Ecol., **35**, 1295-1301（2009）

β-シクロシトラールやジェオスミン等のラン藻由来揮発性化合物はラン藻に対して溶藻活性を示した．その中で，β-シクロシトラールのみ培養液が溶藻過程で，緑色から青色へ変化した．このメカニズムについて検討したところ，β-シクロシトラールが水中で酸化され，生成したカルボン酸体が培養液を酸性化させることにより，クロロフィル-aが分解され，フィコシアニン由来の青色色素が顕在化し，青色化させることが判明した．青色化現象は自然界でも観察されており，本化合物が溶藻現象に関与していることが強く示唆された．

Microbial degradation of cyclic peptides produced by bacteria
（バクテリアが産生する環状ペプチドの微生物分解）

加藤　創，原田健一(名城大)，辻　清美（神奈川衛研），J. Antibiot., **62**, 181-190（2009）

津久井湖から単離されたB-9株（*Sphingosinicella sp.*）はミクロシスチンやノジュラリン等有毒あるいは無毒のラン藻由来の環状ペプチドを分解する加水分解酵素を有している．本研究では，B-9株抽出液によるバクテリア由来の環状ペプチド（バシトラシン，コリスチン，ポリミキシン等6種類）の分解性を検討した．分解生成物はLC/ITMSを用いて詳細に分析した．B-9株はペプチド結合やエステル結合の加水分解により，5種類のバクテリア由来の環状ペプチドを分解することが出来た．このことより，B-9株は他のタイプの化合物に対しても分解活性があると思われた．

農作物中の元素の濃度分布に関する検討

飯島育代（神奈川衛研），高城裕之（前神奈川衛研），戸村健児（立教大原子力研究所），杉山英男（国立保健医療科学院），日本食品化学会誌，**16**(3), 123-136（2009）

神奈川県内の家庭菜園で栽培もしくは県内に流通する農作物および，県内産シイタケを対象とし，日本人の食事摂取基準が示されている栄養成分のうち，Mg，Ca，Cr，Mn，Fe，Zn，Na，Kの8元素と，それ以外のAl，Sc，Co，Rb，Sr，Cs，Ba，Cl，Brの9元素を機器放射化分析法により定量し，栄養成分について「五訂増補食品標準成分表　2009」記載値と比較した．Mg，Ca等は成分表記載値と濃度が一致した．Feは農作物により，幅広い濃度分布であった．10^{3}mg/kgレベルのSc，CsなどはMax/Minが100倍以上異なった．「緑黄色野菜」の

ホウレンソウ，シュンギク，モロヘイヤ等葉菜類は栄養成分やその他の微量元素が多く含まれていた．「その他野菜」のダイコン，ゴボウ，フキなどは元素濃度が低かった．家庭菜園の試料中のBr濃度が低い傾向にあった．当時，臭化メチルの規制が開始されたばかりで，農薬を使わない家庭菜園試料に比べ，市販品は高濃度であった．ホウレンソウのFeとSc，FeとAlとの間に高い正の相関が認められ，土壌から共に移行したと推察された．^{137}Csを高濃縮するシイタケのCs，Rb濃度は他の農作物に比べ非常に高いことが分かった．シイタケ中のCsとRbは高い正の相関が認められ，シイタケ中に取り込まれる際に同一挙動をとることが示唆された．分析結果と日本人女性の農作物の摂取量（2007）をもとに，農作物からの元素の摂取寄与を調べたところ，最も寄与が高かったのはKで，以下，Mg，Fe，Zn，Caの順であった．

Characterization of *Legionella pneumophila* isolates from patients in Japan cording to serogroups, monoclonal antibody subgroups, and sequence types
（*Legionella pneumophila* 臨床分離株の血清型、サブタイピング、シーケンスタイピングによる疫学的分類の有用性の検討）

前川純子，倉　文明，常　彬（国立感染研），菊川紀世己（埼玉県立大），渡辺祐子（神奈川衛研），磯部順子（富山衛研），貫名正文（神戸市環境保健研），中嶋　洋（岡山県環境保健センター），河野喜美子（宮崎県衛生環境研），村井美代（埼玉県立大），渡邉治雄（国立感染研），古畑勝則（麻布大），金子紀子（山形衛研），多田有希（国立感染研），J. Med. Microbiol., **59**(6), 653-659 (2010)

