

神奈川県衛生研究所研究報告

第42号（平成24年9月）

目次

総説

- 古くて新しい病気 — つつが虫病 —
古屋由美子…………… 1

短報

感染症の監視と予防に関する調査研究

- 神奈川県における手足口病，ヘルパンギーナ患者の発生動向および検出ウイルス株の解析
佐野貴子，近内美乃里，近藤真規子，渡邊寿美，齋藤隆行 …… 11

食品と医薬品の安全・安心に関する調査研究

- 高速液体クロマトグラフィー／タンデム質量分析法を用いた穀類加工品中のフザリウム属カビ毒の分析
甲斐茂美，小菅教仁，脇ますみ，岸 弘子 …… 17
- 金属キレートカラム精製法を用いた高速液体クロマトグラフィーによる畜産物中の抗生物質の分析
小菅教仁，脇ますみ，甲斐茂美，岸 弘子 …… 22
- フォトダイオードアレイ検出高速液体クロマトグラフィーを用いた化粧品に配合される防腐剤の一斉分析法の検討
羽田千香子，熊坂謙一，宮澤真紀 …… 27

資料

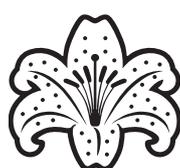
感染症の監視と予防に関する調査研究

- 神奈川県における腸管出血性大腸菌の検出状況（平成23年度）
古川一郎，石原ともえ，渡辺祐子 …… 32
- 神奈川県における細菌性食中毒検出状況（平成22～23年度）
小泉明子，原みゆき，伊達佳美，丹羽加代子 …… 35
- 感染性胃腸炎患者からの原因ウイルス検出状況（平成23年度）
鈴木理恵子，金城恵子，齋藤隆行，古屋由美子 …… 38
- 神奈川県におけるインフルエンザの流行状況（2011/2012シーズン）
渡邊寿美，佐野貴子，近藤真規子，齋藤隆行 …… 42
- 神奈川県におけるつつが虫の発生状況（平成23年度）
鈴木理恵子，金城恵子，片山 丘，齋藤隆行，古屋由美子 …… 45

食品と医薬品の安全・安心に関する調査研究

- 遺伝子組換え食品の分析結果（平成23年度）
大森清美，酒井康宏，関戸晴子，田中由紀子，岸 弘子 …… 49

- 他誌掲載論文抄録（平成23年4月～平成24年3月）…………… 52



県の花：山ゆり

神奈川県衛生研究所研究報告編集員（平成24年度）

編集責任者

奥山裕子（企画調整課長）

深掘靖浩（管理課）

伊東久美子（企画情報部）

鈴木理恵子（微生物部）

稲田貴嗣（微生物部）

岸弘子（理化学部）

宮澤真紀（理化学部）

大塚隆子（地域調査部）

事務局

片山丘（企画情報部）

神奈川県衛生研究所研究報告第42号

平成24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(代)

総説

古くて新しい病気 — つつが虫病 —

古屋由美子

Re-emerging infectious disease - Tsutsugamushi disease -

Yumiko FURUYA

Key Words : *Orientia tsutsugamushi*,
tsutsugamushi disease,
PCR, chigger

はじめに

つつが虫病は古くから特定地域に存在する風土病として知られていた。1946年と1948年に富士山麓で演習中の米軍兵士が原因不明の熱性疾患に感染し、この熱性疾患はそれまでの新潟県、秋田県などのアカツツガムシ媒介による古典型つつが虫病ではなく、流行期が異なる非アカツツガムシ媒介の新型のつつが虫病であることが初めて報告された¹⁾。この新型つつが虫病はその後、伊豆七島¹⁾、房総半島²⁾、四国^{1,3)}などで原因不明熱性疾患として存在していたことが明らかにされた。しかし、この新型つつが虫病も古典型つつが虫病と同様に、1960年代後半には患者が一桁になり、制圧されたと考えられていたが、1976年に急速に増加をはじめ、その後増減があり、現在でも約400名の患者の発生が北海道を除く日本全国で見られている。

つつが虫病は *Orientia tsutsugamushi* を病原体とし、これを保有するツツガムシの幼虫にヒトが刺されることにより、約7～10日後に発病する熱性発疹性疾患で、感染症法に基づく感染症発生動向調査では全数把握の4類感染症となっている。本病は有効な治療薬があり、感染初期に診断さえできれば確実に治る病気であるが、現在でも死亡例が報告されることから、いまだに注意を要する疾患である。

神奈川県でも毎年、県西部地域を中心につつが虫病患

者の発生が見られている^{4,6)}。また本県では1990年から1993年の3年間に神奈川県希少感染症対策事業として、県保健予防課、足柄上保健所、足柄上医師会、衛生研究所が協力してつつが虫病の検査体制の整備、地域の医療機関および住民への啓発を行った⁷⁾。検査体制は従来行なわれていた間接蛍光抗体法 (IF)^{8,9)}による血清診断に加え、1994年から polymerase chain reaction (PCR) によるつつが虫病の遺伝子診断および感染株の遺伝子型別を行うことにより、医療機関に早期に診断結果が報告され、医療現場への検査・研究の還元が行われている。現在でもこの検査体制を実施しており、迅速に診断し適切な治療がなされ、幸にも県内での死亡例はない。このようにつつが虫病を早期に、迅速に確定診断することは重要なことである。

そこで、つつが虫病の病原体、発生状況、感染と症状、診断に用いられている *O. tsutsugamushi* 遺伝子のPCRによる検出や型別、*O. tsutsugamushi* 血清型の多様性、ツツガムシが媒介する *O. tsutsugamushi* 株など国内での分離株やツツガムシの分布状況などについて概説する。

Orientia tsutsugamushi

つつが虫病の病原体は *Rickettsia tsutsugamushi* と命名され、長い間この名称を使用していたが、多村ら¹⁰⁾により、発疹チフス群リケッチア (*R. prowazekii*, *R. typhi*) や紅斑熱群リケッチア (*R. rickettsii*, *R. sibirica*) などのリケッチア属微生物とは多くの点で性状を異にするということから、*Orientia* という新しい属に分類し、*Orientia tsutsugamushi* と改名された。

O. tsutsugamushi の改名について簡単に述べる¹¹⁾。*O. tsutsugamushi* と他のリケッチア属の類似しているところは、グラム陰性菌桿菌 (大きさ0.3～0.5×0.8～2.0 μm)、偏性寄生性細菌であり、発疹を伴う熱性疾患の原因となり、その伝搬にはベクターが必要であるという点である。しかし *O. tsutsugamushi* と他のリケッチア属とは異なる点が多く見いだされた。*O. tsutsugamushi* にはペプチドグリカンやリポ多糖体が欠落し、他のリケッチアと構成タンパク構造に類似性がない。そこで16SrRNA遺伝子について、他のリケッチア属のものと同同性を調べたところ、*O. tsutsugamushi* の6株 (Gilliam, Karp, Kato, Kawasaki, Kuroki, Shimokoshi株) の16SrRNA遺伝子の同同性は98.5%以上で、一つのクラスターを形成した。一方、リケッチア属の4種 (*R. prowazekii*, *R. typhi*, *R. rickettsii*, *R. sibirica*) はそれぞれ98.1%以上の同同性を示して一つのクラスターを形成したが、そのクラスターと *O. tsutsugamushi* のクラスターとの

相同性は90.2~90.5%で両者間に明瞭な距離が認められた。このように*O. tsutsugamushi*と他のリケッチア属との間には各種の差異があり、16SrRNA遺伝子の相同性においてもかなりの開きがあることから、*O.*

*tsutsugamushi*をGenus *Rickettsia*から外し、*Orientia*と言う新たな属名をつけ、*Orientia tsutsugamushi*と改名し、現在この名称が用いられている(表1)。

表1 *Rickettsia*属と*Orientia*属

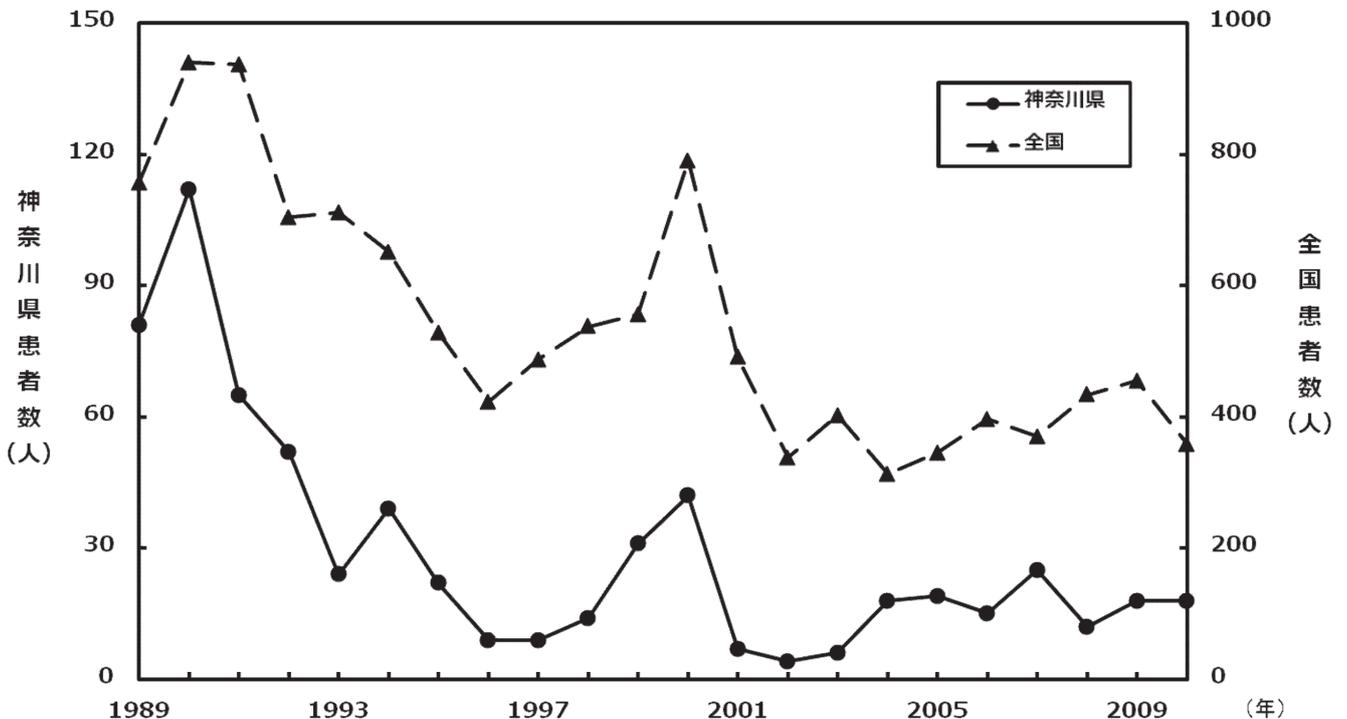
属	群	病原体	疾患名	媒介動物	保有動物	分布
<i>Rickettsia</i>	発疹チフス群	<i>Rickettsia prowazekii</i>	発疹チフス	シラミ	ヒト	世界各地
		<i>R. typhi</i>	発疹熱	ノミ	ネズミ	世界各地
	紅斑熱群	<i>R. rickettsii</i>	ロッキー山紅斑熱	マダニ	マダニ,ウサギ,ネズミ	米国,西半球
		<i>R. sibirica</i>	北アジアマダニチフス	マダニ	マダニ,ネズミ	北アジア
		<i>R. conorii</i>	ボタン熱(地中海紅斑熱)	マダニ	マダニ,イヌ,ネズミ	アフリカ,インド,地中海沿岸
		<i>R. australis</i>	クインズランドマダニチフス	マダニ	有袋類	オーストラリア
		<i>R. akari</i>	リケッチア痘	マウスダニ	マウスダニ,ネズミ	北大西洋沿岸,ロシア
		<i>R. japonica</i>	日本紅斑熱	マダニ	マダニ,ネズミ	日本
		<i>R. africae</i>	African tick-bite fever	マダニ		世界各地
		<i>R. helvetica</i> 等		マダニ		世界各地
<i>Orientia</i>		<i>Orientia tsutsugamushi</i>	つつが虫病	ツツガムシ	ツツガムシ	日本,東南アジア

発生状況

秋田県、山形県および新潟県で夏期にみられた古典型つつが虫病も、日本各地で春期や秋期にみられる新型つつが虫病も、1951年をピークに1960年代後半には発生数が一桁になりほぼ制圧されたと思われていた。しかし1980年代になり各地で新型つつが虫病患者が再び急増し、1984年、1990年、1991年には日本全国で約1000

名の患者発生に至った。その後患者数は徐々に減少する傾向であり、2000年には一時増加がみられたが、再び減少し、現在は毎年約400名の患者が発生している。

神奈川県でも1990年に112名の患者が報告されたが、その後減少傾向を示した。1999年、2000年に増加がみられたが、再び減少し、毎年約10数名から20数名の間を推移する患者発生となっている(図1)⁶⁾。



(全国患者数の1999年3月までは「厚生省伝染病統計」、1999年4月以降は「感染症発生動向調査」より)

図1 つつが虫病患者発生状況

感染と症状

つつが虫病の感染は *O. tsutsugamushi* を保有しているツツガムシの幼虫（体長約0.2mm：図2）が人に吸着し、口吻を通して *O. tsutsugamushi* が注入された時のみ成立し、ヒトからヒトへの感染は起こらない。この



(タテツツガムシ)

(フトゲツツガムシ)

図2 ツツガムシ虫体

感染部位では、局所的に *O. tsutsugamushi* が増殖し、発赤、水泡形成、痂皮化、潰瘍と変化する。この病変部がいわゆる刺し口¹²⁾といわれるもので、普通は一つであるが、まれに複数のこともあり、その出現部位は全身にわたる。しかし多くは柔らかい部位で下腿、陰部にあり、頭髮の中にみられることもある（図3）。



つつが虫病患者体幹部にみられた刺し口（丸印）

図3 つつが虫患者の刺し口

O. tsutsugamushi は刺し口の支配するリンパ節に到達し、リンパ節腫脹を起こし、各所で血管内膜炎を起こす。感染（吸着）後約7～10日後から、全身倦怠、頭痛、食欲不振、関節痛などが起こり、39～40℃の高熱が続き、発熱に少しおぐれて、軀幹、顔面などに、不定形発疹があらわれる。適切な治療が行われないときは、往々にして播種性血管内凝固症候群（DIC）に陥り、多臓器不全などで死亡するおそれもある。治療には現在広く使われている感染症治療薬であるβ-ラクタム系やアミノ配糖体系の薬剤はまったく無効であるが、テトラサイクリン系薬剤かクロラムフェニコールはきわめて有効である。

このようにつつが虫病は感染初期に診断さえできれば確実に治る病気であり、早期診断治療が重要である。

つつが虫病の診断

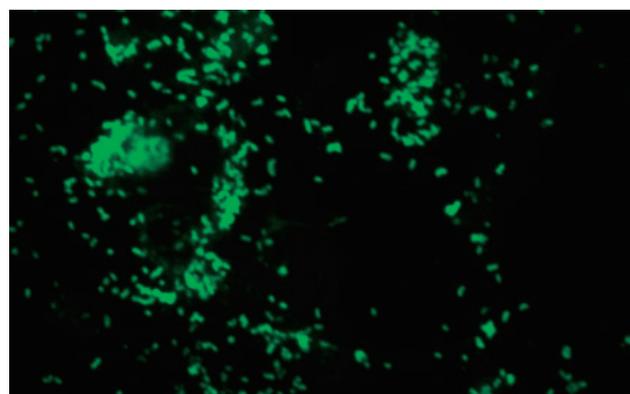
つつが虫病患者の診断は、従来から臨床診断および病原体である *O. tsutsugamushi* の分離同定、*O. tsutsugamushi* の遺伝子検出あるいは患者血清中の特異抗体の検出により行われてきた。*O. tsutsugamushi* の分離同定はマウスや培養細胞（L929細胞、Vero細胞など）（図4）を用いて多くの日数が必要であり、またすべての患者から分離できるわけではなく、迅速診断には適していない。しかし詳細な解析には *O. tsutsugamushi* の分離は必要である。



図4 培養細胞（Vero細胞）

培養細胞を用いた分離同定法について簡単に述べる。患者の急性期血液、剖検の脾臓、肝臓、リンパ節などの材料をホモジナイザーでよくつぶし、あらかじめ用意した培養細胞（L929細胞、Vero細胞など）に接種してリケッチアの増殖を行う。増殖状態や型別は、株特異的なモノクローナル抗体¹³⁾を用いたIFにより調べる。このようにして分離した *O. tsutsugamushi* 株は-80℃に保存し、*O. tsutsugamushi* 株の詳細な解析や他の株と比較解析等に使用する。

迅速診断には *O. tsutsugamushi* 遺伝子検出法あるいはIF（図5）^{8,9)}、間接免疫ペルオキシダーゼ法（IP）^{14,15)}、補体結合反応法（CF）など血清学的方法が主に使われている。

図5 *O. tsutsugamushi* を抗原とした抗体陽性のIF像

1. 血清学的診断

つつが虫病を疑われる患者が発生した場合、患者から血液を採取し、*O. tsutsugamushi* 抗原を用いた血清学的診断を行う。

CFやワイルフェリックス反応は、検出感度や特異性の点で、現在ではあまり利用されておらず、主にIFやIPが血清診断に用いられている。神奈川県内の患者に使用している抗原は、Gilliam, Karp, Kato, Kawasaki, Kurokiの5株である。Shimokoshi株による感染の発生は県内ではまれであるため、これら5株を抗原として抗体検査した後、必要に応じてShimokoshi株を抗原として抗体検査を追加している。これらIFやIPは特異性が高く迅速な方法であるため、現在わが国で流行しているリケッチア症すべての診断に有効である。

著者が行っていたIFの術式を簡単に述べる。IF用の抗原スライドグラスは、培養したGilliam, Karp, Kato, Kawasaki, Kurokiの5株を塗抹し、乾燥後、冷アセトンで固定し、使用まで -20℃以下に保存する。

患者血清を10倍から2倍階段希釈し、乾燥させた抗原スライドグラスに載せ、湿潤箱で37℃1時間反応し、洗浄後、乾燥させる。抗原スライドグラスに蛍光色素標識抗ヒトIgM, IgG抗体を別々に載せ、湿潤箱で37℃40分間反応後洗浄乾燥させる。グリセリン緩衝液で封入し、蛍光顕微鏡で特異蛍光を観察する。

つつが虫病患者における抗体は、感染後7~14日後に認められるが、発症初期の急性期の血清と1~2週間後の回復期の血清を採取し、抗体の有意上昇を確認する必要がある。また確実な診断のためには、IgM抗体とIgG抗体それぞれを測定することが望ましい。急性期の血清

でもIgM抗体が80倍以上あれば陽性と判定できる。

2. 遺伝子診断法

*O. tsutsugamushi*の分離は日数を要するため、迅速診断には不向きである。また血清学的な検査も感染初期には抗体は認められず、迅速な診断は困難なことが多い。しかし発症初期の血液からの*O. tsutsugamushi* 遺伝子を検出する遺伝子診断法は簡便であり迅速診断に効果的である。発症初期の抗凝固剤入り（ヘパリンを除く）血液から直接DNAを抽出する。抽出の方法は各種のキットが市販されているので、その方法に準じて行う。血液から抽出されたDNAを鋳型としてPCRにより、*O. tsutsugamushi* 特異的DNAの増幅を確認する^{16,17}。プライマーは株特異的な抗原決定基と各株に共通な抗原決定基が存在する*O. tsutsugamushi*の56kDaのタンパク質¹³をコードする遺伝子から設計した。

Gilliam株¹⁸とKarp株¹⁹の56kDaのタンパク質をコードする遺伝子の塩基配列より、相同性が高く、約1000 base pair (bp)のDNAの増幅が可能と思われる配列部分を一对選び、プライマー34 (p34) とプライマー55 (p55) を合成した (表2)²⁰。

このp34とp55によって合成されるDNA塩基配列から、Gilliam株とKarp株に変異の著しい領域をはさむように、2株に相同性のある一对のプライマー10 (p10) とプライマー11 (p11) を合成し (表2)、*O. tsutsugamushi* DNA検出のnested PCR (2nd PCR) に用いた。

PCR反応は94℃30秒、57℃2分、70℃2分を30サイクル行う。1st PCRで十分なDNAの増幅ができない場合には、1st PCR後の産物を鋳型にして1st PCRと同じ

表2 プライマー塩基配列

Primer34	5'-TCAAGCTTATTGCTAGTGCAATGTCTGC-3'
Primer55	5'-AGGGATCCCTGCTGCTGTGCTTGCTGCG-3'
Primer10	5'-GATCAAGCTTCCTCAGCCTACTATAATGCC-3'
Primer11	5'-CTAGGGATCCCGACAGATGCACTATTAGGC-3'
PrimerG	5'-CTTTATATCACTATATATCTT-3'
PrimerKP	5'-ACAATATCGGATTTATAACC-3'
PrimerKT	5'-GAATATTTAATAGCACTGGA-3'
PrimerKW	5'-ATGCTGCTATTGATACAGGC-3'
PrimerKR	5'-CACCGGATTTACCATCATAT-3'
PrimerJG1	5'-TATTCTTGCTCAAGCTGCTGC-3'
PrimerJG4	5'-CTGACCATGGTCAAGTATG-3'
PrimerShi1	5'-CTGCCCTTGCCCCTGAACTA-3'
PrimerShi4	5'-CTCAGAAATTTGAACGGA-3'

条件で2nd PCRを行う (図6).

p34とp55による1st PCRの30サイクルで, Gilliam株1003bp, Karp株1030bp, Kato株1003bp, Kawasaki株1003bp, Kuroki株1026bpのPCR産物が増幅され, さらにこれら1st PCRの産物を鋳型としてp10とp11を用いて30サイクルPCRを行ったところ, Gilliam株481bp, Karp株507bp, Kato株495bp, Kawasaki株481bp, Kuroki株501bpのPCR産物が増幅された (図6, 図7). しかし *R. rickettsii*, *R. sibirica*, L929細胞でDNAの増幅は認められなかった. この検出用プライマーにより *O. tsutsugamushi* Gilliam, Karp, Kato, Kawasaki, Kurokiの5株の検出が可能である.

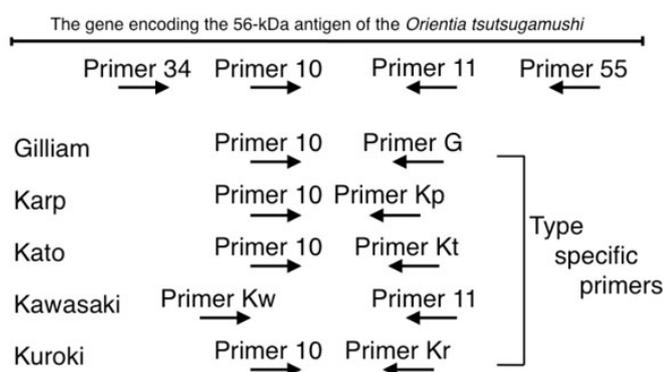


図6 *O. tsutsugamushi* 56kDa抗原タンパク質をコードする遺伝子のプライマー

型別用のプライマーは, *O. tsutsugamushi* Gilliam, Karp, Kato, Kawasaki, Kurokiの5株のDNA塩基配列を比較検討して, それぞれの株に特異的と思われる20bpの配列部分を選別し合成した. Gilliam株特異的なプライマー-Gとp10, Karp株特異的なプライマー-KPとp10, Kato株特異的なプライマー-KTとp10, Kawasaki株特異的なプライマー-KWとp11, Kuroki株特異的なプライマー-KRとp10の5対のプライマーを型別用のプライマーとして2nd PCRを行った²⁰⁾.

p34, p55のプライマーを用いて1st PCRで増幅させた *O. tsutsugamushi* 5株のPCR産物を鋳型として型別用プライマー5対による2nd PCRでGilliam株は407bp, Karp株は230bp, Kato株は242bp, Kawasaki株は523bp, Kuroki株は220bpのそれぞれに特異的なDNAが増幅される. 型別プライマーを使用することにより, 感染株の型別が可能である (図7).

現在, Gilliam株の型別プライマーに改良を加え, 型別の2nd PCRにプライマーJG1, JG4を使用している (表2). これにより, ミャンマーで分離された従来のGilliam株は231bp, 日本国内で分離されたGilliam株は223bpに特異的なDNAが感度よく増幅される²¹⁾.

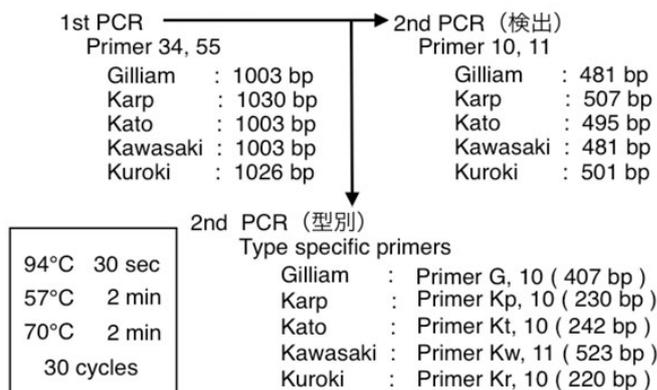


図7 *O. tsutsugamushi* 56kDa抗原タンパク質をコードする遺伝子のプライマーによるnested PCR

これらのPCRは, *O. tsutsugamushi* Gilliam, Karp, Kato, Kawasaki, Kurokiの5株の検出および型別は可能であるが, Shimokoshi株は検出できない. Shimokoshi株も検出できるプライマーの検討が必要である. そこで, Shimokoshi株の56kDaのタンパク質をコードする遺伝子の塩基配列を検討し, Shimokoshi株のみ検出するプライマーを作製した (表2). 1st PCRに従来のp34とプライマー-Shi1, 2nd PCRに従来のp10とプライマー-Shi4を使用することにより, Gilliam, Karp, Kato, Kawasaki, Kurokiの5株は増幅されず, Shimokoshi株のみ436bpに特異的なDNAが増幅される²²⁾. 従来法で *O. tsutsugamushi* DNAが検出されない場合は, 適宜このプライマーを使用し, Shimokoshi株を検出することが可能である.

PCRでは発症初期で抗体が検出される以前からでも, 病原体遺伝子を検出することが可能であり, 迅速診断に適している. また臨床的に典型的なリケッチア症を示しながら, 特異抗体の上昇が悪い症例²³⁾や発症初期の血液しか採取できなかった症例から *O. tsutsugamushi* 特異的DNAを検出できることもある. -20°C以下に保存した血液, 剖検材料, ホルマリン保存した臓器さえあれば, *O. tsutsugamushi* に特異的なプライマーを用いてPCRにより極めて効率よく病原体の特定が可能である. また急性期に血清しか保存していない場合に遺伝子検査が不可能であったが, 痂皮を検査材料にして, 遺伝子検査が可能である²⁴⁾. 痂皮は比較的長く皮膚に存在するので, 回復期でも採取できる (表3).