1980年から2008年にかけて国内のレジオネラ症患者から分離された*Legionella pneumophila*臨床分離株86株を収集した．これらの菌株の血清群は血清群1が80.2%で，次いで血清群5，3，2が多かった．血清群１の患者の男女比は男性が高く（12.4），他の血清群の患者（2.0）に比較しても高率であった．さらに血清群1の株についてモノクローナル抗体（mAb)によるサブグループ化を行った結果，サブグループは，最も一般的なベニドーム が全体の34.9％であった．また，7つの遺伝子の塩基配列の差異に基づくシーケンスによるタイピング（SBT）を行ったところ，53シーケンスタイプに分けられた．最も多かったST1（7株）は，世界中の環境，臨床分離株で最も多く見られる型の一つで，現在もわが国の環境からも最もよく分離されるが，1994年以降の臨床分離例は1株のみであった．次いで多く見られる型はST306（6株），ST120（5株）及びST138（5株）であった．ST306（6株）とST138（5株）では，1株を除き感染源は，浴槽水と確認あるいは推定されており，SBTより感染源の種別が推測できる可能性が示唆された．対象的にST1（7株），ST120（5株）はすべて感染源不明であった．以上のことからSBT と mAb のデータを組み合わせることにより，86分離菌株を59 種類に分類することができ，この組み合わせによる免疫学的分類の有用性が確認できた．

日本紅斑熱

古屋由美子，片山　丘（神奈川衛研），日本臨床，**68**, 増刊号6，240-243 (2010)

我が国における紅斑熱群リケッチア症は1984年に徳島県で初めて確認された．病名は日本紅斑熱，病原リケッチアは*Rickettsia japonica* と命名され，現在ではつつが虫病と同様に我が国に常在するリケッチア症として注目されるようになった．日本紅斑熱の患者は2006年頃までは年間50名程度であったが，2007年は98人，2008年は132名と急増している．日本紅斑熱は *R. japonica* を保有しているマダニ類に吸着されることによって感染し，人から人への感染は起こらない．日本紅斑熱の臨床症状はつつが虫病と酷似しており，発疹の出現部位や刺し口の形状などからつつが虫病と区別するのは難しい．日本紅斑熱は早い時期に適切な治療を行えば治癒する病気であるが，適切な治療が行われないと死亡する例もあり，迅速に診断することが重要である．患者の血清中の特異抗体の検出，血液からのリケッチア分離同定や*R. japonica* DNA検出を行うことによって確定診断が可能である．ここでは確定診断するための検査法についてそれぞれの有効性と問題点について述べた．

Trends in transmitted drug-resistant HIV-1 and demographic characteristics of newly diagnosed patients: Nationwide surveillance from 2003 to 2008 in Japan
（2003から2008年の新規HIV/AIDS診断症例における薬剤耐性頻度の動向）

服部純子，伊部史郎，横幕能行（名古屋医療センター），椎野貞一郎（国立感染研），潟永博之，林田庸総，岡　慎一(国立国際医療センター)，吉田　繁，小池隆夫（北海道大），南　留美，山本政弘（九州医療センター），貞升健志，長島真美（東京都健康安全センター）近藤真規子（神奈川衛研），森　治代，小島洋子（大阪公衛研），上田幹夫（石川県立中央病院），健山正男，藤田次郎（琉球大），上田敦久，石ヶ坪良明（横浜市大），加藤真吾（慶応大），伊藤俊広，佐々木悟(仙台医療センター)，大家正義，田邊嘉也（新潟大），高田　昇

（広島大学病院），松田昌和（MBC），太田康男，古賀一郎（帝京大），渡邊　大，白阪琢磨（大阪医療センター），杉浦　亙（名古屋医療センター），Antiviral Res.，**88**，72-79（2010）

日本国内の薬剤耐性HIVの発生・伝播動向を把握するため2003～2008年の6年間に登録された2573名のHIV-1感染者について，薬剤耐性変異の解析を行った．2003年の耐性変異の検出頻度は5.9％であったが，その後NRTI耐性変異が増加し，2008年の耐性変異検出頻度は8.3％であった．2007年はPI耐性変異の検出頻度が急増し，前年の2.9％増であったが，その後は若干の上昇に留まった．最も多い耐性変異はNRTIのリバータントT215Xであり，この変異は同性間感染による日本男性，HIV-1遺伝子型のサブタイプBに最も多く認められた．