またPCRは *O. tsutsugamushi* を媒介するツツガムシ一虫体から *O. tsutsugamushi* 遺伝子を直接検出することが可能である. 神奈川県で *O. tsutsugamushi* 陽性のツツガムシコロニー (ホットスポット) の調査を実施したところ, タテツツガムシからPCRで *O. tsutsugamushi* 遺伝子が検出され, ホットスポットの広

表 3 IFとPCRの結果

採血日	IF抗体価										PCR	
	Gilliam		Karp		Kato		Kawasaki		Kuroki		血液	痂皮
	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG		
5月 2日	320	<10	640	<10	160	<10	40	<10	320	<10	+(Karp)	
5月 7日	2560	40	5120	320	5120	40	1280	20	5120	80	-	
5月11日	5120	80	10240	640	2560	320	640	80	5120	320	-	+(Karp)

がりは半径約0.5mの円状であることが示された⁷⁾。このようにPCRは*O. tsutsugamushi*陽性のツツガムシを短時間にかつ感度よく検出でき、つつが虫病の予防対策に有効に利用できる。

神奈川県内で2001年から2010年の10年間につつが虫病を疑われた患者220名についてIFによる血清抗体検出とPCRによる*O. tsutsugamushi*遺伝子の検出により確定診断を行った(表4)。IFのみ陽性となったもの23名、IFとPCRにより陽性となったもの107名、PCRのみ陽性12名、合計142名がつつが虫病患者と確定診断された⁶⁾。

IFとPCRを併用することにより、IFで判定できなかった例やPCRでDNAが検出されない例についても診断が可能であった。このように確定診断にはIFとPCRの併用は有効である。

表 4 神奈川県のIFAおよびPCRによるつつが虫病患者数

年	検体数	陽性数			確定患者数
		IFAのみ	IFAおよびPCR	PCRのみ	
2001	10	0	7	0	7
2002	7	1	3	0	4
2003	13	1	4	1	6
2004	24	5	13	1	19
2005	25	5*	13	0	18
2006	24	4	11	0	15
2007	34	2	20	3	25
2008	25	1	9	2	12
2009	35	2*	12	4	18
2010	23	2	15	1	18
合計	220	23	107	12	142

※：血清検査のみの検体を含む

血清型の多様性

O. tsutsugamushi は血清学的に抗原性が異なるGilliam, Karp, Kato株が標準株として知られている。国内でKawasaki²⁵⁾, Kuroki²⁶⁾, Shimokoshi²⁷⁾株が分離され、これらは標準3株とは異なる血清型を示した。国内で検出される*O. tsutsugamushi*を血清型別するとGilliam, Karp, Kato, Kawasaki, Kuroki, Shimokoshi型の6種類に分けられる。国内の患者から分離される株はGilliam, Karp, Kawasaki, Kuroki株がほとんどで、Kato株は過去に多く分離されたが、最近ではほとんど分離されていなかった。しかし2008年に15

年ぶりに、秋田県でKato株感染による患者が血清学的に確認された²⁸⁾。さらに2009年にはアカツツガムシの存在も確認された²⁹⁾。

またShimokoshi株は1984年に1例分離が報告され、その後血清診断や遺伝子診断でShimokoshi株に感染したと確認された例は、秋田県、福井県、福島県、山形県、新潟県でみられている³⁰⁾。

多村ら^{11,31)}は分離株の56kDaタンパク質をコードする遺伝子の解析から、日本で分離されたGilliam株とKarp株は、標準株とは異なるJapanese Gilliam type (JG型), Japanese Karp type1とtype2 (JP-1型, JP-2型)とし、標準株とは区別している。日本国内で分離された株は大きく分けるとJG型, JP-1型, JP-2型, Kato型, Kawasaki型, Kuroki型, Shimokoshi型, その他にLX-1型, Fujii型があると報告している。

国内での株の分布状況は、九州、東海や関東地方にKawasaki株とKuroki株が多く、東北地方では、Gilliam株とKarp株が多い。最近、秋田県ではKato株が確認された。これらの感染株は媒介するベクターの種類によると思われる。Gilliam, Karp株はフトゲツツガムシの生息する地域にみられ、Kawasaki, Kuroki株はタテツツガムシが生息する地域、Kato株はアカツツガムシが生息する地域に見られる。

京都北部で発生した患者の血清抗体価からGilliam株による感染が確認され、この地域からフトゲツツガムシが確認されている³²⁾。また最近山形県でKawasaki株やShimokoshi株の感染が血清学的に確認され、患者感染推定地域ではタテツツガムシも再確認されている³³⁾。

2008年に沖縄県宮古市池間島でつつが虫病患者の発生が確認され、その後2011年までに4名の患者発生となったが、感染株は台湾系Gilliam株に近縁であることが示された³⁴⁾。

神奈川県内で2001年から2010年の10年間につつが虫病と確認された患者の感染株を表5に示した。患者119名はKarp株9名(7.6%), Kawasaki株89名(74.8%), Kuroki株21名(17.6%)であり、その大部分はKawasaki株であることが確認され、過去の結果と同じ傾向であった³⁵⁾。2010年の患者の発生地域と感染株を

図8に示した。感染地域は南足柄市と足柄上郡山北町に集中しており、感染株であるKawasaki株とKuroki株は発生地域に混在していた。神奈川県ではつつが虫病の発生は秋がほとんどで、なかでも11月に集中している。しかし2005年3月に患者が1名確認され、神奈川県内で春に患者発生が確認された珍しい例であった。この例は遺伝子診断ができず、ペア血清による抗体価でも5株すべてに有意上昇があり、感染株は不明であった。

日本周辺では、韓国、タイ、マレーシアなど東南アジアで、つつが虫病 (scrub typhus) 患者が確認されている。韓国ではBoryong株が分離されている。多村¹¹⁾はこの株の56kDaタンパク質をコードする遺伝子の塩基配列からこの株はKuroki株に近縁であると報告している。

表5 神奈川県で感染した患者感染株の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	13	2
合計	119	9 (7.6)	89 (74.8)	21 (17.6)

()内はパーセンテージ

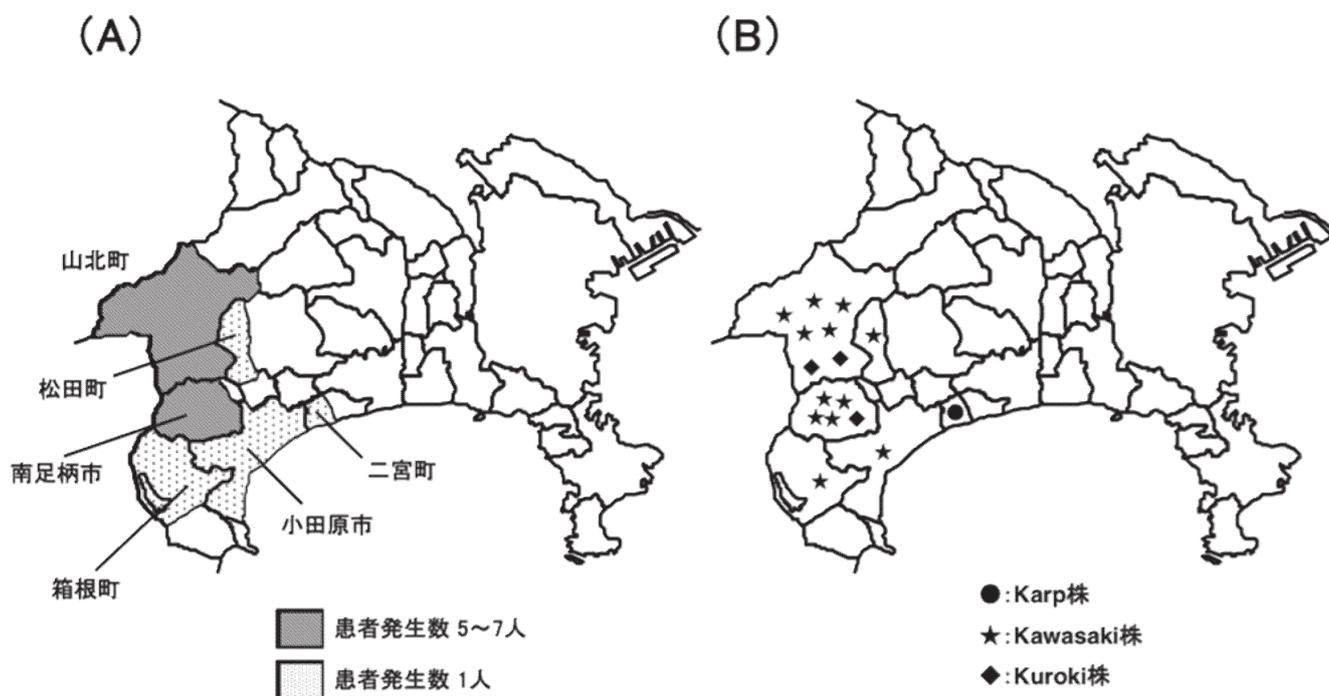


図8 つつが虫病発生地域と感染株 (2010年)

著者は韓国国内で感染し、神奈川県内で発症した患者から *O. tsutsugamushi* を分離したところ、Kuroki株特異的なモノクローナル抗体と反応したことからKuroki型であることを確認している。これらのことからKuroki型の株は日本だけではなく韓国にも存在していることが示された。

しかし東南アジアで分離されている株は、日本国内分離株とは異なっており、*O. tsutsugamushi* を媒介するツツガムシも異なっている¹¹⁾。

ツツガムシ種と血清型

ツツガムシの中で *O. tsutsugamushi* を保有している

ことが報告されているのは、アカ、フトゲ、タテ、ムロト、トサ、キタサト、ヒゲ、カワムラ、ホッコク、サダスクなどである³⁶⁾。これらのツツガムシのうちヒトに寄生し、さらに *O. tsutsugamushi* を保有する状況と考え合わせると、日本で *O. tsutsugamushi* を伝搬する主力は、アカツツガムシ、フトゲツツガムシ、タテツツガムシの3種にしばられる。しかし3種のツツガムシの媒介する *O. tsutsugamushi* 保有率には差がある。感染地と推定された場所での調査では、大雑把ではあるが *O. tsutsugamushi* の保有率はアカツツガムシが1/100、フトゲツツガムシ1/100から1/500、タテツツガムシ1/3000から1/3500である³⁷⁾。また多村らは新たにアラ

トツツガシ、フジツツガムシから *O. tsutsugamushi* を分離したと報告している¹¹⁾。

これらツツガムシから分離された *O. tsutsugamushi* の型はフトゲツツガムシから、JG型、JP-2型、アラトツツガムシからJP-1型、アカツツガムシからKato型、タテツツガムシからKawasaki型、フジツツガムシからFuji型であり、Shimokoshi型、LX-1型を媒介するツツガムシ種は不明である¹¹⁾。またフジツツガムシについてはヒトへの寄生性は不明である。

ツツガムシの国内の分布状況を見ると、九州、東海、関東地方ではタテツツガムシが優勢であり、東北地方はフトゲツツガムシが優勢であることが知られている。しかし前述したように山形県ではタテツツガムシが³³⁾、京都北部ではフトゲツツガムシが³²⁾、秋田県ではアカツツガムシが2009年に確認され、さらにアカツツガムシ生息地域で捕獲した野ネズミからKato株が分離されている²⁹⁾。

神奈川県つつが虫病発生地域でのツツガムシの調査では、タテツツガムシの野ネズミへの寄生は10月からみられ、11月をピークに4月まで確認でき、その平均寄生数はおよそ300匹から700匹もあり、この地域での優勢ツツガムシであると思われる。一方、フトゲツツガムシも10月からみられ、12月をピークに5月まで野ネズミへ寄生が確認されるが、その平均寄生数はおよそ30匹から40匹と少ない³⁸⁾。神奈川県ではタテツツガムシが媒介するKawasaki型やKuroki型の *O. tsutsugamushi* が主に検出されている。

東南アジアでのつつが虫病 (scrub typhus) は *Leptotrombidium fletcheri*, *L. arenicola*, *L. deliense* が媒介種であることが知られており、3種のツツガムシが媒介する株は日本国内で分離された株とは異なることが報告されている¹¹⁾。これらのツツガムシは日本国内では存在しないと思われていた。しかし *L. deliense* が最近沖縄県宮古市池間島で見つかっており、野ネズミや野ネズミに付着していた *L. deliense* から *O. tsutsugamushi* が検出されている³⁴⁾。今後国内の実態調査により他のツツガムシ種の存在も確認される可能性もあり、さらなる調査が望まれる。

おわりに

つつが虫病は有効な抗菌剤治療薬があり、確実に治療できるにもかかわらず、2001年から2009年に青森県、新潟県、福島県から3例ずつ、山形県から2例、岩手県、京都府、島根県、鳥取県から1例ずつの計15例の死亡例報告がある³⁹⁾。つつが虫病による死者をなくすためには患者が早期に受診し、医療関係者が早期診断・治療を

行うことが必要であり、そのための有効かつ素早い情報提供などが行えるシステム作りが望まれる。

PCRを利用した *O. tsutsugamushi* の検出や型別はつつが虫の迅速診断に有効な方法であり、さらに免疫学的方法を組み合わせることにより、つつが虫の診断および予防に寄与できるものと思われる。

一方、つつが虫の患者発生は減少傾向にあるが、これは従来患者発生の多かった九州地区での患者発生の減少もその一因である。しかし患者減少の明確な理由は不明であり、ツツガムシが生育できる環境の変化によることも考えられる。今後環境の変化とともに、つつが虫病が制圧されるか再燃するか、注目していきたい。

謝 辞

稿を終えるにあたり、つつが虫の診断法の確立やツツガムシの採取など、多大な貢献をいただいた片山 丘博士、稲田貴嗣主任研究員に深謝します。

(平成24年8月1日受理)

文 献

- 1) 笠原四郎：リケッチア病研究の歩み、ウイルス、**28**, 5-23 (1978)
- 2) 小田常治, 大溝晴央, 田口豊介：千葉県南部における恙虫病並びに発疹熱について、日本医事新報, N o.1884, 35-41 (1958)
- 3) 佐々 学：恙虫と恙虫病, pp1-479, 医学書院, 東京 (1956)
- 4) 吉田芳哉, 古屋由美子, 原みゆき, 小田和正, 松岡道子, 森久保勝行ほか：最近神奈川県で多発している恙虫病の疫学的検討, 神奈川衛研報告, **20**, 1-7 (1990)
- 5) 片山 丘, 古屋由美子, 吉田芳哉, 小田和正, 松岡道子, 河西悦子ほか：神奈川県における恙虫病の血清学的解析, 神奈川衛研報告, **21**, 1-6 (1991)
- 6) 片山 丘, 鈴木理恵子, 齋藤隆行, 古屋由美子：神奈川県におけるつつが虫の発生状況 (平成22年度), 神奈川衛研報告, **41**, 44-47 (2011)
- 7) 神奈川県衛生部保健予防課：神奈川県希少感染症対策事業実施報告書 (1993)
- 8) Kawamura, A. Jr.: Fluorescent antibody techniques and their application. 2nd Ed. pp1-292, University of Tokyo Press, Tokyo and University Park Press, Baltimore and London (1977)
- 9) 山本正悟：つつが虫の臨床と診断, 血清診断の各種—その特性と評価, 蛍光抗体法, 臨床とウイルス,

- 12, 270-274 (1984)
- 10) Tamura, A., Ohashi, N., Urakami, H. and Miyamura, S.: Classification of *Rickettsia tsutsugamushi* in a new genus, *Orientia* gen. nov., as *Orientia tsutsugamushi* comb. nov., Int. J. syst. Bacteriol., **45**, 589-591 (1995)
 - 11) 多村 憲：恙虫病病原体 *Orientia tsutsugamushi* の微生物学, 日本細菌誌, **54**, 815-832 (1999)
 - 12) 須藤恒久：新しい臨床検査—進歩する情報への対応—, 臨床医, **15**, 408-412 (1989)
 - 13) Furuya, Y., Yamamoto, S., Otu, M., Yoshida, Y., Ohashi, N. and Murata, M. et al: Use of monoclonal antibodies against *Rickettsia tsutsugamushi* Kawasaki for serodiagnosis by enzyme-linked immunosorbent assay, J. clin. Microbiol., **29**, 340-345 (1991)
 - 14) 須藤恒久：我が国における最近のつつが虫の現状と早期迅速診断法—特に免疫ペルオキシダーゼ反応による三型IgG, IgMの完全同時測定法について—, 臨床とウイルス, **11**, 25-28 (1983)
 - 15) Suto, T.: Rapid and accurate serologic diagnosis of Tsutsugamushi disease in Japan employing the immunoperoxidase reaction, in *Rickettsiae and Rickettsial Disease*, pp.444-452, ed. J. Kazar, Bratislava (1985)
 - 16) Furuya, Y., Yoshida, Y., Katayama, T., Kawamori, F., Yamamoto, S. and Ohashi, N. et al.: Specific amplification of *Rickettsia tsutsugamushi* DNA from clinical specimens by polymerase chain reaction, J. Clin. Microbiol. **29**, 2628-2630 (1991)
 - 17) 片山 丘, 古屋由美子, 原みゆき, 佐藤利明, 吉田芳哉：PCRによる恙虫病患者の遺伝子診断, 神奈川衛研報告, **22**, 1-6 (1992)
 - 18) Ohashi, N., Nashimoto, H., Ikeda, H. and Tamura, A.: Cloning and sequencing of the gene(tsg56) encoding a type-specific antigen from *Rickettsia tsutsugamushi*, Gene, **91**, 119-122 (1990)
 - 19) Stover, CK., Marana, D. P., Carter, J. M., Roe, B. A., Mardis, E. and Oaks, E. V.: The 56-kilodalton major protein antigen of *Rickettsia tsutsugamushi*: Molecular cloning and sequence analysis of the sta56 gene and precise identification of a strain-specific epitope, Infect. Immun., **58**, 2076-2084 (1990)
 - 20) Furuya, Y., Yoshida, Y., Katayama, T., Yamamoto, S. and Kawamura, A. Jr.: Serotype-specific amplification of *Rickettsia tsutsugamushi* DNA by nested polymerase chain reaction, J. Clin. Microbiol, **31**, 1637-1640 (1993)
 - 21) 古屋由美子, 片山 丘：神奈川県におけるリケッチア症患者の発生状況の把握及び *Orientia tsutsugamushi* 型別PCRの検討, 厚生労働科学研究費補助金, 新興・再興感染症研究事業, リケッチア感染症の国内実態調査及び早期診断体制の確立による早期警鐘システムの構築, 平成18年度総括・分担研究報告書, 71-77 (2007)
 - 22) 古屋由美子, 片山 丘, 宮原香代子, 原田美樹：神奈川県におけるリケッチア症患者の発生状況の把握及び *Orientia tsutsugamushi* Shimokoshi株検出PCRの検討, 厚生労働科学研究費補助金, 新興・再興感染症研究事業, リケッチア感染症の国内実態調査及び早期診断体制の確立による早期警鐘システムの構築, 平成20年度総括・分担研究報告書, 123-127 (2009)
 - 23) 古屋由美子, 片山 丘, 原みゆき, 吉田芳哉, 海保郁男, 川村明義：抗体の上昇が認められず、PCRにより確定診断された恙虫病患者, 感染症誌, **71**, 474-476 (1997)
 - 24) 古屋由美子, 片山 丘, 宮原香代子, 原田美樹：神奈川県におけるリケッチア症患者の発生状況の把握及び東海関東以北地域におけるリケッチア症検査体制について, 厚生労働科学研究費補助金, 新興・再興感染症研究事業, リケッチア感染症の国内実態調査及び早期診断体制の確立による早期警鐘システムの構築, 平成19年度総括・分担研究報告書, 73-77 (2008)
 - 25) Yamamoto, S., Kawabata, N., Tamura, A., Urakami, H., Ohashi, N. and Murata, M. et al.: Immunological properties of *Rickettsia tsutsugamushi*, Kawasaki strain, isolated from a patient in Kyusyu, Microbiol. Immunol., **30**, 611-620 (1986)
 - 26) Ohashi, N., Tamura, A., Sakurai, H. and Yamamoto, S.: Characterization of a new antigenic type, Kuroki, of *Rickettsia tsutsugamushi* isolated from a patient in Japan, J. Clin. Microbiol., **28**, 2111-2113 (1990)
 - 27) Tamura, A., Takahashi, K., Tsuruhara, T., Urakami, H., Miyamura, S. and Sekikawa, H. et al.: Isolation of *Rickettsia tsutsugamushi*

- antigenically different from Kato, Karp and Gilliam strains from patients, *Microbiol. Immunol.*, **28**, 873-882 (1984)
- 28) 佐藤寛子, 國生泰範, 柴田ちひろ, 斎藤博之, 齊藤志保子, 藤田博己ほか: 秋田県において15年ぶりに確認された古典型つつが虫病の1例, *感染症誌*, **84**, 454-456 (2010)
- 29) 佐藤寛子, 柴田ちひろ, 佐藤了悦, 斎藤博之, 安部真理子, 齊藤志保子ほか: 夏季の古典型つつが虫病症例と感染推定地域におけるツツガムシの生息状況調査-秋田県, *病原微生物検出情報*, **31**, 123-124 (2010)
- 30) 金子紀子, 瀬戸順次, 安孫子千恵子, 青木敏也, 大谷勝実: 山形県のつつが虫病患者発生状況 (Kawasaki型、Shimokoshi型症例を中心に), *病原微生物検出情報*, **31**, 124-125 (2010)
- 31) Enatsu, T., Urakami, H. and Tamura, A.: Phylogenetic analysis of *Orientia tsutsugamushi* strains based on the sequence homologies of 56-kDa type-specific antigen genes, *FEMS Microbiology Letters*, **180**, 163-169 (1999)
- 32) Takahashi, M., Misumi, H., Urakami, H., Nakajima, S., Furui, S. and Yamamoto, S. et al.: Mite vectors (Acari: Trombiculidae) of Scrub Typhus in a new endemic area in northern Kyoto, Japan, *J. Med. Entomol.*, **41**, 107-114 (2004)
- 33) 藤田博己, 溝口二郎, 高田伸弘: 山形県で再確認されたタテツツガムシについて, *大原総合病院年報*, **46**, 27 (2006)
- 34) 北野智一, 平良勝也, 岡野 祥, 角坂照貴, 藤田博己, 高田伸弘ほか: 宮古島の恙虫病に関する調査-池間島のネズミとツツガムシから検出された病原体-, *大原総合病院年報*, **51**, 86-87 (2011)
- 35) 吉田芳哉, 古屋由美子, 片山 丘, 海保郁男, 山本正悟: Nested PCRによる *Rickettsia tsutsugamushi* DNA の検出と型別, *感染症誌*, **68**, 601-606 (1994)
- 36) Tamiya, T.: Recent advances in studies of Tsutsugamushi disease in Japan. pp1-309, Medical Culture Inc., Tokyo (1962)
- 37) 川村明義: リケッチア症 - 特につつが虫病について-, *モダンメディカ*, **30**, 310-339 (1984)
- 38) 稲田貴嗣: ツツガムシ類幼虫の季節消長, *大原総合病院年報*, **41**, 47 (1998)
- 39) 国立感染症研究所感染症情報センター: 特集つつが虫病・日本紅斑熱2006~2009, *病原微生物検出情報*, **31**, 120-122 (2010)

短報

神奈川県域における手足口病、ヘルパンギーナ患者の発生動向および検出ウイルス株の解析

佐野貴子¹, 近内美乃里², 近藤真規子¹,
渡邊寿美¹, 齋藤隆行^{1*}

Epidemiological and virological studies of hand, foot and mouth disease and herpangina cases in Kanagawa Prefecture

Takako SANO, Minori KONNAI, Makiko KONDO,
Sumi WATANABE and Takayuki SAITO

はじめに

手足口病およびヘルパンギーナは、乳幼児を中心に流行するウイルス性疾患であり、毎年流行のピークが夏季に出現する。手足口病は口腔粘膜および手や足などに現れる水疱性発疹を主症状とし、コクサッキーウイルスA16型 (CA16)、コクサッキーウイルスA10型 (CA10) またはエンテロウイルス71型 (EV71) の感染が主な病因となっている¹⁾。ヘルパンギーナは口腔粘膜に現れる水疱性発疹と発熱を特徴とする急性ウイルス性咽頭炎であり、流行性なのはA群コクサッキーウイルスによる感染が主な病因となっている²⁾。どちらの疾患も年によって流行するウイルスが入れ替わり、流行規模にも違いが見られる。

今回、神奈川県域（横浜市、川崎市、横須賀市、相模原市および藤沢市を除く：以下、県域と略）における手足口病およびヘルパンギーナ患者の発生動向および患者検体から2003～2011年の間に検出されたウイルス株について解析を行ったので報告する。

方法

1. 患者発生動向調査

神奈川県感染症情報センターにおいて「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律」に基づいて行われている感染症発生動向調査において、五類定点把握疾患として定点医療機関から報告された手足口病およびヘルパンギーナ患者数を「定点当たり患者報告数」として週別に集計し、流行状況の解析を行った。

2. ウイルス分離・同定

県域の小児科病原体定点医療機関から得られた手足口病およびヘルパンギーナ患者の咽頭拭い液をRD-18s, RD-A, HeLa, HEp-2, Vero, VeroE6, GMK細胞のうち3～6種類の培養細胞を用いて3代継代培養を行い、細胞変性効果を示したのものについて同定を行った。同定は各ウイルスに対する中和用抗血清を用いた中和試験あるいは直接蛍光抗体法を行った。エンテロウイルス属のA群コクサッキーウイルスは培養細胞での分離困難例が多いことから、2003～2007年においては、哺乳マウスを用いたウイルス分離を実施し、免疫腹水を用いた補体結合反応により同定を行った。2008～2011年においては、咽頭ぬぐい液より直接ウイルスゲノムの遺伝子増幅法 (PCR) を実施した。エンテロウイルス属、ライノウイルス属の同定については、5'NTR-VP4部分領域を標的としたP3 (1st), P4 (2nd) /P5³⁾あるいはVP4-VP2部分領域を標的とした60-80F (1st), EVP4 (2nd) /OL68-71R⁴⁾のプライマーセットを用いてRT-seminested PCRを行った。また、細胞分離株で中和試験で同定不能となったパレコウイルス属株についても、5'NTR 部分領域を標的としたev22+/ev22-⁵⁾あるいはVP1部分領域を標的としたHPeV-VP1-S/HPeV-VP1-AS2⁶⁾のプライマーセットを用いてRT-PCRを実施した。PCR産物は1.5%アガロースゲルを用いて電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色後、紫外線下で増幅バンドの有無を確認した。増幅バンドが見られたPCR産物については、ダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定し、米国生物工学情報センター (NCBI) が提供する塩基配列データベース (GenBank) に登録されている遺伝子配列との相同性検索を行い、塩基、アミノ酸配列とも最も高い一致度を示す標準株の血清型に基づき同定を行った。また、2008～2011年に同定されたコクサッキーウイルスA6型 (CA6) で遺伝子解析が可能であった株については、VP4部分領域の141bpを用いて系統解析を行った。遺伝距離はkimura-2-parameter法を用いて推定し、ブーツストラップサンプリングを1000回を行い、近隣結合法にて系統樹を作成した。

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
sano.ipn@pref.kanagawa.jp

* 現企画情報部

2神奈川県衛生研究所 企画情報部

結果および考察

1. 患者発生動向調査

2003～2011年の県域における手足口病患者の定点当たり患者報告数（以下、定点当たり報告数と略）の週別推移を図1に、ヘルパンギーナ患者の定点当たり報告数の週別推移を図2に示した。手足口病では、2008年が定点当たり報告数9.10（第30週）と最も高く、次いで2011年の7.57（第31週）であった。感染症発生動向調査における手足口病の警報レベルの開始基準値である定点当たり報告数5を超えた年は今回の報告の9年間のうち上記の2年であった。ヘルパンギーナでは、2010年が11.44（第28週）と最も高く、次いで2005年の8.49（第28週）であった。ヘルパンギーナの警報レベルである定点当たり報告数6を超えた年は9年間のうち6年あった。手足口病、ヘルパンギーナともに流行のピークは夏期にあるが、流行期間は異なったパターンを示した。手足口病は秋～冬にかけても発生しているのに対し、ヘルパンギーナは夏期のみ集中する傾向にあった。しかしヘルパンギーナの流行は警報レベルを超える年が多く、2003年、2008年も警報レベルに近い流行がみられた。

2 手足口病、ヘルパンギーナ患者のウイルス検出状況および検出ウイルス株の解析

県域における手足口病患者検体からのウイルス検出状況を表1に、ヘルパンギーナ患者検体からのウイルス検出状況を表2に示した。手足口病では、主因ウイルスと

されるCA16、EV71の検出が60%を占め、その他、CA16以外のA群コクサッキーウイルスやライノウイルス、エコーウイルス、パレコウイルス、B群コクサッキーウイルスおよびポリオウイルス（ワクチン接種後検体から検出）、また、口内炎様の症状が類似するアデノウイルスや単純ヘルペスウイルス1型が検出された。CA16は2003年を除き毎年検出されており、特に2008年の流行では、CA16の検出が78%を占めたことから、CA16が主因ウイルスであることが示唆された。また、2010年では、EV71が57%を占めたことから、EV71による流行と推測された。全国的には2003年と2010年にEV71の流行が見られており⁷⁾、当所でも2003年は依頼検体数が少なかったが、分離株6例中5例がEV71であった。EV71は無菌性髄膜炎を併発することもあり、死亡例も報告されている⁸⁾。2011年の流行時には、CA16も検出数の22%を占めていたが、これまでヘルパンギーナの主因ウイルスとされていたCA6が54%と最も多く検出された。CA6が検出された患者の検査依頼票の臨床症状には、従来、手足口病では口腔粘膜、手掌、足底や足背などの四肢末端に出現する発疹が、体幹、臀部や四肢にも出現したとの例がみられた。全国の報告においても2011年はCA6が多く検出されており⁷⁾、従来の水疱よりも大きく、大腿部や臀部まで広範囲に出現した例^{9,10)}や成人において強い発疹症状を呈した例¹⁰⁾、また、手足口病回復後の約1カ月以降に爪甲脱落症が発生した例^{7,11)}も報告されている。海外においては、欧州で2008年に

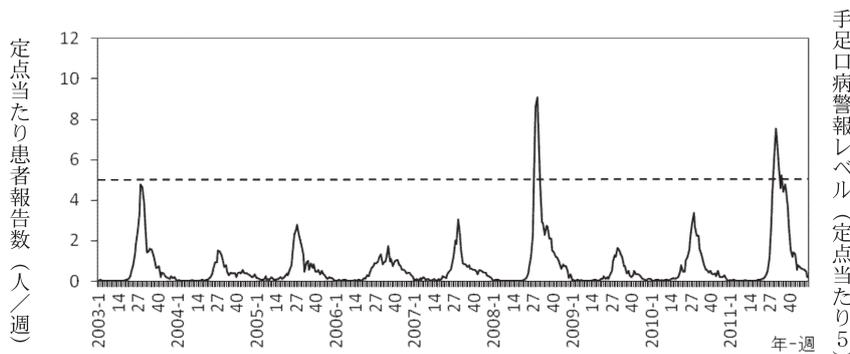


図1 手足口病患者報告数の推移 2003年第1週－2011年第52週

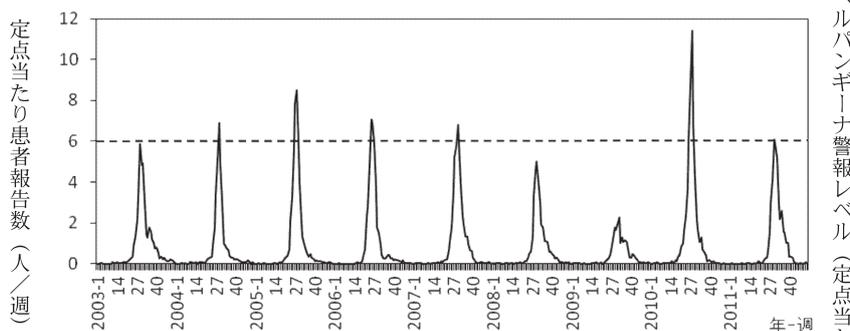


図2 ヘルパンギーナ患者報告数の推移 2003年第1週－2011年第52週

表1 手足口病患者検体からのウイルス検出状況

検出ウイルス	2003年	2004年	2005年	2006年	2007年	2008年	2009年	2010年	2011年	合計
Coxsackie A4	1			3		1		1		6
Coxsackie A5				2	1	1			1	5
Coxsackie A6			8			2	6	14	53	83
Coxsackie A9							2			2
Coxsackie A10					5	4	2	1	12	24
Coxsackie A14			2							2
Coxsackie A16		8	17	32	21	50	6	4	22	160
Coxsackie B1									1	1
Coxsackie B3			1							1
Enterovirus 71	5		13	4	22		10	29		83
Echo 18				7						7
Polio 1					1		1			2
Polio 3					1					1
Rhino						4	4	2	7	17
Parecho 3		1		1		2			3	7
Adeno 2					1		2		1	4
Adeno 5			1							1
Herpes simplex 1				4						4
検出株数	6	9	42	53	51(1)	64	30(3)	51	98(2)	404(6)*
陰性	10	5	10	19	14	17	10	16	22	123
検体数	16	14	52	72	65	81	40	67	120	527
検出率(%)	38	64	81	74	78	79	75	76	82	77

* カッコ内数字は重複検出数

表2 ヘルパンギーナ患者検体からウイルス検出状況

検出ウイルス	2003年	2004年	2005年	2006年	2007年	2008年	2009年	2010年	2011年	合計
Coxsackie A2		3	1		1	8	1	10		24
Coxsackie A4	4	5	1	22		8	1	43		84
Coxsackie A5			1	3	3	5		2	7	21
Coxsackie A6	1	3	15		2	11	9	8	12	61
Coxsackie A9								1		1
Coxsackie A10	8		3	2	20	10	4	9	33	89
Coxsackie A12	9	1	1						1	12
Coxsackie A16		1		1	1	4			1	8
Coxsackie B1									5	5
Coxsackie B2					1					1
Coxsackie B3								1		1
Coxsackie B4							1			1
Coxsackie B5					2			1		3
Enterovirus 71						1		1		2
Echo 6					1					1
Rhino						2		3	3	8
Parecho 1							1			1
Parecho 3						3				3
Parecho 6						4				4
Adeno 1							1			1
Adeno 2		1				3	1			5
Adeno 3		2	1	2						5
Herpes simplex 1			4	2	4	4	1		1	16
Parainfluenza		1								1
Enterovirus NT					1				1	2
検出株数	22	17	27	32	36	63	19(1)	79	63(1)	358(2)*
陰性	10	4	9	9	18	10	3	24	16	103
検体数	32	21	36	41	54	73	22	103	79	461
検出率(%)	69	81	75	78	67	86	86	77	78	78

* カッコ内数字は重複検出数

CA6による手足口病および爪甲脱落症の発生が報告されている¹²⁾。

ヘルパンギーナでは、主因とされるA群コクサッキー

ウイルスの検出が84%を占めた。また、口内炎様の症状が類似する単純ヘルペスウイルス1型、アデノウイルスの検出は手足口病患者よりも多くみられた。その他、

B群コクサッキーウイルス、ライノウイルス、パレコウイルス等が検出された。2005年はCA6が56%，2006年はCA4が69%，2007年はCA10が56%，2010年はCA4が54%，2011年はCA10が52%を占め、毎年血清型が入れ替わり、流行していると考えられた。2011年に手

足口病において、従来ヘルパンギーナの主因ウイルスであるCA6による大規模な流行が起きたことから、2008年以降に手足口病およびヘルパンギーナ患者検体から検出されたCA6について、遺伝子解析が可能であった62株（2011年32株、2010年7株、2009年12株、2008年11

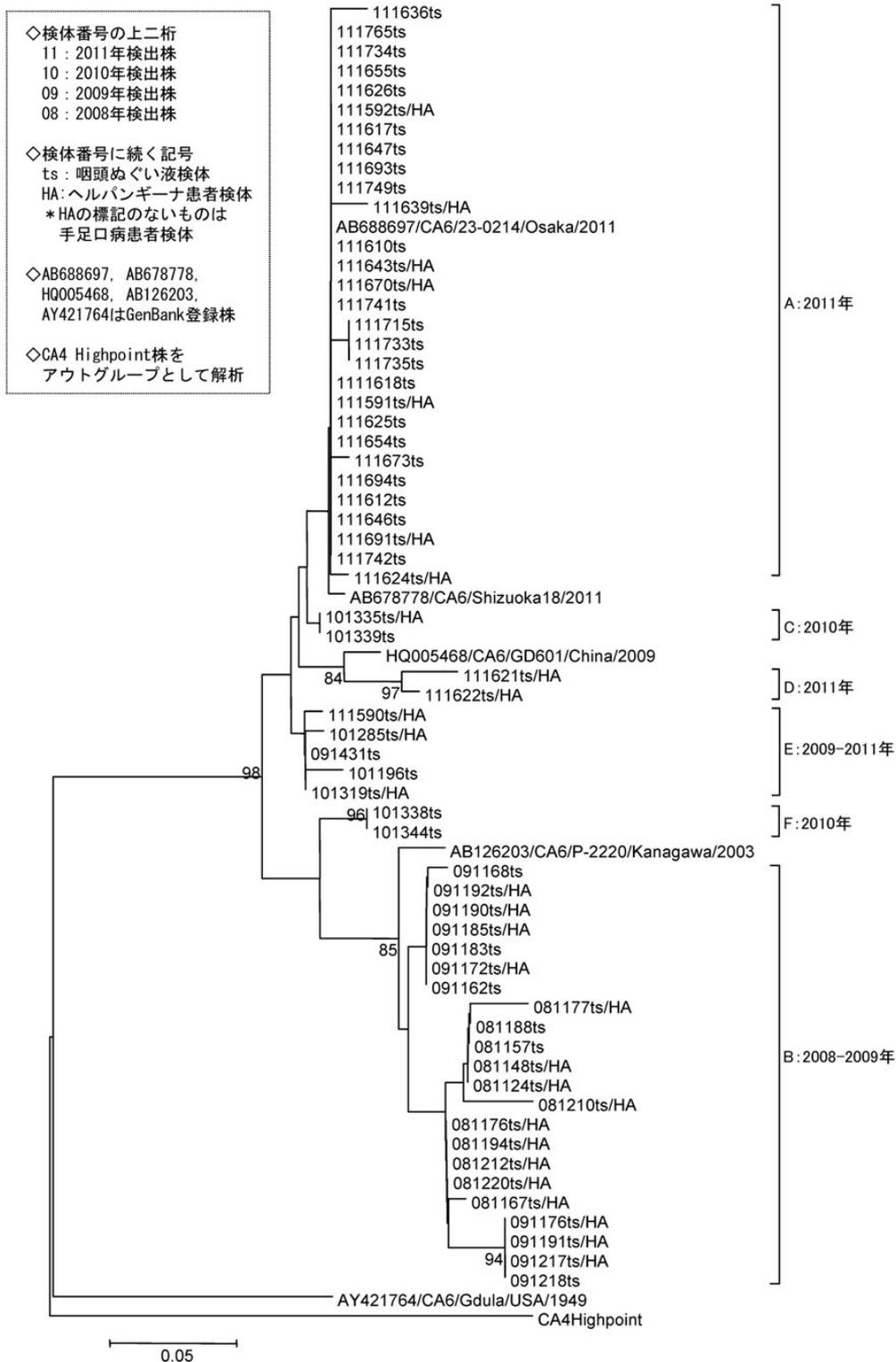


図3 CA6のVP4部分領域（141bp）を用いた系統樹

株)を用いた系統解析を行った(図3)。その結果、2011年に検出された株の多くは、同年に大阪および静岡県で検出されたGenBank登録株(アクセッション番号AB688697, AB678778)と同じクラスターAに分類された。2008~2009年に検出された株の多くは、2003年に横浜でヘルパンギーナ患者検体から検出されたAB126203株と同じクラスターBに分類された。2010年以降に検出された株ではクラスターBに属する株は検出

されず、従来、ヘルパンギーナで流行していたCA6とは異なる株によって2011年の手足口病の流行が引き起こされたと考えられた。

2010年の検出株および2009年と2011年の一部の検出株はクラスターC, D, E, Fに分類された。臨床症状をみると、クラスターEに属する株では体幹や両膝の発疹等の非定型症状を示しており、2011年に流行したCA6の症状と類似していた(表3)。

表3 CA6のVP4部分領域の系統樹においてクラスターC, D, E, Fに分類された検体の臨床症状等

クラスター	検体番号	性別	年齢	検体採取日	診断名	臨床症状・症候等
C	101335ts	男	0歳9カ月	2010/9/8	ヘルパンギーナ	発熱(38℃)
	101339ts	男	32歳8カ月	2010/9/9	手足口病	発熱(37℃), 口内炎, 発疹(水疱, 丘疹, 紅斑), 渡航歴:台湾9/5~9/8
D	111621ts	女	2歳5カ月	2011/7/25	ヘルパンギーナ	発熱(39.2℃), 口内炎
	111622ts	女	1歳11カ月	2011/7/25	ヘルパンギーナ	発熱(39℃), 口内炎, 上気道炎
E	111590ts	女	1歳7カ月	2011/7/6	ヘルパンギーナ	発熱(39.2℃), 口内炎, 発疹(丘疹):体幹(軽症)
	101285ts	女	2歳5カ月	2010/7/27	ヘルパンギーナ	発熱(39.1℃), 口内炎, 発疹(水疱) *発疹は解熱後, 肘膝手首, 関節部中心に多数の2-3mm丘疹, 一部水疱あり. 手足口病とは違う発疹で手掌・足底にはなし
	091431ts	女	1歳5カ月	2009/10/27	手足口病	口内炎, 発疹(水疱, 丘疹), 非定型
	101196ts	男	1歳10カ月	2010/6/11	手足口病	発熱(39.1℃), 口内炎, 上気道炎, 発疹(丘疹)
F	101319ts	女	3歳5カ月	2010/8/26	ヘルパンギーナ	発熱(38.2℃), 口内炎, 上気道炎, 発疹(丘疹):両膝
	101338ts	男	1歳7カ月	2010/9/10	手足口病	発熱(38.1℃), 発疹(紅斑)
	101344ts	男	1歳5カ月	2010/9/25	手足口病	発疹

まとめ

手足口病およびヘルパンギーナは基本的には予後が良好な疾患であるが、手足口病を引き起こすEV71は無菌性髄膜炎を併発することもあり、死亡例も報告されている⁸⁾。2011年にはこれまで報告が少なかったCA6による手足口病が流行し、2008年に次ぐ大きな流行となった。CA6による手足口病の臨床症状は、従来の手、足あるいは口に出現する水疱よりも大きく、大腿部や臀部にも出現し^{9,10)}、また、手足口病回復後の約1カ月以降に発生する爪甲脱落症も報告されている^{7,11)}。CA6による手足口病および爪甲脱落症は2008年に欧州でも報告されており¹²⁾、関連性やCA6の病原性の変化について今後も注視が必要である。毎年の流行状況および原因ウイルスの解析は、疾病の流行を監視する上で極めて重要と考える。

謝辞

本調査を実施するにあたり、多大なご協力を頂きました小児科病原体定点医療機関の先生方および県健康危機管理課の皆様、また、本稿をまとめるにあたり、多大なるご指導を頂きました国立感染症研究所ウイルス第二部の吉田 弘先生に深謝いたします。

(平成24年8月1日受理)

参考文献

- 1) 国立感染症研究所感染症情報センター：感染症の話「手足口病」, 国立感染症研究所感染症発生動向調査週報, 2001年第27号, 8-10 (2001)
- 2) 国立感染症研究所感染症情報センター：感染症の話「ヘルパンギーナ」, 国立感染症研究所感染症発生動向調査週報, 2003年第8号, 10-11 (2003)
- 3) 川俣 治：RT-PCR法によるエンテロウイルス及び

- ライノウイルスの検出系, 新潟医学会雑誌, 111, 633-646 (1997)
- 4) 宗村徹也, 藤本嗣人, 近平雅嗣, 木村博一, 西尾治, 吉田 弘ほか: エンテロウイルス遺伝子診断法における市販RNA抽出キット選択の影響, 感染症学雑誌, 82, 55-57 (2008)
- 5) Joki-Korpela P. and Hyypia T. : Diagnosis and Epidemiology of echovirus 22 infections, Clin. Infect. Dis., 26, 129-136 (1998)
- 6) 伊藤 雅, 山下照夫, 都築秀明, 椛島由佳, 藤浦明, 長谷川晶子ほか: Human parechovirusの検出ならびに同定方法の検討, 愛知県衛生研究所報, 58, 1-8 (2008)
- 7) 国立感染症研究所感染症情報センター: 手足口病 2002~2011年, 国立感染症研究所病原微生物検出情報, 33, 55-56 (2012)
- 8) 篠原美千代, 内田和江, 島田慎一, 瀬川由加里, 星野庸二: 埼玉県における2002年のエンテロウイルス71型分離株について, 感染症学雑誌, 75, 490-494 (2001)
- 9) 小林正明, 藤本嗣人, 花岡 希, 小長谷昌未, 安井良則, 谷口清州ほか: 2011年のコクサッキーウイルスA6型感染による手足口病の臨床的特徴—静岡県, 国立感染症研究所病原微生物検出情報, 32, 230-231 (2011)
- 10) 中田恵子, 山崎謙治, 加瀬哲男: コクサッキーウイルスA6型による手足口病の成人例—大阪府, 国立感染症研究所病原微生物検出情報, 32, 231 (2011)
- 11) Fujimoto T., Iizuka S., Enomoto M., Abe K., Yamashita K., Hanaoka N., *et al.*: Hand, foot, and mouth disease caused by coxsackievirus A6, Japan, 2011, Emerg. Infect. Dis., 18, 337-339 (2012)
- 12) Österback R., Vuorinen T., Linna T., Susi P., Hyypiä T., and Waris M. : Coxsackievirus A6 and hand, foot, and mouth disease, Finland, Emerg. Infect. Dis., 15, 1485-1488 (2009)

短報

高速液体クロマトグラフィー/ タンデム質量分析法を用いた 穀類加工品中のフザリウム属 カビ毒の分析

甲斐茂美, 小菅教仁, 脇ますみ, 岸 弘子

Analysis of *Fusarium* mycotoxins in grain products using liquid chromatography / tandem mass spectrometry

Shigemi KAI, Norihito KOSUGE,
Masumi WAKI and Hiroko KISHI

緒言

フザリウム属のカビは圃場菌類と呼ばれ、農作物の栽培中に植物組織内に侵入し、繁殖する植物病原菌であり、土壌菌類として世界中に広く分布している。フザリウム属のカビが産生するカビ毒には、トリコテセン類、ゼアラレノン(ZEN)、フモニシン等がある。トリコテセン類はトリコテセン骨格と呼ばれる共通構造を有するカビ毒であり、100種類以上の化合物があり、中毒症の原因となるニバレノール(NIV)、デオキシニバレノール(DON)、T-2トキシシン(T-2)、HT-2トキシシン(HT-2)等が含まれる。トリコテセン類の毒性は主に消化器系障害及び免疫機構抑制であり、種々の動物に対して嘔吐、悪心、めまい、下痢、出血、皮膚炎症、造血機能低下等の急性中毒を引き起こすことが知られている。トリコテセン骨格を持たないZENは強いエストロゲン活性を有し、家畜に対する女性ホルモン作用が特徴的であり、家畜に対する健康被害が問題となっている。フモニシンは比較的最近発見され、ブタの肺水腫、ウマの白質脳症の原因物質とされている。現在までにフモニシンA, B, C及びP群が報告されている。これらのフザリウム属カビ毒は世界中に広く分布することから、ムギ類やトウモロコシなどの重要穀類を汚染しヒトや家畜の健康被害の原因となることが懸念される¹⁻³⁾。

食品に対する規制値は、日本では小麦のDONについて

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

て1.1mg/kg (1100ng/g)という暫定基準が設定されているのみである⁴⁾。著者らは高速液体クロマトグラフ/タンデム質量分析計(LC/MS/MS)を用いたDONの分析法について報告した⁵⁾。しかし、検査体制は規制のある小麦に限られており、また穀類への共汚染が懸念されるフザリウム属カビ毒については対応が来ていない。

そこで今回、フザリウム属カビ毒のうち、DONと類似した骨格を有するトリコテセン類と、主な汚染食品が共通しているZENについての同時分析法を検討した。さらに、穀類を加工した市販食品について未規制カビ毒の汚染調査を実施したので報告する。

方法

1. 試料及び試薬

試料は神奈川県内の小売店及びインターネットで購入した小麦粉、コーングリッツ等の穀類粉類を分析対象とした。

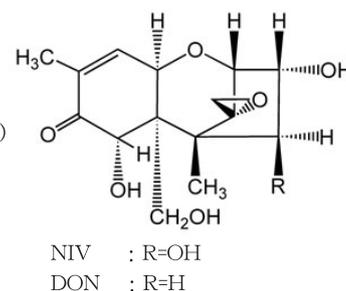
NIV, DON, T-2, HT-2, ZEN標準品は和光純薬工業製を用いた(図1)。その他の試薬は和光純薬工業製残留農薬分析用及びLC-MS用を用いた。多機能クリーンアップカラムはRomer社製MultiSep 226 AflaZon+を用いた。

ニバレノール (NIV)

分子量: 312.3
分子式: $C_{15}H_{20}O_7$

デオキシニバレノール(DON)

分子量: 296.3
分子式: $C_{15}H_{20}O_6$

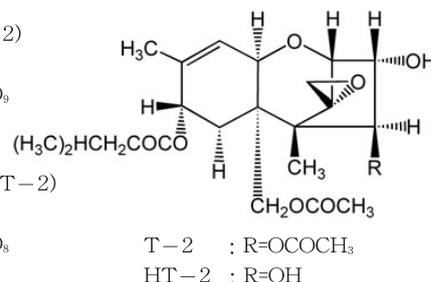


T-2トキシシン(T-2)

分子量: 466.5
分子式: $C_{24}H_{34}O_9$

HT-2トキシシン(HT-2)

分子量: 424.5
分子式: $C_{22}H_{32}O_8$



ゼアラレノン(ZEN)

分子量: 318.2
分子式: $C_{18}H_{22}O_5$

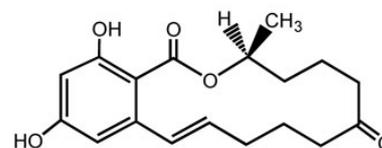


図1 フザリウム属カビ毒の構造式

2. 装置及び分析条件

HPLC条件：

装置：Prominenceシリーズ(島津製作所製)

カラム：ODS-4(2.1mm i.d.×150mm, 3μm, ジーエルサイエンス社製)

カラム温度：40℃

流速：0.2ml/分

移動相：A；10mM酢酸アンモニウム

B；メタノール

グラジエント条件；直線グラジエント

A(95%)→12分→A(0%)(8分保持)

注入量：10μl

MS/MS条件：

装置：3200Qtrap(エービー・サイエックス社製)

イオン化法：エレクトロスプレー(ESI)

イオンスプレー電圧：5kV, -4.2kV

イオンスプレー温度：400℃

ネブライザーガス圧：70psi

イオンスプレーガス圧：80psi

化合物ごとのその他の条件は表1に示した.