試験管内でセレクションされたマクロライド耐性 *Mycoplasma pneumoniae* について
―アジスロマイシンとロキタマイシンにおける耐性菌セレクションの比較―

大屋日登美（神奈川衛研），成田光生（JR札幌病院），小田洋一郎(茅ヶ崎市立病院)，古川一郎，渡辺祐子，黒木俊郎，岡崎則男(神奈川衛研)，日本マイコプラズマ学会雑誌，**37**，55-58（2010）

国内では2000年以降，*Mycoplasma pneumoniae*のマクロライド系（MLs）薬剤耐性菌が分離されるようになった．MLs耐性*M. pneumoniae*は23S rRNA遺伝子のドメインV領域に突然変異を起こしていることが確認されており，国内ではA2063C，A2063G，A2064Gおよび C2617Gの変異を有する耐性株の分離が報告されている．神奈川県においても，2003年以降MLs耐性*M. pneumoniae*が継続的に分離されており，それらの耐性株はA2063GおよびA2064Gの変異であった．また，耐性菌出現を試験管内で実験し，MLs耐性*M. pneumoniae*がMLs系薬剤によってセレクションされることが国内外で報告されている．

本研究では，試験管内において，azithromycinとrokitamycinが*M. pneumoniae*に及ぼす影響を調べるため，臨床分離感受性株100株および標準株3株を用い，マクロライド耐性菌のセレクション試験を実施した．その結果，23株（延べ29株）からマクロライド耐性株がセレクションされた．これらの耐性株について23SrRNA遺伝子のドメインV領域における変異を調べたところ，2063位のAがGに突然変異（A2063G）したものが10株，A2064Gが9株，A2063CとA2064Cがそれぞれ1株であり，これまで国内で報告のなかったA2067Gが4株，A2067Cが2株，A2063T，A2067Tがそれぞれ1株であった．

Tree familial cases of drug-resistant *Mycoplasma pneumoniae* infection
（薬剤耐性肺炎マイコプラズマ感染の家族内感染の３症例）

神薗慎太郎（上天草総合病院），大屋日登美(神奈川衛研)，樋口定信（上天草総合病院），岡崎則男(神奈川衛研)，成田光生（JR札幌病院），Eur. J. Pediatr.，**169**，721-726（2010）

本報告では，家族内３人の肺炎マイコプラズマ（*Mycoplasma pneumoniae*）感染患者について示す．*M. pneumoniae*は選択培地で分離し，薬剤感受性試験は，薬剤の最小発育阻止濃度を微量液体希釈法で測定した．23SリボゾームRNA遺伝子ドメインV領域の変異はPCR-RFLP法で決定した．その結果，家族内の3症例から分離された3菌株はすべて同じ耐性遺伝子変異2063位のアデニンがグアニンに点変異するA2063Gであった．しかしながら，それらの臨床経過は全く異なっていた．6歳女児は，重症肺炎であったが，5歳女児は軽症の肺炎にかかっていた．そして，3歳男児は肺炎なしで1日間の発熱であった．結論として本研究の臨床と実験室内の結果は，菌株の病原因子よりもむしろ宿主免疫応答が*M. pneumoniae*感染の疾病重症度に関係しており，薬剤耐性が必ずしも重大な臨床結果につながるわけではないことを示している．

Emergence of clindamycin-resistant *Streptococcus pyogenes* isolates obtained from patients with severe invasive infections in Japan
（日本における劇症型溶血レンサ球菌感染症患者から分離されたクリンダマイシン耐性*Streptococcus pyogenes*の検出）

池辺忠義，和田昭仁（国立感染研），小黒祐子（福島衛研），緒方喜久代（大分衛研），勝川千尋（大阪衛研），磯部順子，嶋　智子（富山衛研），鈴木理恵子，大屋日登美（神奈川衛研），富永　潔(山口衛研)，奥野ルミ，内谷友美（東京都安全センター），渡辺治雄（国立感染研），「溶血レンサ球菌レファレンスシステムセンター」，Jpn. J. Infect. Dis.，**63**(4)，304-305（2010）