表1 LC/MS/MSの測定条件

化合物	極性	定量イオン			確認イオン		
		MRM Trace (<i>m/z</i>)	DP (V)	CE (V)	MRM Trace (<i>m/z</i>)	DP (V)	CE (V)
NIV	-	371→281	-15	-18	311→281	-25	-12
DON	-	355→265	-15	-16	295→265	-30	-14
T-2	+	484→305	16	19	484→215	16	25
HT-2	+	442→263	11	19	442→215	11	19
ZEN	+	319→187	21	23	319→283	21	17

DP：デクラスタリングポテンシャル(Declustering Potential)
CE：コリジョンエネルギー(Collision Energy)

3. 試験溶液の調製

試料25.0gを正確に採り、アセトニトリル-水(85：15)100mlを加えた後、30分間振とう抽出した。3000rpm, 10分間遠心分離し、得られた上澄み液を抽出溶液とした。抽出溶液をMultiSep226AflaZon+に負荷した。初流4mlを捨て、次の分画3mlを採り、その2mlを正確に分取した。窒素気流下で溶媒を除去した後、残留物をメタノール-水(1：9)1mlを正確に加えて溶解した。13000rpmで5分間遠心分離した後、上澄み液を試験溶液とした。

結果と考察

1. LC/MS/MS測定条件について

高感度な測定による定量、確認のためマルチプルリアクションモニタリング(MRM)モードによる分析条件について検討した。イオン化法をESIとし、インフュージョン法によりイオン化条件を検討したところ、NIV及びDONはネガティブモードで酢酸付加体からの脱プロトンイオン[M+CH₃COO]⁻(NIV *m/z*371, DON *m/z*355), 脱プロトンイオン[M-H]⁻(NIV *m/z*311, DON *m/z*295)を、HT-2及びT-2はポジティブモードでアンモニウム付加イオン[M+NH₄]⁺(T-2 *m/z*484, HT-2 *m/z*442), ZENはポジティブモードでプロトン付加イオン

[M+H]⁺ (*m/z*319)を高感度に検出した。さらに、これらのイオンをプリカーサイオンとして選択し、MS/MSのパラメーターの最適化を行った。この結果から、プロダクトイオンには表1に示した定量イオン、確認イオンを選択した。また、最適化によって得られた各化合物ごとの分析条件を表1に示した。

HPLCに用いるカラムはODSカラムについて検討し、ピーク形状、各物質の分離が優れていたジーエルサイエンス社製ODS-4を用いた。移動相に加える添加剤については、既報⁹⁾に従い酢酸アンモニウムを選択した。移動相に用いる有機溶媒についてメタノール及びアセトニトリルについて検討し、各化合物に対しより安定で高感度の分析が可能であったメタノールを選択した。

各化合物の混合標準溶液1, 5, 10, 25, 50, 100及び250ng/mlをメタノール-水(1：9)で調製し、表1に示した分析条件で測定して、定量イオンを用いて検量線を作成した。その結果、NIVは5~100ng/ml, DONは5~250ng/ml, HT-2は1~250ng/ml, T-2, ZENでは1~100ng/mlの範囲で良好な直線性(r>0.999)が得られた。なお、表1に示した確認イオンにおいても、同様の濃度範囲で良好な直線性(r>0.999)が得られた。

また、各標準溶液のMRMモードの定量イオンのクロマトグラムの一例を図2に示した。

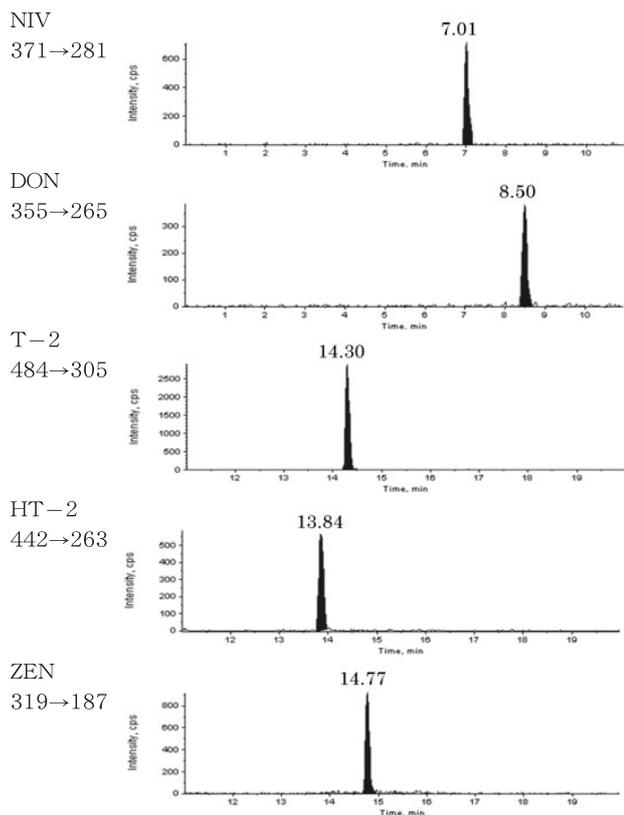


図2 カビ毒標準溶液のLC/MS/MSのクロマトグラム (MRMモード)
NIV, DON : 25ng/ml T-2, HT-2, ZEN : 5ng/ml

2. 試験溶液の調製について

MultiSep226AflaZon+から各化合物が流出する挙動を確認するため、各標準液を小麦粉の抽出液で50ng/mlになるように希釈したものをMultiSep226AflaZon+に負荷し、その流出液を1mlごとに分画し、各分画における回収率を求めた。結果を図3に示した。

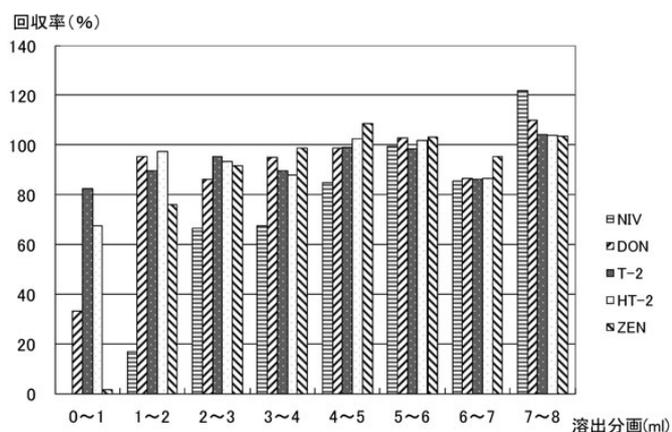


図3 各カビ毒のMultiSep 226 AflaZon+からの溶出挙動

DON, HT-2は1~2ml分画, T-2, ZENは2~3ml分画, NIVは4~5ml分画以降で回収率が常に80%以上を示し、カラムからの溶出が安定することが分かった。このことから各化合物を一斉分析するため、MultiSep226 AflaZon+からの抽出液は初めの流出液4mlを捨て、その後の3mlから2mlを正確に分取することとした。

3. 添加回収試験

小麦粉にNIV及びDONは20ng/g, T-2, HT-2, ZENは5ng/gになるように添加した試料に対し、本法に従って試行回数5回の分析を行い、回収率及び変動係数を求めた。結果を表2に示した。今回分析対象としたフザリウム属カビ毒については分析法の妥当性を評価する基準は示されていないため、カビ毒のアフラトキシン試験法の評価基準(回収率70~110%, 併行精度(変動係数)20%以下)と比較したところ、回収率でNIV及びHT-2がわずかに評価基準を満たさなかったが、他は評価基準を満たしており、概ね良好な結果が得られた。

また、小麦粉抽出液で調製したマトリックス標準溶液を用いて得られたクロマトグラムからS/N=10となる濃度を求め、結果を表2に示した。この結果から、本試験法を用いた試料中の定量限界(S/N≥10)は、NIV及びDONは15ng/g, T-2, HT-2及びZENは5ng/gとした。

4. 市販食品汚染調査

本法を用いて神奈川県内の小売店及びインターネットで購入した麦類、トウモロコシ等穀類の加工品20検体について汚染調査を実施した。結果を表3に示した。検体の内訳はコーングリッツ等トウモロコシ加工品5検体、小麦粉、ライ麦粉等麦類を原料とする加工粉類10検体、オートミール類5検体であった。DONがトウモロコシ加工品1検体及び麦加工粉製品8検体から検出され、検出値は15~180ng/gであった。また、T-2は2検体、HT-2は3検体が麦加工粉製品から検出されたがいずれも20ng/g未満であった。我が国におけるDONの暫定基準値は小麦に対し1.1mg/kg(1100ng/g)であり⁴⁾、我が国では未規制だが、ヨーロッパ等の食品に対するT-2の規制値は100ppb(100ng/g)であることから³⁾、今回検出されたカビ毒の値は食品の安全性に対し問題のない量であると考えられた。

表 2 添加回収試験結果及び定量限界

	NIV	DON	T-2	HT-2	ZEN
回収率(%)	67.8	80.2	90.5	115.4	75.1
変動係数(%)	18.1	13.3	1.9	7.0	12.8
S/N=10(ng/ml)	6.25	3.89	2.28	0.63	1.25

回収率及び変動係数；

試行回数 n=5

添加量 NIV, DON : 20ng/g T-2, HT-2, ZEN : 5ng/g

表 3 汚染調査結果

品名	検査結果 (ng/g)				
	NIV	DON	T-2	HT-2	ZEN
コーングリッツ	ND	ND	ND	ND	ND
コーングリッツ	ND	ND	ND	ND	ND
コーンミール	ND	ND	ND	ND	ND
コーンフラワー	ND	17	ND	ND	ND
コーンフラワー	ND	ND	ND	ND	ND
小麦粉	ND	ND	ND	ND	ND
小麦粉	ND	42	ND	ND	ND
全粒粉	ND	99	ND	ND	ND
全粒粉	ND	49	ND	ND	ND
ライ麦粉	ND	16	ND	ND	ND
ライ麦粉	ND	ND	ND	ND	ND
グラハム粉	ND	110	ND	ND	ND
グラハム粉	ND	87	ND	ND	ND
ブラン	ND	180	ND	7	ND
小麦胚芽	ND	25	ND	ND	ND
オートミール	ND	15	17	18	ND
オートミール	ND	ND	19	6	ND
オートミール	ND	ND	13	ND	ND
オートミール	ND	40	ND	ND	ND
オートミール	ND	ND	ND	ND	ND

ND : 定量限界値未満

定量限界値 : NIV, DON ; 15ng/g T-2, HT-2, ZEN ; 5ng/g

まとめ

主に穀類への汚染が懸念されるフザリウム属カビ毒について、同時分析法を検討し、穀類を加工した市販食品についてNIV, DON, HT-2, T-2, ZENの汚染調査を実施した。

アセトニトリル-水(85 : 15)で抽出後、精製に MultiSep226AflaZon+を用い、LC/MS/MSによる同時分析法を構築した。本法による各カビ毒の回収率は67.8%~115.4%、変動係数は20%以内、定量限界値は試料中濃度でNIV及びDONは15ng/g、T-2, HT-2及び

ZENは5ng/gであった。

本法を用いた市販穀類加工品の汚染調査により、DONがトウモロコシ加工品1検体及び麦加工粉製品8検体、T-2が麦加工粉製品2検体、HT-2が麦加工粉製品3検体から検出された。今回検出されたカビ毒の値は食品の安全性に対し問題のない量であると考えられた。

カビ毒の食品汚染に対する対策は、海外では規制があるものの、我が国ではまだ残留基準値が定められておらず、食品への汚染が懸念されるカビ毒が数多く存在している。今後とも、このような未規制カビ毒に対して流通食品のモニタリング調査を進めていきたいと考える。

謝 辞

本研究は平成23年度神奈川県保健福祉局生活衛生部食品衛生課食品科学検査事業の一環として実施した。ご協力いただいた食品衛生課の皆様に深謝いたします。

(平成24年8月1日受理)

文 献

- 1) 田端節子：食品分析インフォメーションVol.11，食品衛生研究，**55**，41-47（2005）
- 2) 田中敏嗣，芳澤宅實：カビ毒による中毒例と研究のあゆみ，FFIジャーナル，**211**，997-1003（2006）
- 3) 小西良子：カビ毒の毒性と作用機序および最近の知見，FFIジャーナル，**211**，1004-1009（2006）
- 4) 厚生労働省医薬局食品局食品安全部長通知：デオキシニバレノールの試験法について，平成15年7月17日付食安発第0717001号（2003）
- 5) 甲斐茂美，赤星猛，藤巻照久：高速液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法を用いた穀類中のカビ毒，デオキシニバレノールの分析，神奈川衛研報告，**37**，28-30（2007）

短報

金属キレートカラム精製法を用いた 高速液体クロマトグラフィーによる 畜産物中の抗生物質の分析

小菅教仁, 脇ますみ, 甲斐茂美, 岸 弘子

Analysis of antibiotics in livestock products by high-performance liquid chromatography using clean up with metal chelate solid phase extraction column

Norihito KOSUGE, Masumi WAKI,
Shigemi KAI and Hiroko KISHI

緒言

抗生物質は、畜産動物の疾病予防及び治療を目的に用いられており、畜産物の生産性の向上に大きく貢献している。

畜産物に用いられる抗生物質の1種であるテトラサイクリン系抗生物質 (TCs) は、抗菌域が広く安価であることから、飼料添加物あるいは動物用医薬品として牛・豚などの家畜に汎用されている¹⁾。

畜産物中のTCsの分析法は、これまでに様々な方法が検討され²⁾、通知法として、「HPLCによる動物用医薬品等の一斉試験法III(畜産物)」³⁾及び「オキシテトラサイクリン、クロルテトラサイクリン及びテトラサイクリン試験法」³⁾(個別法)が示されている。

しかしながら、個別法による畜産物中クロルテトラサイクリン(CTC)の添加回収試験の結果は精度管理の一般ガイドライン⁴⁾で示された目標値を下回ることがあり、日常の検査に苦慮している。また、畜産物の肝臓及び腎臓は夾雑物質の影響が大きいため、通知法による分析は困難である。これまでに、TCs分析における精製法として、金属キレートカラム精製法を用いた蜂蜜製品中TCsの分析法の報告⁵⁾はあるが、畜産物の肝臓及び腎臓についての報告はほとんどみられない。

そこで著者らは、CTCの分析精度の向上を目的に個別法における前処理方法を検討した。さらに豚筋肉、豚肝

臓及び豚腎臓を対象に、過去に検出事例があるドキシサイクリン (DOXY) を加えたTCs4薬剤について、金属キレートカラム精製法を用いた高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による分析法を検討したので報告する。

方法

1. 試料及び試薬

試料は神奈川県農業技術センター畜産技術所から提供された豚筋肉、豚肝臓及び豚腎臓を分析対象とした。

オキシテトラサイクリン(OTC)塩酸塩及びCTC塩酸塩標準品は和光純薬工業(株)製のHPLC用を、テトラサイクリン(TC)塩酸塩標準品はDr.Ehrenstorfer GmbH社製の残留農薬試験用を、塩酸DOXY標準品はFluka社製を用いた。

各標準品を精秤し、メタノールに溶解して1,000 μ g/mlとしたものを標準原液とした。これらの標準原液を混合し、0.1%ギ酸：アセトニトリル(9：1)で適宜希釈し、各濃度の混合標準溶液を調製した。

抽出溶液はクエン酸一水和物12.9g、リン酸水素二ナトリウム27.64g及びNa₂EDTA 3.72gを水で溶解して1,000mlとした。

溶出緩衝液はクエン酸一水和物1.29g、リン酸水素二ナトリウム2.76g、NaCl 2.92g及びNa₂EDTA 3.72gを水で溶解し100mlとした。

1mol/lイミダゾール緩衝液はイミダゾール68.08g、Na₂EDTA 0.37g及び酢酸マグネシウム10.72gを約800mlの水に溶解し、酢酸でpH7.2に調整後、水を加えて1,000mlとした。

スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラムはGL Sciences社製Inert Sep PLS-2(265mg/6ml)カートリッジ(PLS-2)を用い、あらかじめメタノール、水及び飽和Na₂EDTA溶液でコンディショニング後に使用した。

金属キレートカラムはGL Sciences社製InertSep ME-1 (60mg/3ml)(ME-1)、(株)日立ハイテクフィールドイング製NOBIAS CHELATE- PA1(250mg/6ml) (PA1)及びGEヘルスケア・ジャパン(株)製Chelating Sepharose Fast Flow(Chelating Sepharose FF)を用いた。ME-1及びPA1カートリッジは、あらかじめメタノール、水及び0.1mol/l硫酸銅溶液でコンディショニング後に使用した。Chelating Sepharose FFは20%エタノールに懸濁し、0.9mlをエンプティリーザーバーに注入して水洗し、0.1mol/l 硫酸銅溶液でコンディショニング後に使用した。

メタノールは残留農薬・PCB試験用及びLC/MS用、アセトニトリルはLC/MS用、n-ヘキサンは残留農薬・PCB試験用、その他の試薬は特級を使用した。

2. HPLC装置及び測定条件

HPLCはWaters社製 alliance2695を用いた。分析カラムはYMC社製 YMC-triart C18 (3.0mm i.d. × 150 mm, 3 μm) を用い、カラム温度40℃、流速0.3ml/min、注入量10 μl、移動相はイミダゾール緩衝液-メタノール (78:22) 及び (87:13) とし、検出波長は励起波長380nm及び蛍光波長520nmで分析した。

3. 試験溶液の調製

細切均一化した試料の5.00gを遠沈管に量り採り、抽出溶液70mlを加えホモジナイズ後、毎分3,000回転で遠心分離し、水層を採った。さらに残留物に抽出溶液30mlを加えて抽出し、得られた水層を合わせた。これにn-ヘキサンを加えて振とう後、毎分6,000回転で遠心分離して水層を分取した。この溶液をPLS-2に負荷し、水10mlで洗浄後、メタノール10mlで溶出した。得られた溶出液を金属キレートカラムに負荷し、水2ml、メタノール2ml、水2mlで洗浄後、溶出緩衝液4mlで溶出した。この溶出液をPLS-2に負荷し、水10mlで洗浄後メタノール10mlで溶出した。得られた溶出液を40℃以下で減圧濃縮・窒素乾固し、残留物に0.1%ギ酸:アセトニトリル (9:1)1.0mlを加えて溶解し、毎分13,000回転で遠心分離後、上澄を採取し、試験溶液とした。

4. 妥当性評価試験

検討した試験法について、「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドライン」⁶⁾ (妥当性ガイドライン) に従い、選択性、真度、併行精度及び室内精度を評価し、定量限界を求めた。

添加濃度はTCsの基準値 (OTC, TC及びCTCは豚筋肉0.2 μg/g, 豚肝臓0.6 μg/g, 豚腎臓1.2 μg/g, DOXYはいずれも0.05 μg/g) とし、検量線は各基準値の50%~150%に調製した混合標準溶液を用いて作成した。

結果及び考察

1. 前処理方法の検討

個別法の前処理工程をホモジナイズ及び遠心分離による抽出, n-ヘキサンによる脱脂, PLS-2による精製, 濃縮と1.36%リン酸一カリウム溶液による定容の4つの工程に区分し、各工程におけるTCsの損失状況を確認した(表1)。その結果3薬剤(OTC, TC及びCTC)に共通して抽出工程で損失がみられた。さらにCTCは濃縮・定容工程でも損失していることが示された。そこで、これらの工程について検討することとした。

(1) 抽出工程の検討

TCsは試料中のタンパク質と結合し抽出されにくく、その構造にβ-ジケトン構造を有しており(図1)、二価の金属イオンとキレート形成しやすい⁷⁾。このため、遠心

分離後の残留物とともに残存し、個別法の抽出溶液量では十分に抽出されていないことが推察された。

そこで、豚筋肉を用い、抽出溶液量を70ml及び100mlに変更し、個別法に準じて分析し、比較検討した結果、回収率が最も良好であった100mlを抽出溶液量とした(表2)。

表1 TCs損失状況

前処理工程	OTC (%)	TC (%)	CTC (%)
抽出	-16.3	-26.3	-13.4
脱脂	-4.7	-9.3	0.0
精製	0.0	0.0	0.0
濃縮・定容	-4.6	0.0	-23.4

n=各工程1

添加量:OTC,TC 0.02 μg/g, CTC 0.03 μg/g

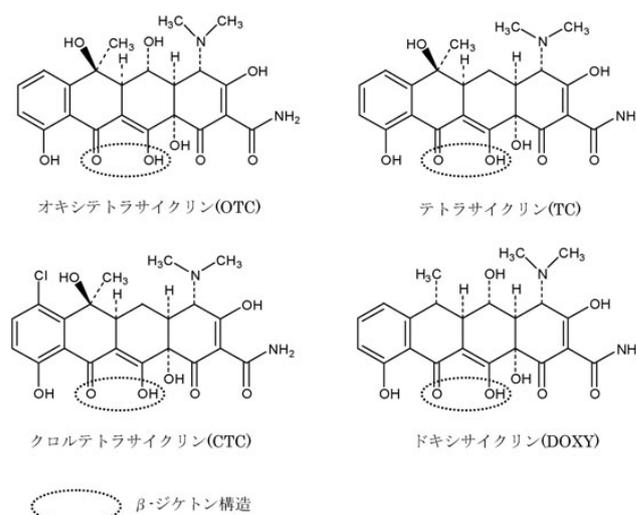


図1 テトラサイクリン系抗生物質の構造式

表2 抽出溶液量による回収率の比較

	抽出溶液量		
	50ml* (%)	70ml (%)	100ml (%)
OTC	78.5	82.5	84.4
TC	71.0	75.1	78.6
CTC	60.2	65.5	70.8

n=1, 添加量:0.2 μg/g

*個別法の抽出液量

(2) 濃縮・定容工程の検討

濃縮・定容工程でCTCが損失する原因としては、CTCの水への溶解性が低く⁸⁾、個別法で示された定容溶液では十分に溶解できていない可能性が考えられた。また、TCsの確認試験は質量検出器付き高速液体クロマトグラフ(LC/MS, LC/MS/MS)を用いることとされており、個別法の定容溶液は揮発性の塩であるため、イオン化が不十分となり感度低下を引き起こす。このため、揮発性の塩を用いない分析法の検討が必要である。これら

のことから、特にCTCの溶解性が高くHPLCによる分析が可能でLC/MS/MSにも適用できる定容溶液として、0.1%ギ酸溶液、0.1%ギ酸：アセトニトリル(9：1)及び0.1%ギ酸：メタノール(9：1)の3種類について比較検討した。豚筋肉抽出液を精製後、TCs3薬剤を添加し、個別法に準じて分析した結果、3薬剤の回収率が最も良好であった0.1%ギ酸：アセトニトリル(9:1)を定容溶液とした(表3)。

表 3 定容溶液による回収率の比較

定容溶液	OTC		TC		CTC	
	回収率 (%)	RSD* (%)	回収率 (%)	RSD* (%)	回収率 (%)	RSD* (%)
0.1%ギ酸溶液	110.6	5.7	81.3	1.4	89.8	2.9
0.1%ギ酸：アセトニトリル(9：1)	112.3	0.6	82.3	0.8	92.2	3.2
0.1%ギ酸：メタノール(9：1)	112.4	1.4	79.1	1.3	87.5	2.7

n=3, 添加量:0.1 μg/g
*RSD=相対標準偏差

2. DOXYを加えた試験法の検討

混合標準溶液を分析したところ、DOXYは他の薬剤と明確に分離された(図2-a)。次に試料中の夾雑物質の影響を確認するため、抽出溶液量を100ml、定容溶液を0.1%ギ酸：アセトニトリル(9:1)に変更し、豚筋肉及び豚肝臓を用い個別法に準じて分析した。その結果、豚筋肉ではDOXYに、豚肝臓では4薬剤すべてに夾雑物質の影響が認められた(図2-b)。このため、さらなる精製が必要であると考えられた。

3. 金属キレートカラムの検討

TCsが二価の金属イオンとキレート形成しやすいという特性を利用し、銅イオンを配位させた金属キレートカラムにより特異的に分離できることから、ME-1、PA1及びChelating Sepharose FFの3種類の金属キレートカラムによる精製法について比較検討した。

豚肝臓を用い本試験法に従い分析したところ、ME-1及びPA1の回収率は著しく低く、溶出緩衝液量を50mlに増量しても十分な結果を得ることができなかった(表4)。これは、金属キレートカラムに対する銅イオンの保持が強く、今回用いた溶出液では十分溶出できないためと考えられた。一方、Chelating Sepharose FFはTCsを特異的に保持し、本試験法で用いた溶出緩衝液で十分溶出可能であり、妨害ピークのない良好なクロマトグラムを得ることができた(図2-c)。これらの結果から金属キレ-

表 4 金属キレートカラムによる回収率の比較

溶出緩衝液量	ME-1		PA1		Chelating Sepharose FF*
	5ml (%)	50ml (%)	5ml (%)	50ml (%)	4ml (%)
OTC	34.6	38.7	11.4	80.4	112.3
TC	25.0	30.3	12.4	78.2	107.8
CTC	10.2	18.1	0.0	39.9	108.6
DOXY	14.1	29.2	0.0	16.5	108.8

n=1, 添加量:0.2 μg/g
*豚肝臓抽出液を用いた

トカラムにChelating Sepharose FFを用いることとした。

4. 妥当性評価試験

検量線はOTC、TC及びCTCは0.1 μg/g~1.8 μg/gで相関係数r>0.999、DOXYは0.025 μg/g~0.075 μg/gで相関係数r>0.998と良好な直線性を示した。選択性、真度、併行精度及び室内精度はいずれも妥当性ガイドラインを満たす値であった(表5)。定量限界値(S/N=10)は、OTC：0.0020~0.0022 μg/g、TC：0.0023~0.0031 μg/g、CTC：0.0097~0.0123 μg/g、DOXY：0.0111~0.0172 μg/gであり、OTC、TC及びCTCは残留基準値よりも十分に低い値であった。一方、DOXYは残留基準値を下回る値ではあったが、さらに感度の高い

表5 妥当性評価結果

豚筋肉						
分析対象	添加量 (μ g/g)	選択性	真度* ¹ (%)	併行精度* ² (%)	室内精度* ³ (%)	定量限界 (S/N=10) (μ g/g)
OTC	0.2	○	98.8	3.0	7.3	0.0022
TC	0.2	○	80.9	5.3	2.5	0.0023
CTC	0.2	○	78.1	3.8	0.6	0.0097
DOXY	0.05	○	96.7	9.7	7.0	0.0172
豚肝臓						
分析対象	添加量 (μ g/g)	選択性	真度* ¹ (%)	併行精度* ² (%)	室内精度* ³ (%)	定量限界 (S/N=10) (μ g/g)
OTC	0.6	○	94.5	4.7	11.8	0.0020
TC	0.6	○	76.4	6.1	4.9	0.0031
CTC	0.6	○	76.1	5.8	6.7	0.0123
DOXY	0.05	○	85.4	7.8	13.3	0.0111
豚腎臓						
分析対象	添加量 (μ g/g)	選択性	真度* ¹ (%)	併行精度* ² (%)	室内精度* ³ (%)	定量限界 (S/N=10) (μ g/g)
OTC	1.2	○	112.3	1.3	5.0	0.0021
TC	1.2	○	88.1	1.1	3.9	0.0024
CTC	1.2	○	84.5	1.3	4.8	0.0101
DOXY	0.05	○	101.6	4.5	6.0	0.0133

n=5

*1 真度=回収率, 目標値:70~120%

*2 併行精度=併行条件下の精度(RSD)

目標値:添加量0.1 μ g/g<の時10%未満, 0.05 μ g/gの時15%未満

*3 室内精度=室内条件下の精度(RSD)

目標値:添加量0.1 μ g/g<の時15%未満, 0.05 μ g/gの時20%未満

LC/MS/MSを用いた試験法の確立が必要であると考えられた。

今後は、分析条件を検討しLC/MS/MSによる感度の高いTCsの確認試験法を確立するとともに、TCsを特異的に分離できる本試験法を応用し、様々な成分を含む加工食品など幅広い食品に対する適用性を検討していきたい。

なお、本研究は平成23年度産学公連携共同研究事業の一環として実施した。

(平成24年8月1日受理)

文 献

- 1) 岡尚男：食品安全の事典，日本食品衛生学会編，pp. 318-321，朝倉書店，東京（2009）
- 2) 神田真軌，草野友子，小山内たか，牛山慶子，竹葉和江，坂本美穂ら：微生物学的スクリーニング，HPLCおよびLC/MS/MSによる食肉中の残留テトラサイクリン系抗生物質4薬剤の迅速分析，食衛誌，**49**，37-44（2008）
- 3) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知：食安発第1129002号（平成17年11月29日）
- 4) 厚生省生活衛生局食品保健課長通知：衛食第117号（平成9年4月1日）
- 5) 藤田和弘，伊藤裕信，石原三知代，犬飼沙知，田中廣行，谷口誠：ポリマー系カートリッジおよび金属キレートクロマトグラフィーを用いた高速液体クロマトグラフィーによる濃厚蜂蜜中のテトラサイクリン系抗生物質の残留分析法，食衛誌，**49**，196-203（2008）
- 6) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知：食安発第1224第1号（平成22年12月24日）

7) 石野正蔵, 坂口武一, 森本功, 興津知明: 酸性溶液中におけるTetracycline類のCu²⁺への配位, 薬学雑誌, 101, 118-124 (1981)

8) The merck index an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals, ed. by Susan Budavari, 339-1450, Merck&Co., Inc., U. S. A. (1989)

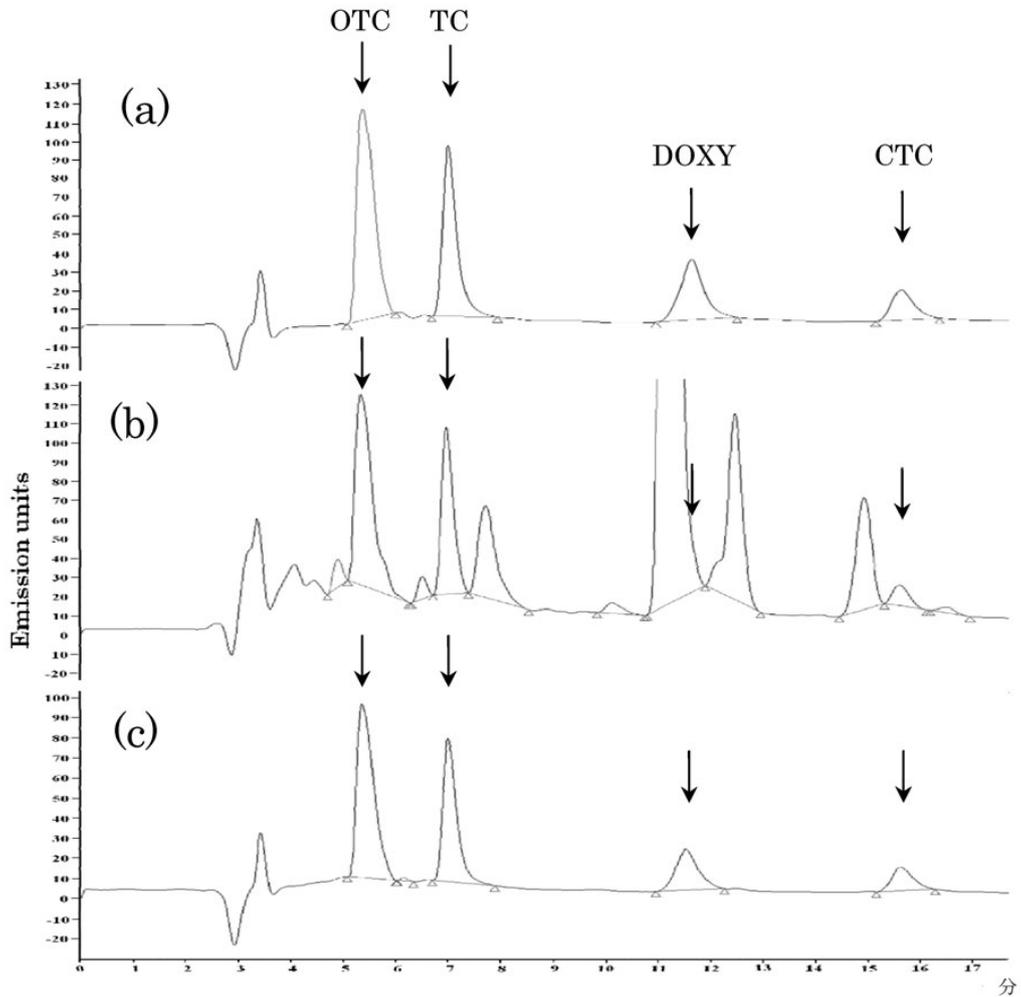


図2 テトラサイクリン系抗生物質のHPLC クロマトグラム

- (a) 混合標準溶液
 - (b) 混合標準溶液を添加した豚肝臓抽出液 (金属キレートカラム処理なし)
 - (c) 混合標準溶液を添加した豚肝臓抽出液 (金属キレートカラム処理あり)
- *濃度はいずれも検体中 0.2 μg/g 相当

短報

フォトダイオードアレイ検出 高速液体クロマトグラフィーを 用いた化粧品に配合される 防腐剤の一斉分析法の検討

羽田千香子, 熊坂謙一, 宮澤眞紀

Simultaneous analysis of preservatives in cosmetics by high-performance liquid chromatography/photodiode array detection

Chikako HADA, Kenichi KUMASAKA
and Maki MIYAZAWA

緒言

化粧品には微生物の発育を抑制することを目的に防腐剤が配合されており、配合できる成分や量については、薬事法上の化粧品基準¹⁾の別表第3において、詳細な規制が示されている。また、東京都の調査では、分析対象としたほとんどの製品に防腐剤が配合されていることが報告されている²⁾。このため、化粧品製造の適切な品質管理及び監視の観点から、製品中の防腐剤成分の分析方法が必要であるが、化粧品基準にはその方法は示されていない。実際の分析においては衛生試験法・注解2010³⁾や森らの報告²⁾に記載されている方法などが参考になるが、当該方法では、移動相の調製方法が煩雑な上、イオンペア試薬を使用しているため、平衡化に時間がかかるという問題点がある。

そこで、移動相条件の改良、有機溶媒の使用量の削減を念頭にした新たな防腐剤13成分（サリチル酸（SA）、安息香酸（BA）、ソルビン酸（SO）、デヒドロ酢酸（DA）、フェノキシエタノール（PE）、メチルパラベン（MP）、クロルフェネシン（CP）、エチルパラベン（EP）、イソプロピルパラベン（IP）、プロピルパラベン（PP）、イソブチルパラベン（IBP）、ブチルパラベン（BP）、イソプロピルメチルフェノール（IM））を対象とした一斉分析が可能なスクリーニング法を検討し、有用な結果を得たので報告する。

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

方法

1. 試薬

防腐剤の標準品として、PE, MP, EP, BP, SA, BA, DA及びSOは和光純薬工業（株）製の和光特級を用いた。IP（98%）、IBP（98%）は和光純薬工業（株）より購入した。CPはAlfa Aesar製（99%）、PPは東京化成工業製（99%、等級:GR）、IMはAldrich製（99%）を用いた。移動相として使用するメタノール、アセトニトリル及び酢酸は和光純薬工業（株）製のHPLC用を用い、塩化セチルトリメチルアンモニウムはAcross製（99%）を使用し、その他の試薬等は市販の特級品を用いた。

2. 装置及び器具

本分析には、Waters製 Alliance 2695 Separation Moduleに2996フォトダイオードアレイ（PDA）検出器を接続したHPLCシステムを用いた。なお、PDA検出器の測定範囲は210~400 nmとし、検出波長は220 nmとした。分析カラムは関東化学社製Mightysil RP-18GP（粒径3 μ m, 3.0 mm ϕ ×150 mm）を用い、カラム温度は40 $^{\circ}$ C、移動相はA混液（水/アセトニトリル/0.25 mol/l酢酸アンモニウム溶液/酢酸混液（350 : 50 : 100 : 1））とB混液（水/アセトニトリル/0.25 mol/l酢酸アンモニウム溶液/酢酸混液（50 : 350 : 100 : 1））を用いて、グラジエント送液とした。その送液条件は、流量0.4 ml/min でA混液/B混液混合比率95:5を初期条件として3分間保持した後、30分間で混合比率15:85まで直線的に変化させた。注入量は5 μ lとした。

メンブランフィルターはPALL社製 GHP Acrodisc（孔径0.45 μ m, 直径25 mm）を用いた。

3. 標準溶液調製

各標準品約0.05 gを精密に量り、メタノールを用いて溶解及び希釈し、5 mg/mlの標準原液とした。各標準原液を用い、直線性範囲の確認用として、2.5, 5, 10, 50, 125及び250 μ g/mlの混合標準溶液を調製した。また、添加回収試験及び実製品への適用では、検量線作成のため、5, 10, 50, 75及び125 μ g/mlの混合標準溶液を使用した。また、検出限界及び定量限界確認用としては、1, 2, 3, 4及び5 μ g/mlの混合標準溶液を調製した。

4. 直線性、検出限界及び定量限界

直線性は、3. 標準溶液調製にて調製した直線性確認用混合標準溶液について各濃度を3回繰り返し注入し、成分濃度とクロマトグラム上のピーク面積値との回帰直線の相関係数及びバイアスから直線性の範囲を評価した。また、検出限界及び定量限界はその確認用標準溶液について、各濃度を3回繰り返し注入し、成分濃度とクロマトグラム上のピーク面積値との直線の傾き（slope）及

び残差の標準偏差 (σ) より以下の計算式により算出した。

検出限界=3.3 σ /slope

定量限界=10 σ /slope

5. 試料溶液調製

森らの報告²⁾及び沢辺, 川口の報告⁴⁾に準じ, 試料をメタノールに分散・溶解させて試料溶液を調製した。即ち, 試料約0.4 gを首太メスフラスコに精密に採取し, メタノールを10 ml加え, 10分間超音波処理して分散又は溶解し, 冷却後, メタノールで正確に20 mlとした後, 遠心分離し上澄液を得た。この液をフィルターでろ過し, 試料溶液とした。

6. 添加回収試験

各防腐剤成分の表示がなく, あらかじめ防腐剤13成分が不含であることを確認した化粧水, シャンプーを用い, 混合標準溶液を添加し, その回収率を求めた。添加量は化粧品中の配合量として0.5, 2.5, 5.0 mg/gとなるように添加し, 併行精度(日内精度)及び室内再現精度における繰り返し回数は各々6回とした。

なお, 試料溶液の調製法は, 5. 試料溶液調製に示した方法で行い, メタノールを10 ml加える代わりに, 100 μ g/mlの混合標準溶液2 ml, 250 μ g/mlの混合標準溶液を4 ml, 8 ml 添加し, 混合標準溶液と合わせて10 mlとなるようメタノールを添加した。

7. 実製品への適用

SA, BA, PE, MP, PPを含む化粧水, シャンプー等の9製品について, 5. 試料溶液調製と同様に調製し, 検

出成分と製品の表示成分との一致を確認し, 本法で分析した定量値と衛生試験法・注解2010³⁾に記載されている移動相条件で分析した定量値を比較した。

結果及び考察

1. 分析条件の検討

本検討においては衛生試験法・注解2010³⁾を対象としている10成分に加え, 当所における過去の分析事例及び森らの報告²⁾から検出事例の多いPE⁵⁾, CP⁶⁾, IMを追加した防腐剤13成分を分析対象成分とした。

分析条件の検討を行うにあたり, カラム内径のサイズを汎用的な4.6 mmから3.0 mmに変更した。これにより, 変更前と同等の線速度を保持して分析を行う場合, 移動相の使用量が約60%削減され, アセトニトリル等の使用量を削減することが可能となった。

また, 適当な移動相条件の検討を行うため, 100 μ g/mlの混合標準溶液を用いた。当初, 移動相の調製が簡便である0.1%リン酸水溶液や0.1%ギ酸水溶液とアセトニトリルによる複数のグラジエント条件で検討を行ったが, 対象成分全てを分離することは困難であった。そこで今後の液体クロマトグラフ質量分析法(LC/MS)への展開を視野に入れ, 衛生試験法・注解2010³⁾に記載されている移動相条件がpH5.2であることから, pKaに近い酢酸アンモニウムに酢酸を添加した移動相を用いることとした。これにより分離状況は改善されたが, グラジエント送液による酢酸アンモニウム緩衝液の濃度変化の影響がベースラインのドリフトに顕著に現れたため, グ

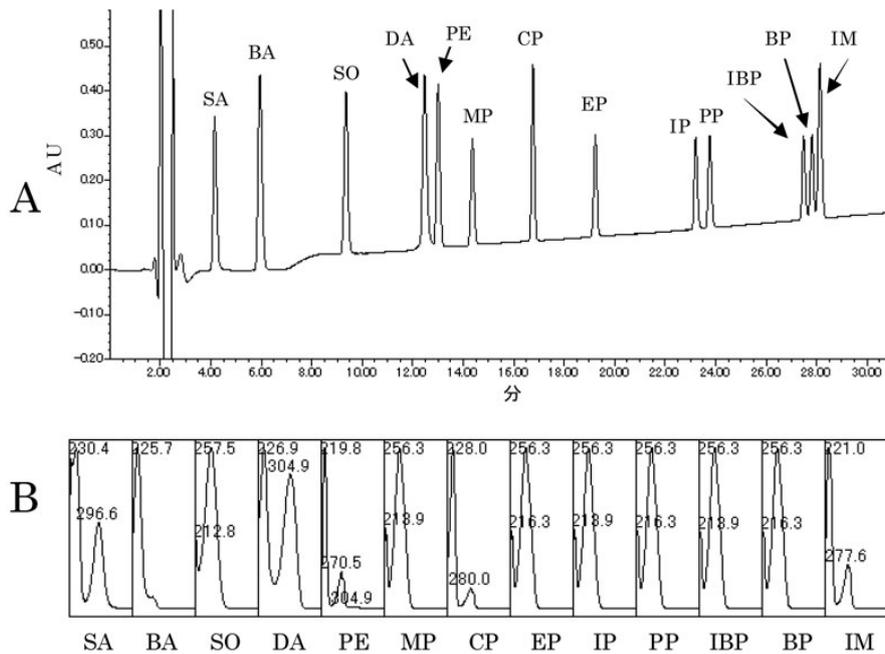


図1 防腐剤13成分のクロマトグラム (A) 及び各成分ピークのUV吸収スペクトル (B)

ラジエント送液により有機溶媒の比率にのみ変化を与え、酢酸アンモニウム緩衝液の濃度に変動がない移動相条件に変更し、最終的な移動相条件を確立した。本移動相条件における100 $\mu\text{g/ml}$ 混合標準溶液のクロマトグラムを図1 (A) に示す。IBPとBPの保持時間の分離度は1.4であったが、13成分について概ね良好に分離した。

分析対象とした各成分ピークの紫外 (UV) 吸収スペクトルを図1 (B) に示す。パラベン類は極大吸収波長256 nmを持つ特徴的なUV吸収スペクトルを示したほか、他の成分でも特徴的なUV吸収スペクトルを示した。そのため、各ピークの保持時間に加えてそのUV吸収スペクトルを確認することは成分確認に有用であると考えられる。なお、本分析条件におけるPDA検出器の検出波長は、スクリーニングを目的としているため、全成分を同時に感度良く検出できる波長である220 nmを使用した。

2. 直線性範囲, 検出限界及び定量限界

混合標準溶液を用いて分析を行ったところ、直線性範囲, 回帰式, 相関係数及び定量限界は表1の通りであり, 各成分とも相関係数0.999以上の良好な直線性が見られた。なお, 検出限界は計算上は, 1 $\mu\text{g/ml}$ 以下であったが, 各成分のピークUV吸収スペクトルが明瞭に確認できる濃度として1 $\mu\text{g/ml}$ とした。

3. 添加回収試験

化粧水, シャンプーに3段階の濃度の混合標準溶液を

表1 混合標準溶液による直線性の範囲

成分	直線性範囲	回帰式	相関係数	定量限界
	$\mu\text{g/ml}$			$\mu\text{g/ml}$
SA	5~125	$y = 31818x - 14991$	0.9999	1.8
BA	5~125	$y = 31818x - 14991$	0.9999	0.8
SO	2.5~125	$y = 37471x + 8410.4$	0.9999	1.9
DA	5~125	$y = 45032x - 64664$	0.9998	2.5
PE	5~125	$y = 34342x + 25790$	0.9999	2.1
MP	5~250	$y = 21054x + 7974.5$	0.9999	2.4
CP	2.5~125	$y = 28994x + 4734.1$	0.9999	1.1
EP	5~250	$y = 19270x + 7923.1$	0.9999	2.1
IP	5~250	$y = 17133x + 5374.3$	0.9999	2.7
PP	5~250	$y = 17562x + 11441$	0.9999	2.2
IBP	5~250	$y = 16102x + 9244.5$	0.9999	1.8
BP	5~250	$y = 16198x + 14889$	1.0000	2.3
IM	2.5~125	$y = 31677x + 12246$	0.9999	1.6

添加して実施した併行精度及び室内再現精度の結果を, それぞれ表2, 表3に示す。また, 添加量2.5 mg/gにおけるクロマトグラムを図2に示す。回収率については概ね良好な値を示したが, 併行精度のIBPにおいて, シャンプーにおける添加量0.5 mg/gでは, 108.2%とやや高い回収率であった。本来, 定量においては夾雑成分の影響を考慮して, より長波長側の各成分の極大吸収波長を用いることが望ましいが, 全成分を良好に検出できる220 nmは夾雑成分も検出されやすく, 移動相のグラジエント送液によるベースライン変動の影響を受けやすいため, 回収率に影響が現れたと考えられる。確認のため, 測定波長をIBPの極大吸収波長である256 nmで解析し

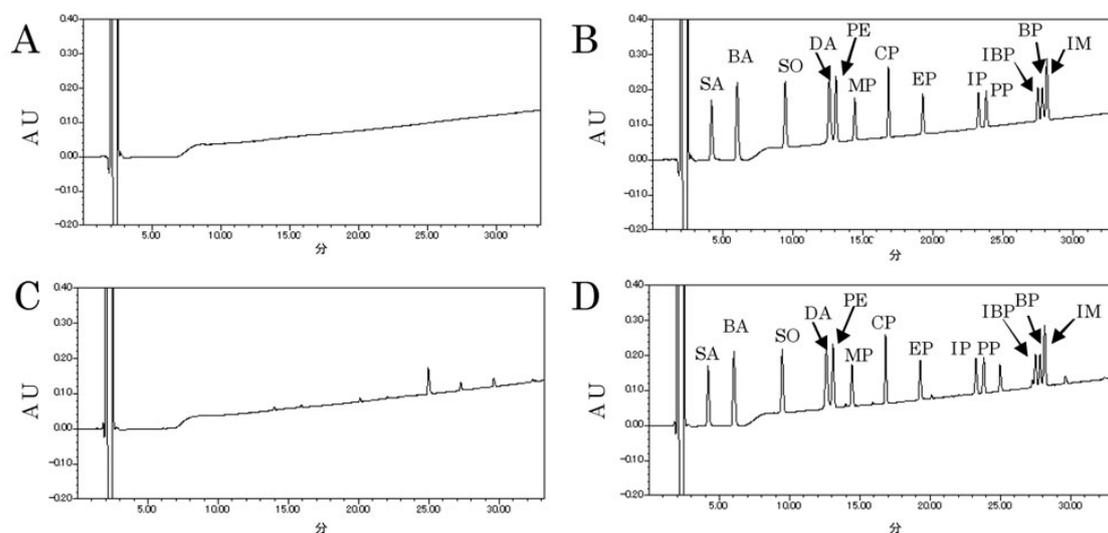


図2 添加回収試験におけるクロマトグラム

(A) 未添加化粧水試料, (B) 添加化粧水試料, 添加濃度 2.5 mg/g,
(C) 未添加シャンプー試料, (D) 添加シャンプー試料, 添加濃度 2.5 mg/g

表2 防腐剤成分の添加回収試験の併行精度

成分	化粧品			シャンプー		
	0.5 mg/g	2.5 mg/g	5 mg/g	0.5 mg/g	2.5 mg/g	5 mg/g
SA	100.4±5.7	100.2±1.3	101.3±2.9	102.7±4.3	102.6±2.3	101.0±1.4
BA	100.2±2.4	101.2±1.5	101.8±3.0	100.6±1.8	102.6±2.2	101.3±1.3
SO	101.6±3.7	102.0±1.1	102.0±3.4	101.9±4.1	104.4±2.4	101.3±1.4
DA	97.2±4.2	101.3±1.6	102.5±3.2	101.5±2.8	103.0±2.1	102.1±1.7
PE	94.9±1.9	102.5±1.8	102.5±2.7	96.7±4.3	104.1±2.3	101.7±1.4
MP	98.6±5.1	101.4±1.9	101.6±2.8	105.9±4.4	103.3±1.9	101.6±1.4
CP	98.2±4.0	102.5±1.3	101.9±2.8	101.3±2.7	103.6±1.8	101.8±1.6
EP	102.3±3.4	102.0±1.7	101.9±2.7	102.2±5.0	103.1±3.0	101.2±1.8
IP	101.0±5.3	100.5±1.7	100.5±3.0	99.4±6.0	102.6±2.0	100.9±1.6
PP	102.4±5.4	101.5±1.3	101.5±2.7	100.4±3.3	102.8±2.4	101.2±1.4
IBP	98.2±3.4	101.8±1.7	102.3±2.9	108.2±4.8	105.7±2.5	103.2±1.9
BP	97.8±1.9	101.2±1.8	101.4±2.6	99.5±2.1	102.7±1.6	100.7±1.6
IM	96.7±2.5	101.7±1.7	102.3±2.9	97.3±2.1	103.3±2.0	101.9±1.7

平均(%)±標準偏差, n=6

表3 防腐剤成分の添加回収試験の室内再現精度

成分	化粧品			シャンプー		
	0.5 mg/g	2.5 mg/g	5 mg/g	0.5 mg/g	2.5 mg/g	5 mg/g
SA	94.3±7.2	100.8±2.2	100.2±1.7	97.1±7.3	100.4±1.4	99.7±0.9
BA	97.7±4.3	101.8±1.8	100.7±1.5	98.2±4.8	100.9±1.1	99.9±1.2
SO	96.6±4.9	102.6±2.4	100.5±1.5	98.7±6.5	101.5±1.3	99.8±0.8
DA	98.1±4.8	100.8±1.8	100.6±1.3	97.2±2.6	100.5±1.7	99.6±1.5
PE	95.8±4.4	102.4±1.7	100.8±1.7	93.3±5.4	101.8±1.5	99.9±1.2
MP	96.0±7.6	102.1±2.1	100.4±1.5	98.7±6.8	100.8±1.3	100.0±0.9
CP	94.0±5.2	102.4±1.6	100.8±1.5	96.1±4.3	101.9±2.0	100.0±1.3
EP	99.6±1.9	102.8±2.6	100.1±1.5	101.6±1.2	101.3±1.7	99.6±0.6
IP	98.5±6.8	102.2±2.0	100.6±1.5	99.0±4.6	101.6±0.8	100.4±1.3
PP	94.0±4.6	102.0±0.8	100.6±1.4	97.2±4.0	100.8±1.0	100.2±1.5
IBP	96.9±5.5	101.6±2.3	100.8±1.7	102.7±6.0	103.0±1.5	101.0±1.2
BP	99.7±1.8	102.9±2.7	100.1±1.6	101.8±1.0	101.3±1.8	99.7±0.7
IM	95.3±5.6	102.0±2.3	100.7±1.7	98.3±5.3	101.8±0.9	100.2±1.1

平均(%)±標準偏差, n=6

たところ、その回収率は101.4%と良好であった。また、両サンプルにおいて、添加濃度0.5 mg/gについては他の結果に比べてばらつきが大きい、グラジエント送液を用いたスクリーニング法であることから、問題のないレベルであると考えられた。

4. 試料への適用

市販化粧品9品目を対象に分析を実施した。本分析条件において防腐剤13成分のピークに対して夾雑成分ピークの影響は見られなかった。また、検出された防腐剤成分は各製品の表示成分と一致していた。さらにその定量値は衛生試験法・注解2010³⁾に記載されている移動相条件で定量した値とほぼ同等の定量値を示した(表4)。以上の結果より、移動相にイオンペア試薬を用いずとも、移動相のpHを適切に調整すれば防腐剤13成分の一斉分析が可能であると考えられた。また、今回検討した移動相であれば、定性・定量性により優れたLC/MS法への

発展が可能であると考えられる。

一方、化粧品には、基材として各種油分、保湿剤、界面活性剤等が含まれており⁷⁾、質量分析法で分析する場合、これらの成分は除去、精製しなければならぬ。さらに、植物エキス等を含む化粧品が増えている状況であるため、天然成分由来の夾雑成分の影響を低減する必要性も高まることから、Mikamiらの報告⁸⁾にもある通り、今後はさらに、固相抽出カートリッジ等によるクリーンアップについても検討していく必要があると思われる。

結 論

化粧品中の防腐剤成分13物質の一斉分析法の検討を行った。移動相条件の検討を行ったところ、酢酸アンモニウム緩衝液とアセトニトリル混液を用いた方法により、各成分が良好に分離した。さらに、従来法と同等の結果が得られながら、有機溶媒の使用量を削減することに成

功した。また、良好な直線性の範囲、検出限界が確認され、添加回収試験の結果、真度、精度ともに良好であった。実製品への適用を行ったところ、従来の移動相条件と比較し、同等の定量値が得られたことから化粧品中の防腐剤13成分のスクリーニング法として有用であると考えられた。

(平成24年8月1日受理)

表4 実製品への適用

試料	成分	定量値(mg/g)	
		本法	従来法
化粧品1	MP	1.73±0.05	1.76±0.01
化粧品2	MP	1.56±0.12	1.48±0.05
	PE	1.53±0.08	1.50±0.02
化粧品3	PE	3.16±0.07	3.11±0.06
	MP	1.01±0.04	1.01±0.02
化粧品4	SA	0.46±0.02	0.53±0.02
化粧品5	MP	1.05±0.05	1.12±0.03
	PP	0.93±0.03	0.97±0.03
化粧品6	PE	3.03±0.05	3.03±0.05
	MP	1.34±0.04	1.36±0.02
シャンプー1	BA	1.73±0.04	1.70±0.01
シャンプー2	BA	2.56±0.04	2.54±0.03
	MP	2.06±0.05	2.06±0.02
	PP	1.05±0.04	0.98±0.02
シャンプー3	BA	0.39±0.01	0.40±0.01