A群溶血レンサ球菌*Streptococcus pyogenes*（group A Streptococcus［GAS］）は，最も一般的なヒトの病原体の一つである．1980年代後半以来，GASによって引き起こされた劇症型溶血レンサ球菌感染症は，深刻な問題となっている．治療には，多量のペニシリンとクリンダマイシンの併用療法が用いられている．

本研究では，2005～2009年の間に劇症型A群溶血レンサ球菌感染症の患者から分離された*S. pyogenes* 209株の薬剤感受性試験（微量液体希釈法）を実施した．その結果，209株すべてがアンピシリンとペニシリンGに感受性であった．一方で，209株中14株がクリンダマシン耐性であり，耐性率は2005～2008年には6％未満であったが，2009年には15.4％にまで増加した．耐性を示した14株のうち9株が*emm*28型，3株が*emm*12型および2株が*emm*75型であった．この14株中9株（64.2％）は，tetM遺伝子を保有していた．日本における劇症型溶血レンサ球菌感染症患者から分離されたクリンダマイシン耐性のGASの出現は，治療にクリンダマイシン以外の薬剤開発の必要性を示している．

Surveillance of severe invasive group G streptococcal infections in Japan during 2002-2008
（2002～2008年の日本における劇症型G群溶血レンサ球菌感染症サーベイランス）

池辺忠義（国立感染研），小黒祐子（福島衛研），緒方喜久代（大分衛研），勝川千尋（大阪公衛研），磯部順子，嶋　智子（富山衛研），鈴木理恵子，大屋日登美（神奈川衛研），富永　潔（山口環保研），奥野ルミ（東京都健康安全センター），内谷友美（東京都健康安全センター），多田有希，岡部信彦，渡辺治雄（国立感染研），「溶血レンサ球菌レファレンスシステムセンター」，Jpn. J. Infect. Dis.，**63**（4），372-375（2010）

2002～2008年の間に劇症型溶血レンサ球菌感染症患者から分離されたG群溶血レンサ球菌株について調査し，日本における1995～2001年の出現率と比較した．どちらの期間においてもstg485，stg6792，stc36，stg6およびstg652遺伝子型の菌株が分離された．様々な新しい遺伝子型が出現し，1995～2001年の間に現れたいくつかの遺伝子型は2002～2008年の間には出現しなかった．このことは，劇症型レンサ球菌の流行菌株の遺伝子型の変化を示している．

Degradation behavior of β-carotene during cultivation of cyanobacteria
（ラン藻類の培養におけるβ-カロテンの分解挙動）

原田健一，長谷川真照，福島直子，藤瀬大輝（名城大），西澤明人（茨城大），辻　清美（神奈川衛研），
J. Res. Insti. Meijo Univ.，**9**，83-91（2010）

ラン藻類はカビ臭化合物であるジェオスミン等の揮発性化合物（VOC）を産生するが，最近*Microcystis* 属のラン藻が特徴的なVOCを産生することが明らかとなっている．これらの化合物はラン藻類の光合成色素の一つであるβ－カロテンの代謝産物と考えられており，本研究では*Microcystis* 属を含む各種ラン藻類を抽出し，HPLCおよびLC/MSを用いることによりVOC以外のβ－カロテン代謝産物の生産挙動を調べた．その結果，全てのラン藻の抽出液からレチナールおよびβ－カロテンが検出された．*Microcystis* 属のラン藻類のβ－カロテン生産挙動を考察すると，成長期に多量に生産したβ－カロテンはcarotenoido cleavage dioxybenase（CCD）等の酵素により開裂を受け，β-シクロシトラール等に代謝される。衰退期になるとこれらを細胞外へ放出し，β-シクロシトラールは酸化を受け，他のラン藻細胞を溶藻する．これに対して，*Microcystis* 属以外の属ではβ－カロテンを基質とする特徴的な代謝産物は検出されず，CCDの酵素活性が低いことが推測された．

Analytical aspects of cyanobacterial volatile organic compounds for investigation of their production
（ラン藻類が産生する揮発性化合物の分析）

藤瀬大輝（名城大，川崎市水道），辻　清美（神奈川衛研），福島直子，河合浩平，原田健一（名城大），
J. Chromatogr. A.，**1217**，6122-6125（2010）