平均±標準偏差(n=5)

文献

- 1) 厚生省：化粧品基準，平成12年9月29日，告示第331号（2000）
- 2) 森謙一郎，中村義昭，大貫奈穂美，寺島潔，宮本道子，荻野周三ほか：化粧品中防腐剤の検査結果（平成16-18年度）と検査法の改良，東京都健康安全研究センター研究年報，58，103-106（2007）
- 3) 3.2化粧品試験法，衛生試験法・注解2010，日本薬学会編，pp.674-676，金原出版，東京（2010）
- 4) 沢辺善之，川口正美：HPLCを用いた化粧品中の防腐剤の定量法，大阪府立公衆衛生研究所報，47，33-36（2009）
- 5) 土井佳代：化粧品中のフェノキシエタノールの高速液体クロマトグラフィーによる分析，神奈川県衛生研究所研究報告，32，85-87（2002）
- 6) 五十嵐良明，宮澤法政，島村公雄，佐藤信夫，吉沢賢一，林正人ほか：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，国立医薬品食品衛生研究所報告，127，50-53（2009）
- 7) 3.2化粧品試験法，衛生試験法・注解2010，日本薬学会編，pp.673，金原出版，東京（2010）
- 8) Mikami,E., Goto,T., Ohno,T., Matsumoto,H. and Nishida, M.:Simultaneous analysis of dehydroacetic acid, benzoic acid, sorbic acid and salicylic acid in cosmetic products by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography,J.Pharm. Biomed. Anal., 28, 261-267（2002）

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23年度)

古川一郎, 石原ともえ, 渡辺祐子

Occurrence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in Kanagawa Prefecture (April,2011-March,2012)

Ichiro FURUKAWA, Tomoe ISHIHARA and Yuko WATANABE

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感染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, 各自治体の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号) に基づき, 国立感染症研究所 (以下, 感染研と略す) 細菌第一部に菌株を送付している。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) 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。さらに, EHEC感染症については, 溶血性尿毒症症候群 (以下, HUSと略す) 発症者に限り, 便からのペロ毒素の検出, 血清中のO抗原凝集抗体あるいはペロ毒素抗体の検出によって診断された場合も届出の対象となっており¹⁾, 当所においても搬入された血清について, EHEC加熱死菌により抗体の確認を行っている。本報告では, 当所に送付されたすべてのEHEC菌株についてPFGE解析および薬剤感受性試験を行い, このうちO157についてはマルチプレックスPCR法を用いたIS-Printing System (以下, IS法と略す) による解析をあわせて実施したのでその概要を述べる。

平成23年度のEHEC菌株の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17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4株, 藤沢市から送付されたヒト由来3株を含めた計30株であった (表1)。HUS患者血清は神奈川県内の医療機関から2検体搬入された。血清型およびVero毒素(VT)の違いによる内訳は, O157(VT1&2) 13株, O157(VT2) 6株, O157(VT1) 1株, O145(VT2) 3株, O145(VT1&2) 1株, O26(VT1)

表1 搬入施設別の菌株および患者血清受領状況 (菌株30株, 患者血清2検体)

施設	O157			O145		O111		O26	O103	菌株数	患者血清 (検体数)
	VT1,2	VT1	VT2	VT1,2	VT2	VT1,2	VT1	VT1	VT1		
鎌倉保健福祉事務所	3		2		2		1			8	
大和保健福祉事務所	4									4	
秦野保健福祉事務所					1	1		1		3	0165 (1)
厚木保健福祉事務所	2			1						3	
平塚保健福祉事務所			1							1	0157 (1)
茅ヶ崎保健福祉事務所	1		1							2	
足柄上保健福祉事務所	2									2	
食肉衛生検査所	1	1	2							4	
藤沢市保健所								1	2	3	
計	13	1	6	1	3	1	1	2	2	30	2

2株, O103(VT1) 2株, O111(VT1&2) 1株, O111(VT1) 1株であった。HUS患者血清2検体については、O157およびO165の血清抗体がそれぞれ確認された。菌分離あるいは血清診断によりEHECの感染が認められた27名の患者および保菌者について、性別および年齢構成を比較した(表2)。年齢の範囲は男性2~69歳, 女性1~75歳, 平均は男性28.5歳に対し, 女性は38.7歳であった。

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) 13菌株についてPFGEパターンをクラスター解析した結果(図1), 家族内の2事例から分離され

表2 患者・保菌者の年齢構成および性別

年齢層	男性	女性	計
1 - 5	3	2	5
6-10	0	0	0
11-20	2	2	4
21-30	2	2	4
31-40	2	2	4
41-50	1	1	2
51-60	0	2	2
61-70	2	2	4
>70	0	2	2
計	12	15	27

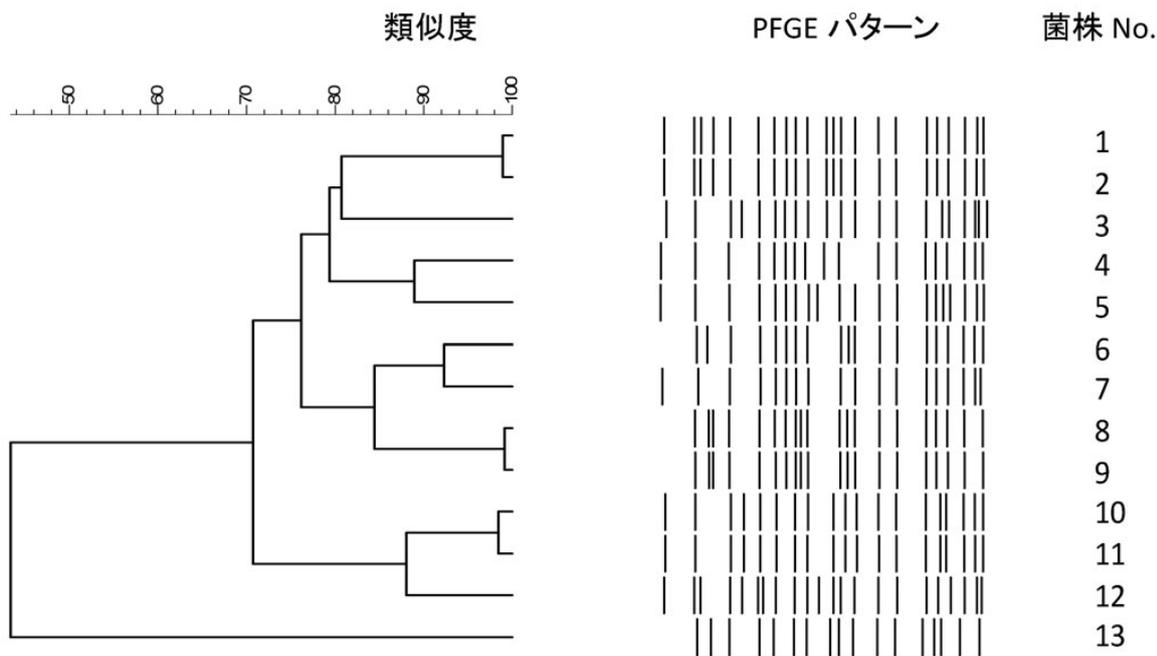


図1 EHEC O157 (VT1&2) のデンドログラムおよびPFGEパターン

た菌株No.8およびNo.9, さらに菌株No.10およびNo.11は, それぞれ95%以上の類似度を示し, IS法のパターンも一致していた。PFGEおよびIS法のパターンが一致した菌株No.1およびNo.2は, 同一地域で分離されており, 菌分離日が1週間以内の差であったことから, 何らかの関連が疑われたが, 他の疫学情報にもとづく関連性は認められなかった。菌株No.3およびNo.4は, IS法においてパターンが一致していたが, PFGEパターンは異なっており, 類似度は約80%を示した。

O157 (VT2) 6株の解析では(図2), 菌株No.14およ

び15は家族内の事例であり, 95%以上の高い類似度を示した。

食肉衛生検査所においてウシから分離されたO157の4株 (VT1: 1株, VT2: 2株, VT1,2: 1株) のPFGEおよびIS法でのパターンは, いずれもヒト分離株とは一致しなかった。

O26 (VT1) 2株およびO145の4株 (VT1,2: 1株, VT2: 3株) におけるPFGE解析では, 重複分離株1株を含む家族内事例から分離されたO145の3株は高い類似度を示したが, その他の3株については高い類似度を示す

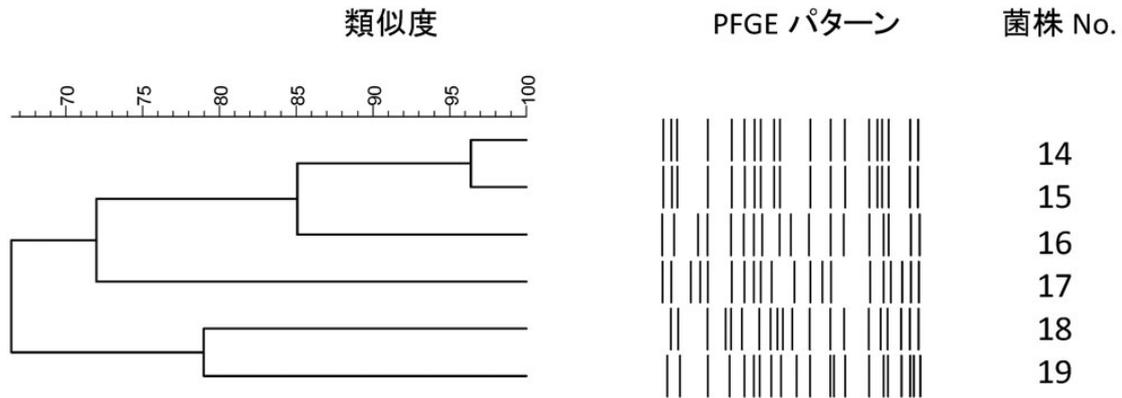


図2 EHEC O157 (VT2) のデンドログラムおよびPFGEパターン

菌株は認められず、すべて散発事例由来と考えられた。
 次に、これら30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²⁾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の2剤耐性が3株、CPの単剤耐性は4株、TCの単剤耐性は1株であり、30株中22株が供試した11薬剤に感受性であった。

表3 薬剤感受性試験結果 (30株)

耐性薬剤	菌株数	血清型(株数)
2剤 ABPC, SM	3	O157VT1, 2(2) O26VT1(1)
単剤 CP	4	O157VT1, 2(4)
TC	1	O111VT1, 2(1)
感受性	22	
計	30	

今回、県内保健所設置市を除く県域内において、平成23年度のEHECの集団感染事例はすべて家族内事例であったが、国内においてはEHECの集団感染に伴う死亡事例

も発生しており、今後もEHECの分離状況について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たいと考える。

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危機管理課、藤沢市保健所の方々に感謝いたします。

(平成24年8月1日受理)

文 献

- 1) 腸管出血性大腸菌感染症：病原微生物検出情報. 27, 149 (2006)
- 2) 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)

資料

神奈川県域における細菌性食中毒
 検出状況 (平成22～23年度)

小泉明子, 原みゆき, 伊達佳美, 丹羽加代子*

Occurrence of bacterial foodborne
 disease in Kanagawa Prefecture
 (2010-2011)

Akiko KOIZUMI, Miyuki HARA, Yoshimi DATE
 and Kayoko NIWA

神奈川県衛生研究所では横浜市, 川崎市, 横須賀市, 相模原市および藤沢市を除いた神奈川県内 (以下, 県域) で発生した食中毒が疑われる事例 (県域事例) や他の自治体で発生した食中毒に関連する事例 (関連事例) について食中毒の原因究明, 拡大防止を目的に検査をおこなっている。当所における細菌性食中毒検査業務は従来, 県域全体を当所地域調査部の3分室 (小田原, 茅ヶ崎, 厚木) で管轄地域ごとに検査を実施していたが, 平成22

年度に機能集約され1か所 (防疫・食中毒担当) で検査業務をおこなっている。今回, 集約後の平成22年度および平成23年度の食中毒菌の検出状況を報告する。

検査対象は糞便, 食品, ふきとり等で検査項目はサルモネラ属菌, 黄色ブドウ球菌, 腸炎ビブリオ, 腸管出血性大腸菌, その他の病原性大腸菌, ウエルシュ菌, セレウス菌, エルシニア・エンテロコリチカ, カンピロバクター, ナグビブリオ, コレラ菌, 赤痢菌, チフス菌, ビブリオ・フルビアリス, エロモナス, プレジオモナス・シゲロイデスの食中毒原因菌16菌種について常法に従い実施した。

平成22年度から平成23年度の食中毒菌検査数を表1に示した。当所における食中毒菌検査は平成22年度65事例629検体, 平成23年度87事例760検体であった。このうち食中毒菌が検出されたのは平成22年度20事例56検体 (8.9%), 平成23年度26事例66検体 (8.7%) であった。県域事例は平成22年度31事例568検体, 平成23年度34事例614検体であった。関連事例は平成22年度34事例61検体, 平成23年度53事例146検体と前年に比べ事例数, 検体数とも増加している。食中毒菌が検出された県域事例は平成22年度12事例46検体 (8.1%), 平成23年度15事例51検体 (8.3%) であった。また関連事例は平成22年度8事例10検体 (16.4%), 平成23年度11事例15検体 (10.3%) であった。

表1 食中毒菌検査数および検出数 (平成22～23年度)

	平成22年度				平成23年度			
	事例数	検出事例数 [※]	検体数	検出数 (%)	事例数	検出事例数 [※]	検体数	検出数 (%)
県域	31	12	568	46 (8.1)	34	15	614	51 (8.3)
関連 (県域外)	34	8	61	10 (16.4)	53	11	146	15 (10.3)
計	65	20	629	56 (8.9)	87	26	760	66 (8.7)

※ 1検体でも食中毒菌が検出された事例数

次に平成22年度と平成23年度の食中毒菌検出状況を表2に示した。平成22年度の食中毒菌を検出した20事例の菌種の内訳はカンピロバクター (*Campylobacter jejuni*, *C. coli*) が10事例でサルモネラ属菌 (*Salmonella* Enteritidis, *S. Miyazaki*) は5事例, セレウス菌 (*Bacillus cereus*), 黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*), 腸炎ビブリオ (*Vibrio parahaemolyticus*), 腸管出血

性大腸菌 (EHEC O157), ウエルシュ菌 (*Clostridium perfringens*) が各1事例ずつであった。また平成23年度の食中毒菌を検出した26事例の菌種の内訳は, カンピロバクターが (*C. jejuni*, *C. coli*) 20事例でサルモネラ属菌 (*S. Enteritidis*, *S. Infantis*) と腸管毒素原性大腸菌 (ETEC O148) および黄色ブドウ球菌が2事例ずつ, カンピロバクターとサルモネラ属菌, カンピロバクターと黄色ブドウ球菌2菌種が検出された事例がそれぞれ1事例ずつであった。平成22年度の厚生労働省の全国における原因別発生状況¹⁾によると, カンピロバクター

神奈川県衛生研究所 地域調査部
 〒253-0087 茅ヶ崎市下町屋1-3-1
 ※ 現 微生物部

表 2 食中毒菌検出状況 (平成22~23年度)

	平成22年度			平成23年度		
	事例数	検出菌株数(%)	検出菌(数)	事例数	検出菌株数(%)	検出菌(数)
カンピロバクター	10	35 (59.3)	<i>C. jejuni</i> (32) <i>C. coli</i> (3)	20	44 (65.7)	<i>C. jejuni</i> (41) <i>C. coli</i> (3)
サルモネラ属菌	5	15 (25.4)	<i>S. Enteritidis</i> (12) <i>S. Miyazaki</i> (3)	3	4 (6.0)	<i>S. Enteritidis</i> (3) <i>S. Infantis</i> (1)
黄色ブドウ球菌	1	1 (1.7)	<i>S. aureus</i> (1)	3	6 (8.9)	<i>S. aureus</i> (6)
腸炎ビブリオ	1	1 (1.7)	<i>V. parahaemolyticus</i> (1)			
腸管出血性大腸菌	1	1 (1.7)	EHEC O157(1)			
その他の病原大腸菌				2	13 (19.4)	ETEC O148(13)
ウエルシュ菌	1	1 (1.7)	<i>C. perfringens</i> (1)			
セレウス菌	1	5 (8.5)	<i>B. cereus</i> (5)			
計	20	59 (100)		26*	67 (100)	

*2事例は食中毒菌重複検出

が最も多く次いでサルモネラ属菌であり県域でも同様の検出傾向であった。

平成22年度から平成23年度に県域で発生し食中毒菌を検出した事例について表3に示した。県域外で発生し、食中毒菌を検出した事例の詳細は確認できなかった。2年間で食中毒菌を検出した県域の27事例のうち食中毒と判断されたのは11事例で他16事例は有症苦情であった。11事例中、検出数の最も多かったカンピロバクターの事例では疫学調査で原因施設と推定されたほとんどの飲食店で鶏肉を材料とした料理を提供していた。事例7では喫食者13名中9名が非発症であったがそのうち3名から *C. jejuni* が検出された。事例12では喫食者14名中5名が非発症であったが、そのうち4名より *C. jejuni* が検出された。また有症苦情であった事例4, 15, 17では *C. coli* が検出されており、事例4では発症者2名から *C. jejuni*, *C. coli* の2菌種が重複して検出された。

次に検出数が多かったサルモネラ属菌による食中毒のうち、事例2は県外に発症者がおり共通して喫食した県域内の飲食店が疑われ調査をしたところ従業員1名から *S. Enteritidis* が検出された。事例5でも発症者2名の他に従業員2名から *S. Enteritidis* が検出された。有症苦情であった事例8は *S. Miyazaki* が発症者全員から検出されたが感染源は不明であった。

その他に食中毒となった事例1では、セレウス菌が検出された。疫学情報から露店で販売された「焼きそば」が疑われ、残品と露店施設に残っていた未開封の蒸し麺からセレウス菌が10⁹ cfu/g以上検出されたことが食中

毒と判断する大きな要因となった。セレウス菌による食中毒は過去4年間県域では認められなかった。事例16は発症者2名と食品の包装容器2検体より黄色ブドウ球菌が検出され、エンテロトキシン型別、コアグララーゼ型別とも全て一致した。また事例18, 19では広域に発生した7自治体にまたがる大規模な食中毒事件となった腸管毒素原性大腸菌O148による事例²⁾で、この2事例より長ネギを使用した食品から腸管毒素原性大腸菌O148が検出された。

平成23年度は他にも4月下旬に富山県などで発生した焼き肉チェーン店における食中毒事件³⁾で、同チェーン店を利用したとする3名の喫食者の検査を実施した。

最後に衛生研究所へ迅速な検体輸送、情報提供にご尽力いただきました各保健福祉事務所、県食品衛生課の方々に深謝いたします。

(平成24年8月1日受理)

参考文献

- 1) 厚生労働省ホームページ：食中毒事件一覧速報
 <<http://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/04.html>>
- 2) 腸管毒素原性大腸菌O148の大規模広域食中毒事例の概要, 病原微生物検出情報, 33, 9-12 (2012)
- 3) 三崎貴子, 柳楽真佐美, 八幡谷一郎, 多田有希, 谷口清洲, 岡部信彦ほか：腸管出血性大腸菌O111集団食中毒事例疫学調査の概要, 病原微生物検出情報, 33, 118 (2012)

表3 県域における食中毒菌検出事例（平成22～23年度）

事例番号	依頼年月	原因施設及び 推定原因施設	陽性数/検査数					総数	検出菌	検出遺伝子・その他
			便 (喫食者)	便 (従業員)	食品	ふきとり	その他			
1	H22.7	食品販売店	2/3	0/7	3/7	0/9	5/26	<i>B. cereus</i>	セレウリド産生遺伝子 食中毒	
2	H22.8	飲食店		1/5		0/5	1/10	<i>S. Enteritidis</i>	食中毒	
3	H22.8	家庭	1/3				1/3	EHEC O157:H7	VT2遺伝子	
4	H22.8	飲食店	3/4	0/3		0/10	3/17	<i>C. jejuni</i> <i>C. coli</i>		
5	H22.8	飲食店	2/5	2/11	0/2	0/11	1/1	5/30	<i>S. Enteritidis</i>	食中毒
6	H22.9	飲食店	2/4	0/10	0/1	0/15	3/3	5/33	<i>S. Enteritidis</i>	
7	H22.9	飲食店	5/13	0/3		0/5	5/21	<i>C. jejuni</i>	食中毒	
8	H22.10	不明	3/3				3/3	<i>S. Miyazaki</i>		
9	H22.10	飲食店	1/1	0/3	1/1	0/4	2/9	<i>C. jejuni</i>		
10	H22.11	飲食店	1/2	0/4	0/1	0/10	1/17	<i>C. perfringens</i>	エンテロトキシン産生遺伝子	
11*	H23.2	飲食店	0/7	1/15		0/10	1/32	<i>C. jejuni</i>	食中毒	
12	H23.3	飲食店	13/14	1/6		0/15	14/35	<i>C. jejuni</i>	食中毒	
13	H23.4	飲食店	2/3	0/7	0/2	0/8	2/20	<i>C. jejuni</i>		
14	H23.4	飲食店	3/4	0/5	0/1	0/9	3/19	<i>C. jejuni</i>		
15	H23.6	飲食店	5/6	0/9		0/12	5/27	<i>C. jejuni</i> <i>C. coli</i>		
16	H23.8	家庭	2/3	0/6		0/5	2/3	4/17	<i>S. aureus</i>	エンテロトキシンA遺伝子 コアグララーゼⅡ型 食中毒
17	H23.8	飲食店	1/4	1/2	0/2	0/8	0/1	2/17	<i>C. coli</i> <i>C. jejuni</i>	
18	H23.9	飲食店(給食)	6/12	0/6	4/31	0/5	10/54	ETEC O148:H28	ST産生遺伝子 食中毒	
19	H23.9	飲食店(給食)	2/8	0/11	1/25	0/10	3/54	ETEC O148:H28	ST産生遺伝子 食中毒	
20	H23.10	不明	2/2				2/2	<i>S. Enteritidis</i>		
21	H23.11	飲食店	2/2	0/2		0/6	2/10	<i>C. jejuni</i>		
22	H23.12	飲食店	1/3	0/5		0/9	1/17	<i>C. jejuni</i>		
23	H23.12	不明	2/15	0/17	0/1	0/12	2/45	<i>C. jejuni</i> <i>S. aureus</i>	エンテロトキシンD遺伝子 コアグララーゼⅡ型	
24	H23.12	飲食店	2/2	1/2		0/5	1/1	4/10	<i>C. jejuni</i>	食中毒
25	H24.1	飲食店	4/4	0/3	2/3	0/7	0/1	6/18	<i>C. jejuni</i>	食中毒
26	H24.2	飲食店	2/2	0/5		0/7	2/14	<i>C. jejuni</i>		
27	H24.3	不明	3/19				3/19	<i>C. jejuni</i>		

* ノロウイルスが原因の食中毒

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23年度)

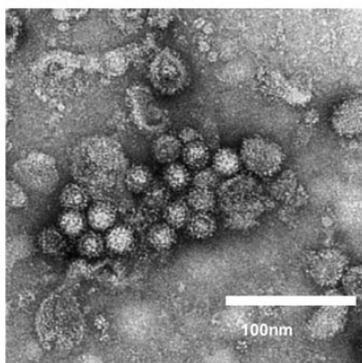
鈴木理恵子, 金城恵子, 齋藤隆行¹⁾, 古屋由美子²⁾

Surveillance of viral gastroenteritis
in Kanagawa Prefecture
(April, 2011 – March, 2012)

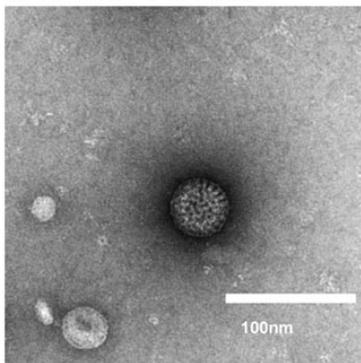
Rieko SUZUKI, Keiko KINJO, Takayuki
SAITO and Yumiko FURUYA

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。

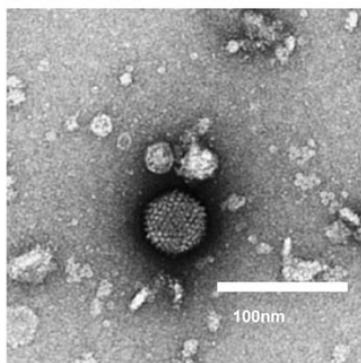
【1-1】 ノロウイルス



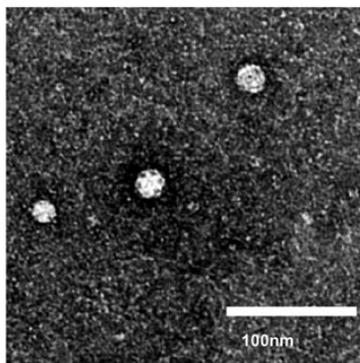
【1-2】 A群ロタウイルス



【1-3】 アデノウイルス



【1-4】 サポウイルス



【1-5】 アストロウイルス

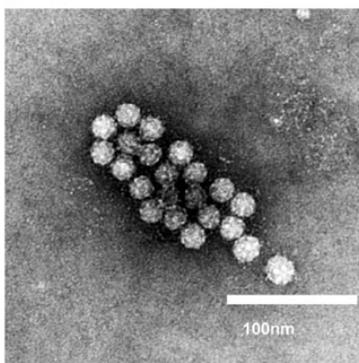


図1 平成23年度に検出されたウイルスの電子顕微鏡像

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

1) 現 企画情報部
2) 前 微生物部

平成23年4月から平成24年3月に感染性胃腸炎と診断された患者の便247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トアターアデノ（積水メディカル（株））、サポウイルスおよびアストロウイルスにはRT-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（株））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、A群ロタウイルスについてはPCRによる型別、サポウイルス、アデノウイルスおよびアストロウイルスについてはダイレクトシーケンス法を用いて型別を実施し、サポウイルスについては昨年度同様PCRによる型別も併せて実施した。

検査の結果、247検体中感染性胃腸炎を引き起こすウイルスが陽性であったのは119検体で、複数のウイルスが検出された検体が3検体あった。検出数は、ノロウイルスが69株、A群ロタウイルスが19株、アデノウイルスが12株、サポウイルスが17株およびアストロウイルス

が5株で、C群ロタウイルスは検出されず、検出ウイルス数は計122株であった。

年齢別の検体数の内訳は、6歳以下は166検体、7歳～12歳は17検体、13歳～22歳は7検体、23歳～64歳は50検体、65歳以上は7検体で、6歳以下の検体数は全体の67%を占めていた。ウイルスの検出状況は6歳以下で88検体、7歳～12歳は5検体、13歳～22歳は3検体、23歳～64歳は21検体、65歳以上は2検体から検出された。6歳以下のウイルス陽性数は全体の74%を占め、88検体中3検体で複数のウイルスが検出された。

ノロウイルスは全ての年齢層で検出され、A群ロタウイルスは6歳以下からの検出数が多く、23歳～64歳からも2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、サポウイルスは12歳以下の各年齢層で検出され、アストロウイルスは6歳以下および13歳～22歳、23歳～64歳の年齢層から検出された。6歳以下で複数ウイルスが検出された3検体のウイルスの組み合わせは、ノロウイルスgenogroup（以下、G）IおよびG II、ノロウイルスG IIおよびアデノウイルス、A群ロタウイルスおよびサポウイルスが検出された（表1）。

表1 年齢別ウイルス検出状況（平成23年4月～平成24年3月）

	検体数	陽性数	検出ウイルス						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	166	88 ¹⁾²⁾³⁾	43	17	12	16	3	0	91
7～12歳	17	5	4	0	0	1	0	0	5
13～22歳	7	3	2	0	0	0	1	0	3
23～64歳	50	21	18	2	0	0	1	0	21
65歳以上	7	2	2	0	0	0	0	0	2
合計	247	119	69	19	12	17	5	0	122

1：複数ウイルス検出例（ノロウイルスG I、G II）

2：複数ウイルス検出例（ノロウイルスG II、アデノウイルス）

3：複数ウイルス検出例（A群ロタウイルス、サポウイルス）

月別のウイルス検出状況を表2に示した。平成23年度は、122株のウイルスが検出され、この内89株（73%）が10月以降に検出されたが、8月、9月の夏期にはウイルスは検出されなかった。

ウイルスごとの検出状況をみると、ノロウイルスは本年度も例年の検出状況と同様の傾向にあり、平成23年7月から10月には検出されず、12月の検出数は37例と急増し年間検出数の半数以上を占めた。ノロウイルスは69例のうち63例がG II、6例がG I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G IとG IIの同時検出例は、12月に1例であった。

A群ロタウイルスは、19株中15株が平成24年1月から3月に検出されており、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。A群ロタウイルス19例についてPCRによる型別を実施したところ、1型が10例、型別不能が9例であった。

アデノウイルスは12株中9株が10月から12月に検出され、例年に比べ冬期の検出が多く、この時期、西湘地域および湘南地域での流行があったと考えられた。サポウイルスは平成23年5月、6月、11月から平成24年1月、3月に17株検出され、アストロウイルスは23年4月から6月、12月から平成24年1月に1株ずつ計5株が検出された。アデノウイルスおよびアストロウイルスについてダイレクトシーケンス法による型別を実施した。アデノウイルスは、12株すべてが下痢症を引き起こす41型、アストロウイルスは、5株すべてが1型であった。

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	
	G I ¹⁾	G II ²⁾			G I ¹⁾	G II ²⁾			
平成23年 4月	0	5	5	0	0	0	1	0	11
5月	0	2	0	0	7 ³⁾	0	1	0	10
6月	0	5	1	1	3 ³⁾	0	1	0	11
7月	0	0	0	1	0	0	0	0	1
8月	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9月	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10月	0	0	1	2	0	0	0	0	3
11月	2	1	0	4	2 ³⁾	0	0	0	9
12月	3	34	0	3	1 ³⁾	0	1	0	42
平成24年 1月	1	10	1	0	3 ³⁾	0	1	0	16
2月	0	3	1	0	0	0	0	0	4
3月	0	3	10	1	0	1 ³⁾	0	0	15
小計	6	63			16	1			
合計	69		19	12	17		5	0	122

- 1 : genogroup I
- 2 : genogroup II
- 3 : PCRでの型別不能の例を含む

サポウイルスについては、PCRとダイレクトシークエンス法の2つの方法によるgenogroup (以下、G) 型別を実施した。PCRでは、17株のうち10株がG I、7株が型別不能であった。ダイレクトシークエンス法では、PCRで型別不能の7株中6株がG Iに、1株がG IIに型別された結果、サポウイルス17株のうち16株がG I、1株がG IIと型別され、G III、G IVおよびG Vは両方法ともに検出されなかった。サポウイルスについては、昨年度よりG型別を実施しており、昨年度は、春期にはG Iのみの検出であったが、夏期にG IIに変わり、平成23年2月にはG IIに加え再びG Iが検出されG型に変化がみられた。平成23年度は、検出時期によるG型の変化は認められず、G Iが主体の流行であったため、G I型16株について系統樹解析を行った (図2)。G Iは、遺伝子型の違いにより1型~5型のサブタイプに分類されるが、16株はG I/1型12株、G I/2型3株、G I/3型1株であった。G I/2型2株は6月に県西地域、G I/3型1株は11月に湘南地域で検出された。また、G IIも1型~5型に分類されることから検出されたG II1株についても、系統

樹解析を行ったところG II/3型であった (図2)。

PCRで型別不能であった検体が、ダイレクトシークエンス法では型別が可能であったことは昨年度と同様であった。昨年度、PCRによる型別不能はG I型1例のみであったが、本年度はG II型でも型別不能例があったことから、PCRによる型別不能はいずれのG型でも起こりうる事が推察された。このことから、PCRによる型別は、ダイレクトシークエンス法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法を実施する必要がある (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24年 8月 1日受理)

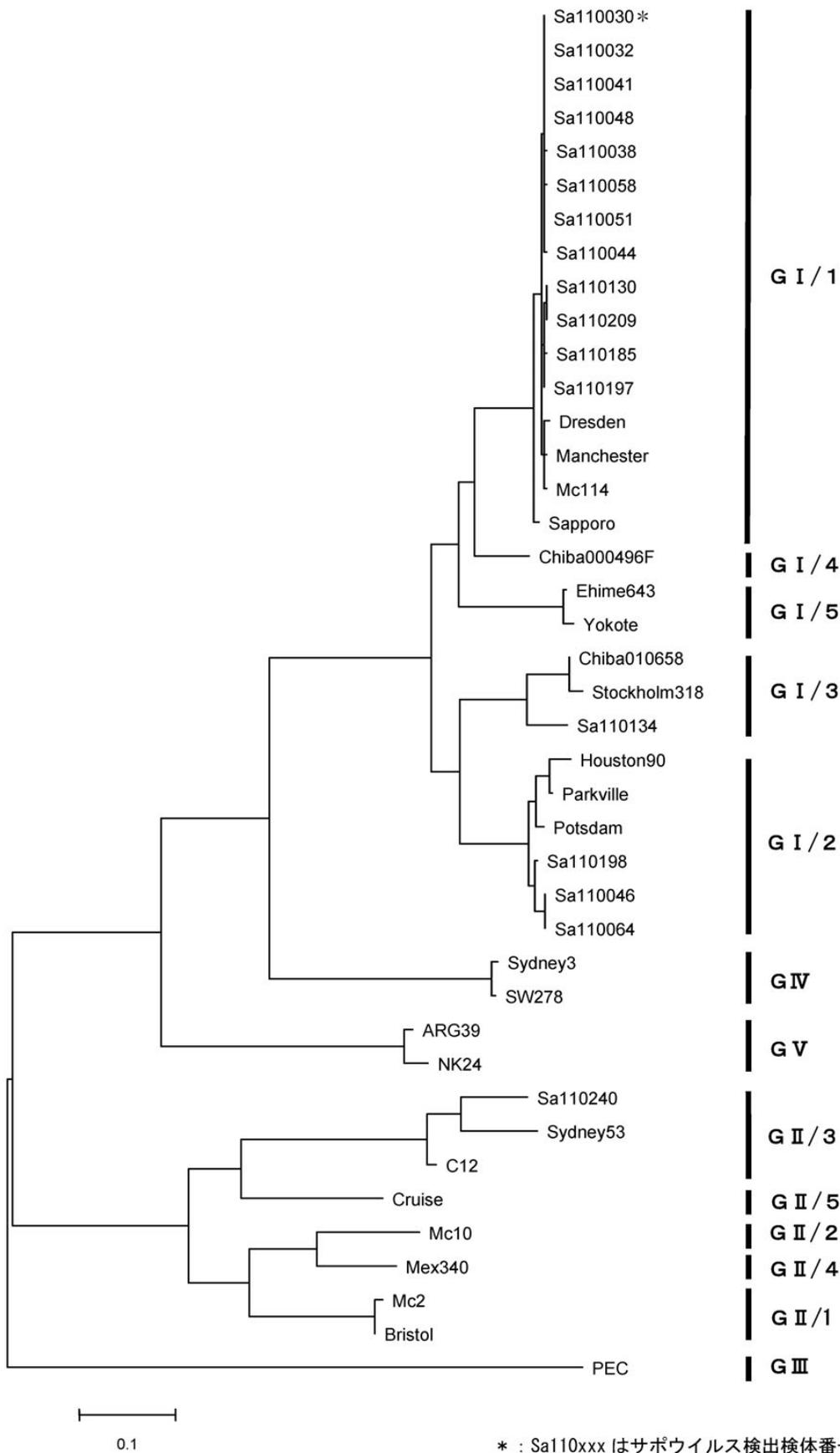


図2 サポウイルスのVP1領域の系統樹

資料

神奈川県域におけるインフルエンザの 流行状況 (2011/2012シーズン)

渡邊寿美, 佐野貴子, 近藤真規子, 齋藤隆行*

Epidemic of influenza in Kanagawa Prefecture (2011/2012 season)

Sumi WATANABE, Takako SANO, Makiko
KONDO and Takayuki SAITO

2009年4月に北米で pandemic influenza A (H1N1)2009 (以下AH1pdm09) の流行が確認されて以降, 日本では, 2009/2010および2010/2011の2シーズンに渡って, AH1pdm09が主流株となった. 両シーズンの違いは, 流行時期とAH1pdm09以外のインフルエンザウイルスの動向にあった. すなわち, 2009/2010シーズンは, 夏から冬にかけてAH1pdm09が単独流行したが, 2010/2011シーズンは, 通常のシーズンと同様に冬から春にかけてAH1pdmとAH3とBとが混合流行した. 2010/2011シーズンの流行状況をふまえて, AH1pdm09は2011年4月以降「季節性インフルエンザ」として扱われることとなったが, AH1pdm09出現後3回目のシーズンとなる2011/2012シーズンは, 各ウイルスがどのような流行動向を示すのかという点が注目された.

2011/2012シーズンの横浜市, 川崎市および相模原市を除く神奈川県内 (以下, 県域) の患者報告は, 2012年2週 (1/9~15) に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, 翌3週 (1/16~22) に注意報レベルの10.0人を, 翌4週 (1/23~1/29) に 警報レベルの30.0人を超え, 2012年になってから急増した. 患者発生のピークは, 5週 (1/30~2/5) の50.58人であり, その後減少に転じ, 終息に向かっている. 2011/2012シーズンのインフルエンザ患者報告数は, 通常のシーズンと同様の傾向で推移した (図1).

ウイルス調査は, 2011年9月~2012年3月の間にウイルスサーベイランス (通常の病原体定点調査) と入院サー

ベイランス (インフルエンザと診断された入院症例) および集団かぜ調査 (横須賀市を除く県域保健所管内の初発事例) で採取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462例, 入院サーベイランスの検体は22例, 集団かぜの検体は10集団47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とMDCK細胞によるウイルス分離とで行った. 遺伝子検出の検出対象は4種類 (AH1pdm09, AH1, AH3, B) のインフルエンザウイルスのHA遺伝子とした. また, ウイルス分離株は, 国立感染症研究所から配付された標準抗血清とモルモット血球を用いた血球凝集抑制反応により, AH1pdm09, AH3, Bビクトリア系統, B山形系統に型別した.

インフルエンザウイルス遺伝子の検出状況を見てみると, 10月に集団事例からAH3, 入院事例からBが検出され, 2011/2012シーズンは AH3とBの混合流行となる可能性が示された. 1月になるとAH3の検出数が急増して主流となり, 2月になると Bの検出数が増え, 3月以降はBが主流になった (図1). 検出されたインフルエンザウイルスの内訳は, AH3が332例 (78%), Bが93例 (22%) であり, AH1pdm09は検出されなかった (図2).

インフルエンザ検出者の年齢構成は, 0~4歳8%, 5~9歳27%, 10~14歳20%, 15~19歳5%, 20~29歳7%, 30~39歳9%, 40~49歳8%, 50~59歳4%, 60~69歳6%, 70歳以上6%となり, 広い年齢層で流行していたと考えられた. 中でも5~14歳での割合が多く, 48%を占めていた (図3). 検出型別の年齢構成を見てみると, AH3は多い順に5~9歳27%, 10~14歳21%, 30~39歳10%, 他の年齢群は4~7%であった (図4). Bは多い順に5~9歳28%, 10~14歳19%, 20~29歳13%, 他の年齢群は3~9%であった (図5). AH3もBもインフルエンザ検出者の年齢構成はほとんど同じであり, 5~14歳が流行の中心であったが, 20歳以上の成人層を比べると, AH3は30~39歳, Bは20~29歳が他の年齢群に比べて多かった.

ウイルス分離数は, AH3が100株, Bが51株であった. AH3分離株は, 8割が1月および2月の採取検体から分離された. B分離株は, 2011年12月までは数は少ないながら山形系統のみであったため, 本シーズンは山形系統が流行すると考えられたが, 2012年に入るとビクトリア系統の分離が多くなり, B分離株の内訳は, ビクトリア系統39株, 山形系統12株となり, ビクトリア系統がBの主流株であった.

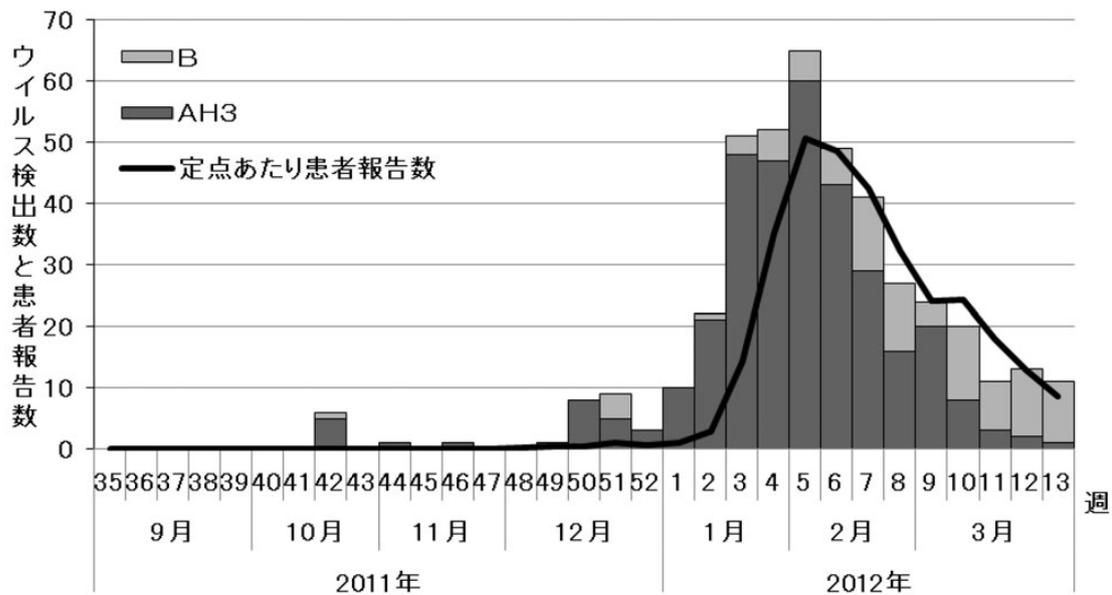


図1 インフルエンザウイルス検出数と患者報告数の推移

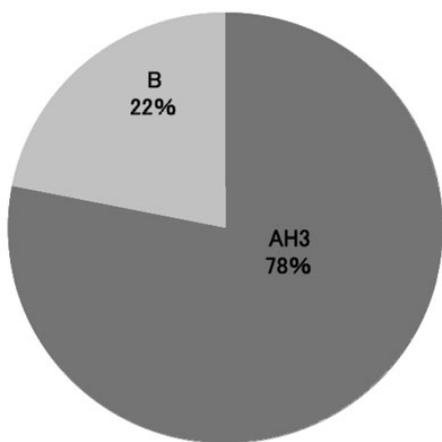


図2 インフルエンザウイルス検出割合

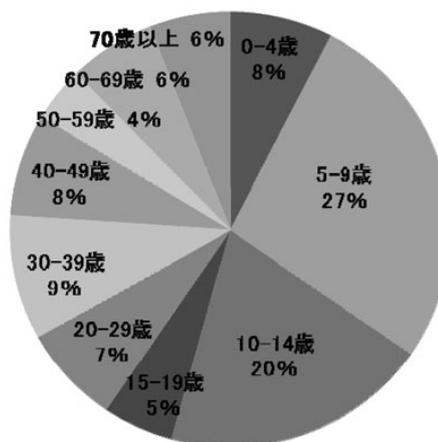


図3 インフルエンザウイルス検出者の年齢構成

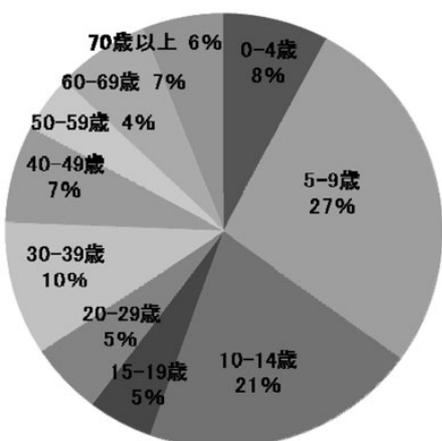


図4 AH3検出者の年齢構成

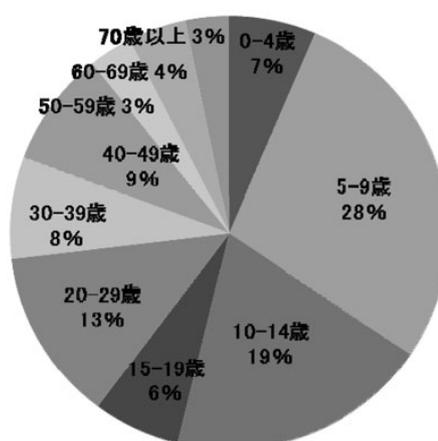


図5 B検出者の年齢構成

本シーズンから調査が始まった入院サーベイランスでは、22症例の鼻咽頭ぬぐい液についてインフルエンザウイルスの検出を行った。各症例の検体採取週は、2011年中は42週と51週に各1例ずつ、残りの20例は2012年4週～12週にかけて採取され、そのうちの14例は、定点あたりの患者報告数が30人を超えていた4～8週に採取された。インフルエンザウイルス検出結果は、AH3型13例、B型8例となり、不検出は1例であった。ウイルス検出の傾向は、2012年9週まではAH3型優位、10週以降はB型のみ検出となり、図1に示した全体のウイルス検出状況と一致していた。また、各症例の臨床症状は、21症例に発熱の記載があり、うち18症例は38

℃以上であった。発熱以外の臨床症状は、多い順に肺炎等の下気道炎6例、けいれん5例、嘔吐等の胃腸炎5例、喘息発作3例、上気道炎3例であった。けいれんを呈した患者は小児のみであり、下気道炎を呈した患者は60歳以上が多かった（6例中4例）。なお、喘息発作の3例はいずれも喘息の既往があった（表1）。

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24年 8月 1日受理)

表1 入院サーベイランス症例からのインフルエンザウイルス検出成績

症例	検体採取週	年齢	性別	臨床症状	インフルエンザウイルス検出
1	2011年42週	5歳	女	発熱(39℃)、けいれん重責	B
2	51週	79歳	女	発熱(39.3℃)、肺炎	AH3
3	2012年 4週	8歳	女	発熱(38℃)、喘息大発作	AH3
4	4週	95歳	男	発熱(38℃)	AH3
5	5週	69歳	男	発熱(38.8℃)、肺炎、気管支炎、喘息発作	AH3
6	5週	37歳	男	発熱(38.9℃)、上気道炎、下気道炎、喘息悪化	不検出
7	5週	75歳	男	発熱(38.9℃)	AH3
8	6週	26歳	男	発熱(38.6℃)	B
9	6週	3歳	男	発熱(39℃)、けいれん重責	AH3
10	6週	7歳	男	発熱(39℃)、けいれん	B
11	6週	81歳	女	発熱(38.4℃)、筋肉痛	AH3
12	7週	75歳	女	発熱(39℃)、嘔気、嘔吐	AH3
13	7週	32歳	女	発熱(38.8℃)、上気道炎	AH3
14	7週	6歳	男	発熱(39.9℃)、嘔吐、気管支炎	AH3
15	8週	82歳	女	発熱、下痢	AH3
16	8週	4歳	女	発熱(38.1℃)、けいれん	AH3
17	9週	64歳	男	発熱(39.8℃)、肺炎、ARDS、呼吸不全、腎不全	AH3
18	10週	81歳	男	下気道炎(肺炎)	B
19	11週	9歳	女	発熱(39.5℃)、上気道炎	B
20	11週	5歳	女	発熱(38.2℃)、下痢、嘔吐、嘔気	B
21	12週	15歳	男	発熱(37.6℃)、嘔吐	B
22	12週	6歳	不明	発熱(37.8℃)、けいれん	B

資料

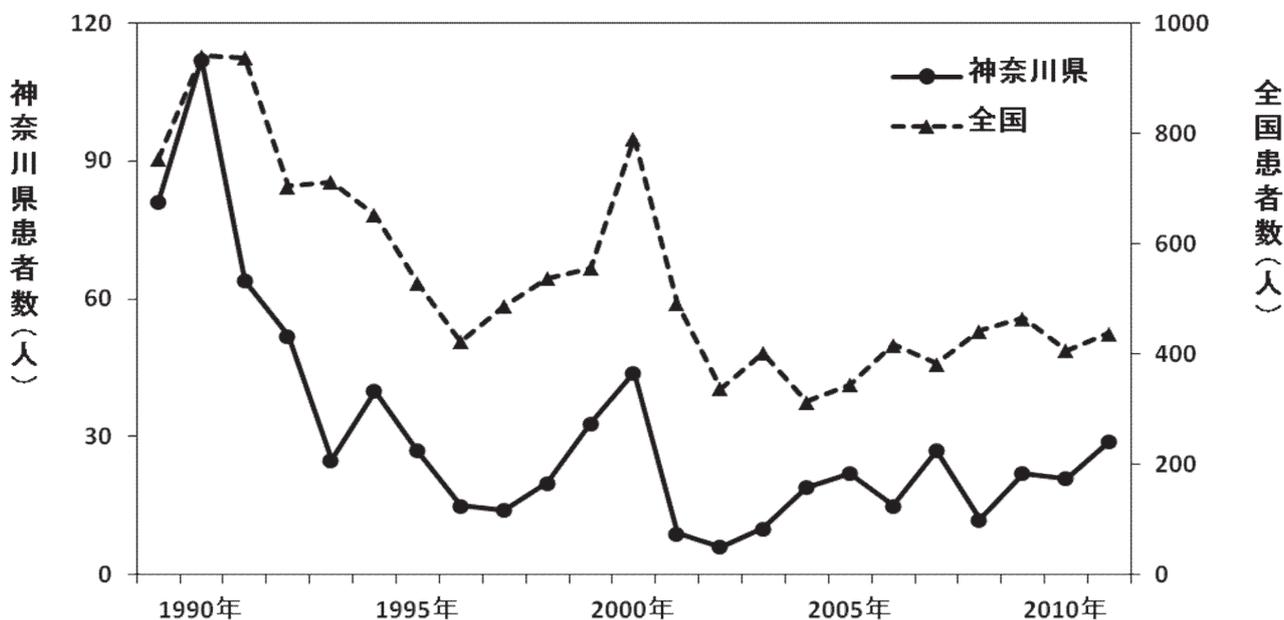
神奈川県におけるつつが虫病の
 発生状況 (平成23年度)

鈴木理恵子, 金城恵子, 片山 丘*, 齋藤隆行*
 古屋由美子**

Occurrence of tsutsugamushi disease
 in Kanagawa Prefecture
 (April, 2011 – March, 2012)

Rieko SUZUKI, Keiko KINJO,
 Takashi KATAYAMA, 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アカツツガムシ以外のツツガムシが媒介する新型が知られているが、1951年をピークに1960年代後半には全国の患者発生数が一桁になりほぼ制圧されたと思われてきた。しかし、1980年代になり各地で新型つつが虫病患者が再び急増し、1984年には約1,000名の患者発生に至り、その後減少傾向となったが、1990年、1991年には再び2年連続で患者発生数は約940名となった。その後、患者数は徐々に減少する傾向であったが、2000年には患者数が約800名と一時的に増加が見られ、2002年からの10年間の全国の患者数は300名から450名で推移している。神奈川県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見られ、1990年に112名の患者が報告された。その後、減少傾向を示すものの、1998年より増加傾向に転じ2000年に44名が報告された後、2001年は9名、2002年には6名と減少した。2003年からは年間10名から25名程度の患者数で推移し、2011年の患者発生数は29名と2010年より増加した (図1)。



(全国患者数の1999年3月までは「厚生省伝染病統計」、1999年4月以降は「感染症発生動向調査」より)