自然界での揮発性化合物の役割を明らかにするために，分析法について検討した．β-ionon，β-cyclocitral，2-methyl-1-butanol，3-methyl-1-butanolにgeosminと2-MIBを加えて同時分析を行った．既知の方法を改良して分析を行ったところ，3-methyl-1-butanolのSIMクロマトグラムにはショルダーピークが見られた．GC/MSの分析条件を最適化したところ，2つのピークが分離し，1つは3-methyl-1-butanolであった．*Microcystis* 属は常に，この2つの化合物を産生し，溶藻したラン藻類から検出された．β-cyclocitralは容易に酸化され，酸化物として2,6,6-trimethylcyclohexene-1-carboxylic acidを産生した．この酸によるストレスのため，ラン藻類の青色化が起こることが判明した．

思春期の薬物汚染とインターネット

小島 尚，宮澤眞紀（神奈川衛研），中路重之（弘前大院），思春期学，**28**，273-279（2010）

大麻や合成麻薬MDMA等の乱用薬物が大学生等の若年層を中心に増加している．大麻や覚せい剤のように快感や多幸感を目的とした新規薬物や幻覚植物が海外から流入し，未処理大麻種子の流通も問題になっている.これらの化学物質や植物等はインターネットで簡単に入手できることから，これらがハードドラッグへの入門薬になることが懸念されている．そこで，青少年を取り巻く薬物の実態やその課外について解説した．

Behavioral and rewarding effects of methylone, an analog of MDMA in mice
（MDMAの類縁体であるメチロンの行動毒性および依存性に対する影響について）

宮澤眞紀，小島 尚（神奈川衛研），中路重之（弘前大院），Hirosaki Med. J.，62，57-71（2011）

合成麻薬MDMAのdesigner drugであるmethyloneの危害性を明らかにするためにマウスによる行動毒性及び場所嗜好性(CPP) 試験を行った．さらに，ΔFosBの免疫組織学的検討をおこない，ΔfosB mRNA発現量を定量的PCRで確認した．その結果，methyloneによる運動量及び行動の質的変化は，MDMAよりmethamphethamineに類似していた．さらにmethyloneではCPP試験で依存性が確認され，組織学的にも報酬系回路の側坐核でΔFosBのタンパクとmRNAの有意な増加が確認された．以上より，methyloneは向精神作用を有する依存性薬物である可能性が示された．

特定原材料検査（卵・乳）における新・旧検査方法の比較

渡邊裕子（神奈川衛研），赤星千絵（川崎市衛研），濟田清隆（横浜市衛研），関戸晴子（神奈川衛研），橋口成喜（川崎市衛研），渡部健二朗（横浜市衛研），田中幸生（川崎市衛研），食品衛生学雑誌，52(1)，71-77（2011）

平成15から19年の県内アレルギー物質（卵・乳）調査・検査の結果，ELISA法変更前の卵の検出率は約20%，乳は約30%となり，変更後の平成17年では卵の検出率は約10%上がり，乳では約半分となった．10μg/g以上の陽性検体は卵4検体，乳4検体であり，これらは製造所のコンタミネーションと原材料表示の欠落が原因であった．一方，平成21年の注意喚起表示の調査ではコンタミネーションのレベルは低かった．同一サンプルを用いた新・旧検査方法の検出率の比較では，新検査法の卵の検出率は向上した．乳ではELISA法の検出率は低下したが，ウエスタンブロット法との整合性は向上した．一方，オボムコイドとカゼインの定性検査ではタンパク質量が5μg/g以下で判定不能となる場合がみられた．

タミフルの相模川水系河川水中における分布

上村　仁，仲野富美，近内美乃里，三宅裕子，長谷川一夫（神奈川衛研），環境化学，20(3)，269-272（2010）

相模川水系河川水について固相抽出LC/MS/MS法によりタミフル濃度の測定を行った．2010年1月に採水した試料ではタミフル濃度の高い支川水の流入の影響を受けて，相模川本川水のタミフル濃度は流下と共に増加する傾向が見られた．服用されたタミフルが未代謝のまま排泄され，生活排水と共に河川水に放出されたものと考えられた．寒川町の採水地点において採水され，抽出後保存されていた試料について，2006年9月まで遡ってタミフル濃度の推移を測定した結果，タミフル濃度は県内の定点医療機関当たりのインフルエンザ患者数の推移に約1ヶ月遅れで良く追随していた．

いわゆる「ホスピタルダイエット」類似製品におけるGC-MS法及びLC-MS-MS法を用いた含有医薬品成分の分析

熊坂謙一、宮澤眞紀、松阪綾子、麻生順子、小島　尚（神奈川衛研），CHROMATOGRAPHY，31(2)，77-86（2010）

インターネット上では「ホスピタルダイエット」などとして販売されている，痩身目的のサプリメントに酷似した6種類の錠剤及び2種類のカプセル剤について，含有する医薬品成分を分析した．製品分析を行った当時，既に厚生労働省のウェブサイトには類似製品の健康被害情報が製品写真及び検出成分などを含めて掲載されていたことから，製品外観及び刻印などに基づいて，分析を実施した検体のうち5種類の錠剤と1種類のカプセル剤について含有医薬品成分を事前に推定することが可能であった．また，実際に分析を行った結果では，形態学的な検査によって2種類の錠剤より甲状腺末を検出した．さらに，GC-MS 法及びQtrap LC-MS-MS法による機器分析では，甲状腺末が検出された錠剤2種類では甲状腺ホルモンが検出され，さらに，その他の検体より，ビサコジル，ヒドロクロロチアジド，フルオキセチン，ジアゼパム及びフェンテルミンといった計5種類の医薬品成分が検出された．

The use of Morus alba L. (mulberry) and Eucommia ulmoides (Tochu) leaves as functional foods: a promising approach in the management of hyperlipidemia
（高脂肪食給餌ラットにおける桑葉の高脂血症改善効果：脂肪酸酸化の誘導、脂質合成の阻害、酸化ストレスの抑制）

小林征洋，宮澤眞紀，小島　尚（神奈川衛研），J. Trad. Med.，27，225-230（2010）

以前の研究で，桑葉および杜仲葉はメタボリックシンドロームの進行を抑制する効果があることを明らかにした．即ち，桑葉および杜仲葉が脂肪酸酸化を促すことにより，血中トリグリセリドの上昇を抑制し，そのメカニズムとして，主要なフラボノイドであるケルセチンがペ

ルオキシソーム増殖因子活性化受容体（PPAR）のシグナル経路を活性化し，脂質低下を引き起こすことを明らかにした．さらに，桑葉および杜仲葉の用途とこれまでの知見を概説した．

Ameliorative effects of mulberry (Morus alba L.) leaves on hyperlipidemia in rats fed a high-fat diet: Induction of fatty acid oxidation, inhibition of lipogenesis, and suppression of oxidative stress
（機能性食品としての桑葉及び杜仲茶の用途：高脂血症の管理における有望な手段）

小林征洋，宮澤眞紀（神奈川衛研），亀井飛鳥（神奈川科学技術アカデミー），阿部啓子（東大），小島　尚（神奈川衛研），Biosci. Biotech. Biochem.，**74**，2385-2395（2010）

7週間高脂肪食と桑葉を投与したラットにおける桑葉の効果を検討した．その結果，桑葉投与によって血中トリグリセリドおよび非エステル化脂肪の上昇が有意に抑制された．また，肝臓中の全遺伝子発現解析から，上記効果は脂肪酸酸化の亢進によることが判明した．さらに，この作用が脂質代謝関連遺伝子の発現制御を担う核内転写因子の活性化による可能性を見出した．

Bulletin of Kanagawa Prefectural Institute of Public Health（Bull. Kanagawa Ins. of P.H.）is an official periodical on reseach works at Kanagawa Prefectural Institute of Public Health and is publishued, as a rule, annually. All communications relating to the publication should be addressed to the Editorial Board.

Editorial Board
KANAGAWA PREFECTURAL INSTITUTE OF PUBLIC HEALTH
1 － 3 － 1 Shimomachiya, Chigasaki 253-0087
JAPAN

Bulletin
of
Kanagawa Prefectural Institute of Public Health
No.41 (September, 2011)

CONTENTS

KANAGAWA PREFECTURAL INSTITUTE OF PUBLIC HEALTH
1－3－1 Shimomachiya, Chigasaki 253-0087
JAPAN