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
 ※ 現 企画情報部
 ※※ 前 微生物部

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	採血月日	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			
H23-1	女	52	2011/4/21	2011/4/21	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	保留	陰性	陰性
H23-2	女	71	2011/5/10	2011/5/13	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	保留	陰性	陰性
H23-3	男	34	2011/5/28	2011/6/22	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	陰性	陰性	陰性
				2011/7/5	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10			
H23-4	男	51	2011/7/10	2011/7/15	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	保留	陰性	陰性
H23-5	男	74	2011/10/11	2011/10/14	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	保留	陰性	陰性
H23-6	女	72	2011/10/15	2011/10/21	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	陰性	陽性(Kw)	陽性
				2011/10/26	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10			
H23-7	女	62	2011/10/10	2011/10/21	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	保留	陽性(Kr)	陽性
H23-8	女	65	2011/10/20	2011/10/24	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	保留	陽性(Kr)	陽性
H23-9	女	62	2011/10/25	2011/10/25	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	保留	陽性(Kw)	陽性
H23-10	女	45	2011/10/26	2011/10/28	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	陽性(Kw)	陽性(Kw)	陽性
				2011/11/7	<10	<10	<10	<10	<10	<10	160	40	40	20			
H23-11	男	82	2011/10/28	2011/10/31	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	保留	陽性(Kw)	陽性
H23-12	男	64	2011/10/20	2011/10/31	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	陽性(Kw)	陽性(Kw)	陽性
				2011/11/11	80	10	10	10	<10	<10	≥320	≥320	10	<10			
H23-13	男	48	2011/10/25	2011/11/1	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	保留	陽性(Kr)	陽性
H23-14	男	64	2011/10/25	2011/11/1	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	陽性(Kr)	陽性(Kr)	陽性
				2011/11/11	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	≥320			
H23-15	男	63	2011/10/28	2011/11/2	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	陽性(Kw)	陽性(Kw)	陽性
				2011/11/25	≥320	<10	20	<10	20	<10	≥320	≥320	40	10			
H23-16	男	65	2011/10/29	2011/11/2	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	保留	陽性(Kw)	陽性
H23-17	男	42	2011/10/28	2011/11/2	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	陽性(Kr)	陽性(Kr)	陽性
				2011/11/22	160	20	≥320	40	≥320	20	≥320	20	≥320	160			
H23-18	男	45	2011/10/30	2011/11/4	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	陰性	陽性(Kr)	陽性
				2011/11/15	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	10	<10	10			
H23-19	女	56	2011/10/28	2011/11/4	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	保留	陽性(Kw)	陽性
H23-20	男	74	2011/11/7	2011/11/7	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	陽性(Kw)	陽性(Kw)	陽性
				2011/11/25	160	40	80	<10	80	<10	≥320	≥320	80	20			
H23-21	男	69	2011/11/2	2011/11/8	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	陽性(Kw)	陽性(Kw)	陽性
				2011/11/28	160	80	20	<10	10	<10	≥320	160	10	20			
H23-22	女	80	2011/11/8	2011/11/10	80	40	<10	<10	<10	<10	≥320	40	<10	40	陽性(Kw)	陽性(Kw)	陽性
H23-23	女	79	2011/11/10	2011/11/11	≥320	<10	20	<10	<10	<10	≥320	20	<10	<10	陽性(Kw)	陽性(Kw)	陽性
H23-24	男	67	2011/11/5	2011/11/12	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	陽性(Kw)	陽性(Kw)	陽性
				2011/11/26	≥320	20	<10	<10	<10	<10	≥320	≥320	<10	40			
H23-25	男	71	2011/11/10	2011/11/14	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	保留	陽性(Kw)	陽性
H23-26	男	27	2011/11/3	2011/11/14	80	<10	40	<10	<10	<10	≥320	40	20	10	陽性(Kw)	陽性(Kw)	陽性
				2011/12/1	≥320	40	80	<10	80	<10	≥320	≥320	160	<10			
H23-27	男	63	2011/11/16	2011/11/20	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	陽性(Kw)	陽性(Kw)	陽性
				2011/12/2	80	<10	<10	<10	<10	<10	≥320	80	20	<10			
H23-28	女	62	2011/11/16	2011/11/22	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	保留	陰性	陰性
H23-29	女	10	2011/11/30	2011/12/3	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	保留	陰性	陰性
H23-30	男	66	2011/11/25	2011/11/29	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	陽性(Kw)	NT	陽性
				2011/12/19	<10	<10	<10	<10	<10	<10	80	40	<10	10			
H23-31	男	13	2011/12/15	2011/12/21	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	保留	陽性(Kr)	陽性

Kw : Kawasaki
 Kr : Kuroki
 NT : 検体不適のため未実施

神奈川県では、つつが虫病の病原体である *Orientia tsutsugamushi* (以下 *O. tsutsugamushi*) を用いた immunofluorescence assay (IFA) による血清診断およびPCRによるつつが虫の遺伝子診断と感染株の型別を行っている。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。

2011年4月から2012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22例、秦野保健福祉事務所管内5例、小田原保健福祉事務所管内3例、厚木保健福祉事務所管内1例の合計31例であった。これらの検体について検査結果を表1に示した。

IFAのつつが虫の診断は、急性期・回復期の血清抗体価の上昇(4倍以上の差)または急性期の抗体検出(IgM抗体価が80倍以上)が見られた場合に陽性と判定し、31例(45検体)についてIFAを行った。急性期・回復期の両検体が搬入された14例中11例が血清抗体価の上昇(4倍以上の差)があり、1例は急性期血清でも陽性と判定された。急性期検体のみが搬入された17例中2例はIgM抗体価で80倍以上の抗体が検出され、計13例がIFAでつつが虫病と診断された(表2)。

IFAは急性期のみの検体で判定できることは少なく、急性期および回復期血清のペア血清における血清抗体価の上昇により判定することが重要である。

PCRによる急性期の血液または痂皮を用いた *O.tsutsugamushi* の遺伝子診断を30例について行った。IFAでつつが虫病と診断された13例中PCRを実施したのは12例で、全検体から遺伝子が検出された。IFA判定保留と判定された15例中9例、IFA陰性と判定された3例中2例から遺伝子が検出され、30例中23例がつつが虫患者と診断された(表3)。

表2 神奈川県域で感染したと思われる患者血清のIFA結果

血清	症例数	IFA判定					計
		Gilliam	Karp	Kato	Kawasaki	Kuroki	
急性期	17	0	0	0	2	0	2
急性期・回復期*	14	0	0	0	9	2	11
合計	31	0	0	0	11	2	13

* : 急性期・回復期のペア血清で判定

表3 神奈川県域で感染したと思われる患者検体のPCR結果

IFA結果	症例数	PCR結果					計
		Gilliam	Karp	Kato	Kawasaki	Kuroki	
陽性	12	0	0	0	10	2	12
判定保留	15	0	0	0	5	4	9
陰性	3	0	0	0	1	1	2
計	30	0	0	0	16	7	23

IFAおよびPCRによる総合判定では、IFA陽性・PCR陽性例が12例、IFA判定保留・PCR陽性例が9例、IFA陰性・PCR陽性例が2例、IFA陽性・PCR未実施例が1例で計24例がつつが虫病と診断された。

近年、PCRによる遺伝子診断が先行することから、IFAによる血清診断例が減少傾向にある。PCRは、急性期の血清抗体価が低い場合でも、血液からDNAを抽出し遺伝子診断が可能であるという利点がある。しかし、急性期の血液検体でも、血清抗体価が高く、すでに血液中の病原体が消失している場合や、治療薬の投与により血液中の病原体が消失した場合には遺伝子は検出ができなくなる。このような場合には、刺し口に残る痂皮を検体としての遺伝子診断が可能である。PCRで陰性例であっても、過去に回復期血清のIFAで陽性となった例があることから、PCRと急性期・回復期のIFAの2つの方法の併用により、より確実な診断を行う必要がある。

O.tsutsugamushi DNAが検出された23例について型別用のプライマーを用いたPCRを行い、神奈川県で発生しているつつが虫の感染株について検索を行った(表3, 4)。本年度に県内で感染が見られた株はKawasakiおよびKurokiの2株であり、それぞれ16例(69.6%)、7例(30.4%)であり大部分がKawasaki株による感染であった。

2002年から過去10年間における神奈川県域で感染したと思われる患者感染株はKarp, Kawasaki, Kurokiの3株である。例年Kawasaki株による感染が多く、101例(74.8%)検出され、次いでKuroki株の27例(20.0%)であった。Karp株は7例(5.2%)と年間1例から2例程度の感染にとどまり、本年のように感染が確認できない年もあった(表4)。

表4 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	症例数	型別		
		Karp	Kawasaki	Kuroki
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	13	2
2011	23	0	16 (69.6)	7 (30.4)
合計	135	7 (5.2)	101 (74.8)	27 (20.0)

() 内は%

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、例年、足柄上郡山北町、松田町および南足柄市の3地区に集中している。本年は感染推定地域が不明の2例を除いた22例は、例年の3地区に加え、秦野市、小田原市、足柄上郡開成町、愛甲郡愛川町の計7地域に広がった(図2)。また、感染推定地域に型別された病原体の株を示すと、山北町はKawasaki株7例、Kuroki株1例、南足柄市はKawasaki株3例、Kuroki株2例、秦野市はKawasaki株4例、Kuroki株1例、愛川町はKawasaki株1例、小田原市、松田町、開成町はKuroki株が各1例で、感染推定地域不明の2例はいずれもKawasaki株であった(図2)。

発生時期は主に10月から12月で、10月が14例(58.3%)、11月が9例(37.5%)、12月が1例(4.2%)であっ

た。例年は11月に発生件数が多い傾向にあったが、本年度は10月下旬に集中した患者発生が見られた。感染時の行動は、山地の畑や水田での農作業、森林作業または庭仕事が多かった。本年度は秦野市内からの報告例が例年より多い5例が報告され、感染推定地域は山地での森林作業等が3例、住宅地での庭仕事2例で平地での感染例もあった。また、感染推定地域不明の2例はいずれも秦野保健福祉事務所管内からの患者発生届出で、山地等、感染を疑う場所へ立ち入りできなかった症例であった。

最後に患者情報の収集にご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ご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24年8月1日受理)

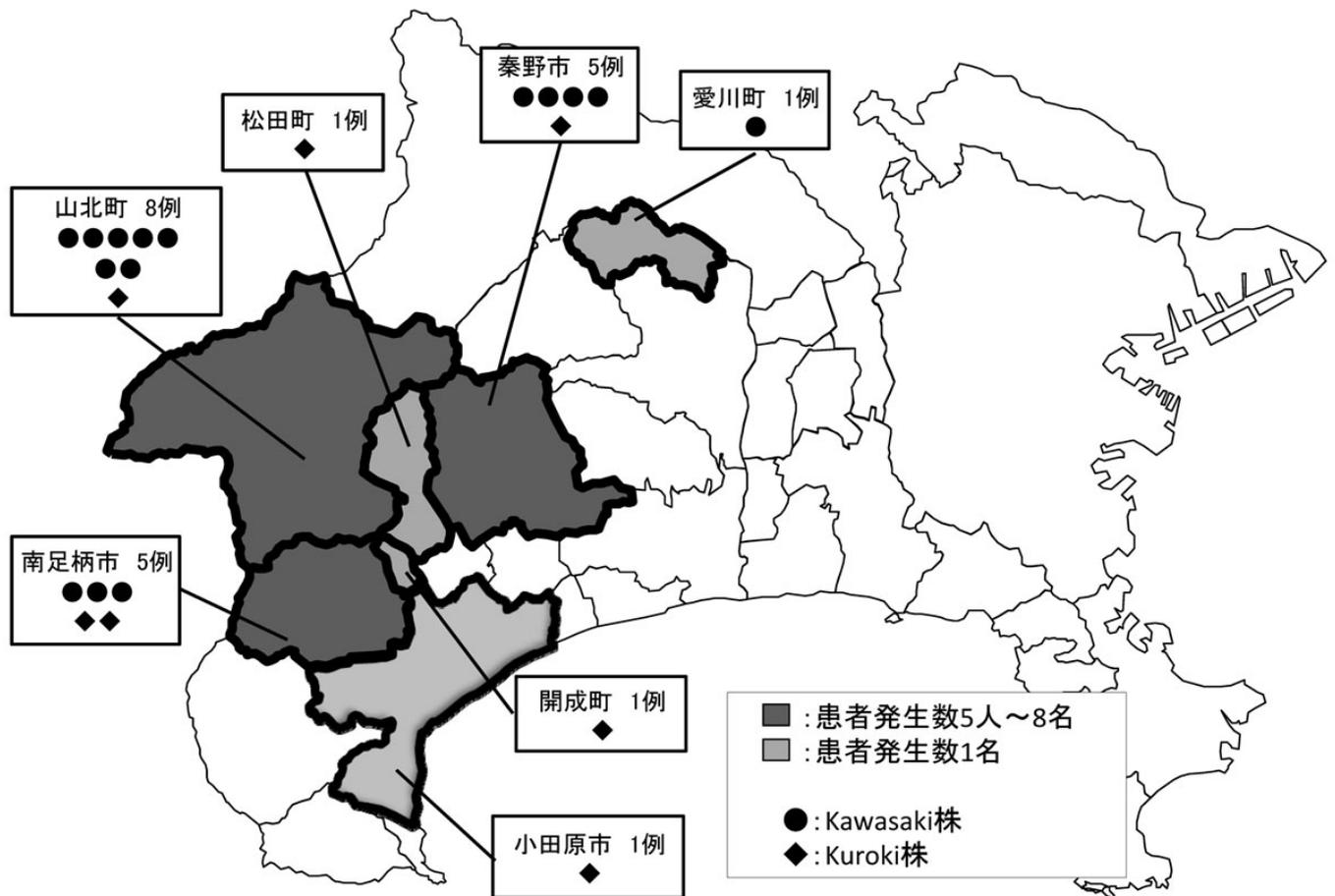


図2 つつが虫病発生地域と感染株 (2011年)

資料

遺伝子組換え食品の分析結果
 (平成23年度)

大森清美, 酒井康宏, 関戸晴子,
 田中由紀子, 岸 弘子

Analytical results of genetically
 modified foods in Kanagawa Prefecture
 (2011)

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

2011年の世界の遺伝子組換え (GM) 作物の栽培面積は、2010年の栽培面積合計の8%に相当する1200万ヘクタールが増加し、1億6000万ヘクタールとなった。遺伝子組換え作物の商業栽培が開始された1996年と比較すると、94倍の増加である¹⁾。日本では食品としての商業栽培は行われていないが、2001年(平成13年)4月からはGM作物含有食品の表示が義務づけられている。それともない、厚生労働省および農林水産省から検査法が通知され、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を確認するための定量試験法、また安全性未審査のGM作物については食品中への混入の有無を調べるための定性試験法が示されている²⁻⁴⁾。神

奈川県は平成13年度から食品中の組換え遺伝子について検査を開始し、平成23年度には60検体の検査を実施した。本報では平成23年度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。なお、害虫抵抗性遺伝子組換えコメの63Bt, NNBtおよびCpTIの定性試験は、平成23年1月6日付で改正され、リアルタイムPCR法のみを用いた検知法となった厚生労働省通知(食安監発0106第6号)別添通知法に従った。表1に、平成23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、遺伝子組換えトウモロコシのCBH351およびBt10、害虫抵抗性遺伝子組換えコメの63Bt, NNBtおよびCpTIについて定性試験を行った。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作物の意図せざる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に共通な配列である35Sプロモーターの定量値および35Sプロモーター配列

表1 平成23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	組換え遺伝子	内在性遺伝子
コメ	米粉	2					
	ビーフン	5	定性	リアルタイムPCR法	(NIPPON GENE) GM quicker2変法	63Bt/NNBt/CpTI	PLD
	ライスペーパー	1					
トウモロコシ	トウモロコシ穀粒	4			(QIAGEN)DNeasy Plant Mini Kit 法	CBH351/Bt10	
	コーンスナック菓子	3	定性	PCR-アガロースゲル電気泳動法	(QIAGEN)Genomic-tip 20G Kit 法	CBH351	Zein
	コーンスープ	2					
	トウモロコシ缶詰	5					
	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	SS II b
大豆	大豆穀粒	12			(QIAGEN)DNeasy Plant Mini Kit 法		
	豆腐	12	定量	リアルタイムPCR法	(QIAGEN)Genomic-tip 20G Kit 法	RRS	Le1
	厚揚げ	9					
	焼豆腐	1					
	合計	22	定性				
		38	定量				

*Event176, Bt11, T25, Mon810のスクリーニング

を含まないGA21の定量値の和により、スクリーニング試験を行うこととされている²⁾。平成23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、いずれの検体からも35SプロモーターおよびGA21は検出されなかった(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、カナダ産4検体およびアメリカ産1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加工食品については通知法に準じた定量試験を実施している。その結果から表示違反が疑われた場合には、原料の大豆穀粒について通知法の定量試験を実施し、最終判定を行うこととしている。平成23年度には豆腐、厚揚げおよび焼豆腐の大豆加工食品22検体についてRRSの検査を実施した結果、21検体で定量下限値未満の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、開始した平成17年度にはRRSの微量混入が10検体中1検体のみあったが、18年度以降は毎年12検体以上の検査を実施している中で、7割以上の検体でRRSの微量混入が認められている。大豆は世界的にもGM作物の普及率が高い作物であり、日本の最大の輸入国であるアメリカでは、2011年における大豆全体の耕地面積の94%がGM大豆であった¹⁾。そのような現状から、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難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おり¹⁾、今後も非GM作物へのGM作物混入の可能性は高まることが危惧される。2011年2月には、安全性未審査の遺伝子組換えパパイヤ (PRSV-YK) の加工食品が日本国内で検出された⁷⁾。GM食品の適切な表示と食品の安全性確保のため、引き続き GM作物の検査と監視を実施していく必要があるものとする。

(平成24年8月1日受理)

表 2 平成23年度 組換え遺伝子定性試験結果

No.	品目	原料産地	組換え遺伝子	結果	GMに関する表示
1	米粉	記載なし	63Bt/NNBt/CpTI	不検出	なし
2	米粉	記載なし	63Bt/NNBt/CpTI	不検出	なし
3	ビーフン	ベトナム	63Bt/NNBt/CpTI	不検出	なし
4	ビーフン	ベトナム	63Bt/NNBt/CpTI	不検出	なし
5	ビーフン	タイ	63Bt/NNBt/CpTI	不検出	なし
6	ビーフン	タイ	63Bt/NNBt/CpTI	不検出	なし
7	ビーフン	台湾	63Bt/NNBt/CpTI	不検出	なし
8	ライスペーパー	ベトナム	63Bt/NNBt/CpTI	不検出	なし
9	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
10	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
11	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
12	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
13	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
14	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
15	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
16	コーンスープ	記載なし	CBH351	不検出	遺伝子組換えでない
17	コーンスープ	記載なし	CBH351	不検出	遺伝子組換えでない
18	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
19	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
20	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
21	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
22	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

表3 平成23年度 組換え遺伝子定量試験結果

No.	品目	原料産地	組換え遺伝子	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	アメリカ	35S/GA21	不検出	遺伝子組換えでない
5	大豆穀粒	カナダ	RRS	不検出*	IPハンドリングあり
6	大豆穀粒	カナダ	RRS	不検出*	IPハンドリングあり
7	大豆穀粒	カナダ	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	アメリカ	RRS	不検出*	IPハンドリングあり
14	大豆穀粒	アメリカ	RRS	不検出	IPハンドリングあり
15	大豆穀粒	アメリカ	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	豆腐	カナダ	RRS	不検出*	遺伝子組換えでない
18	豆腐	カナダ	RRS	不検出*	遺伝子組換えでない
19	豆腐	アメリカ・カナダ	RRS	不検出*	遺伝子組換えでない
20	豆腐	アメリカ・カナダ	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	アメリカ・カナダ	RRS	不検出*	遺伝子組換えでない
23	豆腐	記載なし	RRS	不検出*	遺伝子組換えでない
24	豆腐	記載なし	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	厚揚げ	記載なし	RRS	不検出*	遺伝子組換えでない
30	厚揚げ	記載なし	RRS	不検出*	遺伝子組換えでない
31	厚揚げ	記載なし	RRS	不検出*	遺伝子組換えでない
32	厚揚げ	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
35	厚揚げ	記載なし	RRS	不検出*	遺伝子組換えでない
36	厚揚げ	記載なし	RRS	不検出*	遺伝子組換えでない
37	厚揚げ	記載なし	RRS	不検出	遺伝子組換えでない
38	焼豆腐	記載なし	RRS	不検出*	遺伝子組換えでない

* 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) James, Clive. 2011. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2011, ISAAA Brief No. 43, ISAAA: Ithaca, NY
- 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0106第6号, 平成23年1月6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)
- 7) 厚生労働省: 安全性未審査の遺伝子組換えパパイヤについて
<<http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/iyaku/syoku-anzen/qa/110222-1.html>>

他誌掲載論文抄録

(平成23年4月～平成24年3月)

High incidence of rickettsiosis correlated to prevalence of *Rickettsia japonica* among *Haemaphysalis longicornis* tick

(フタトゲチマダニに浸淫する *Rickettsia japonica* を主因としたリケッチア症の流行)

田原研司 (島根保環研), 川端寛樹, 新井智 (国立感染症研), 板垣朝夫 (島根保環研), 山内健生 (富山衛研), 片山丘 (神奈川衛研), 藤田博己 (大原総合病院), 高田伸弘 (福井大学), J. Vet. Med. Sci., 73(4), 507-510 (2011)

島根県では, 1987年に本症の初発例が見出されて以降, 2009年までに110例の患者が見出されているが, その全例が県東部日本海側に位置する島根半島で報告されている。また, そのうち102例が島根半島西端部にある弥山山地内で感染したと推定されていたことから, この症例の集積性を規定する何らかの環境因子の存在が推定された。本研究では, これら患者から見出されるリケッチア種が *R. japonica* であること, また日本紅斑熱患者の地域集積性を規定する因子としては, フタトゲチマダニの優勢な病原体保有とニホンジカの生息がリスク因子として見出された。

One-step detection of the 2009 pandemic influenza A(H1N1) virus by the RT-SmartAmp assay and its clinical validation

(SmartAmp法を用いたインフルエンザウイルスA(H1N1)2009の検出と臨床研究)

川井雄輝, 木村恭将, レジャバアレクサンダー, 金森基, 臼井健悟, 花見健志, 相馬崇裕, モルリゲムジャン-エティエンヌ, 佐賀聡美, 石津有里, 青木伸太郎, 遠藤竜太, 片山敦子, 向後泰司, 三谷康正, 石田尾武文, 林崎良英, 石川智久 (理化研), 川上千春, 蔵田英志 (横浜市衛研), 古屋由美子, 齋藤隆行, 岡崎則男 (神奈川衛研), 近平雅嗣 (兵庫健科研センター), 林英二, 鶴岡誠一, 外口徳美致, 平井愛山 (千葉県立東金病院), 齊藤美朝, 伴俊明 (いすみ医療センター), 泉信有, 瓜生英子, 工藤宏一郎 (国立国際医療研究センター), 坂井優子, 河岡義裕 (東大医科研), PLoS ONE, 7(1), e30236 (2012)

新規等温核酸増幅技術 SmartAmp 法 (Smart Amplification Process) を応用して, 鼻咽頭ぬぐい液検体中のインフルエンザウイルスA(H1N1)2009を検出する方法とそのプライマーを開発した。このプライマーの特異性を検証するために, 44種類のウイルスおよび22種類の細菌株を用いて交差試験を実施した。その結果, 供試したウイルスおよび細菌株とは交差反応を示さなかった。また, 季節性のインフルエンザウイルスAH1,AH3およびB型に対しても交差反応を示さず, A(H1N1)2009に対して特異性が高いことが示された。臨床検体については, 2009年10月から2010年1月の期間に東京・千葉地区の医療機関で採取された鼻咽頭ぬぐい液255検体について, SmartAmp法によるA(H1N1)2009の検出を実施した。その結果, インフルエンザ迅速診断キットでA型と診断された110検体中104検体および迅速診断キット陰性であった145検体中36検体からSmartAmp法によりA(H1N1)2009が検出された。A(H1N1)2009が検出された患者の約20%が発症から6時間以内であった。SmartAmp法では, PCR法のように温度を上下させる必要がないため, 逆転写酵素反応とDNA増幅反応 (SmartAmp 反応) を同一のチューブで同時に行うことができ, A(H1N1)2009の検出・同定を迅速簡便かつ高感度に検出することができる。

Identification and Detection Method for Genetically Modified Papaya Resistant to Papaya Ringspot Virus YK Strain

(パパイヤリングスポットウイルスYK株耐性の遺伝子組換えパパイヤの同定および検出法)

中村公亮, 穂山浩 (国立衛研), 大森清美 (神奈川衛研), 高橋由紀 (星薬科大), 高島玲於奈, 橘田和美 (食総研), 中沢裕之 (星薬科大), 近藤一成, 手島玲子 (国立衛研), Biol. Pharm. Bull., 34(10), 1648-1651 (2011)

日本で食品としての流通が許可されていない遺伝子組換えパパイヤ (*Carica papaya* LINNAEUS) が, パパイヤを主原料とする流通加工食品から検出された。我々は, パパイヤリングスポットウイルス (PRSV) YKによる病気に抵抗性の配列をもつ組換えベクターを検出し, パパ

イヤ製品の遺伝子組換えパパイアの混入を定性的に監視するためのリアルタイムPCRを用いた特異的な検出方法を開発した。

Characteristics of cesium accumulation in the filamentous soil bacterium *Streptomyces* sp. K202

(土壌放線菌 *Streptomyces* sp. K202によるセシウム蓄積における特性)

桑原千雅子 (神奈川県衛研), 福本敦 (東邦大学・東京理科大), 仁科雅美 (埼玉医大), 杉山英男 (国保健医療科学院・平成帝京大学), 安齊洋二郎, 加藤文男 (東邦大学), J. Environ. Radioact., **102**, 138-144 (2011)

土壌放線菌, K202は食用キノコのクロカワが生息していた土壌より分離した。形態的特徴とLL-2,6-diaminopimelic acidの存在から *Streptomyces* 属と同定した。土壌放線菌による高いセシウム (Cs) 蓄積性を解明す

るために, *Streptomyces* sp. K202の菌糸内におけるCsの存在状態ならびにCsの細胞内への移行について調べた。その結果, Csは少なくとも二つの段階によって取込まれることが分かった。まず, Cs⁺は負に荷電している細胞表面に急速かつ非特異的に吸着し, 次に, この細胞表面に吸着したCsが細胞質中に取込まれた。この細胞質へのCs取込の一部は, エネルギー依存輸送システムを介すること, また K輸送系も介していることが示唆された。さらに, Csを蓄積したK202菌糸の¹³³Cs-NMRスペクトルとSEM-EDXスペクトルの結果から, 細胞内のCsには少なくとも2通りの存在状態があり, 1つはポリリン酸様の細胞内物質によってトラップされたCs, もう1つは細胞質プールに存在するCsがあることを明らかにした。このポリリン酸様物質にCsをトラップし, 細胞内に局在化させることが, Csの毒性を受けることなく細胞内にCsを高蓄積できる要因と推定している。

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 published, 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.42 (September, 2012)

CONTENTS

Review

- Re-emerging infectious disease — Tsutsugamushi disease —
Yumiko FURUYA 1

Short reports

Surveillance study on monitoring and prevention of infectious disease

- Epidemiological and virological studies of hand, foot and mouth disease and
herpangina cases in Kanagawa Prefecture
Takako SANO, Minoru KONNAI, Makiko KONDO, Sumi WATANABE and Takayuki SAITO 11

Surveillance study to assure safety of food products and medicine

- Analysis of *Fusarium* mycotoxins in grain products using liquid chromatography / tandem mass spectrometry
Shigemi KAI, Norihito KOSUGE, Masumi WAKI and Hiroko KISHI 17
- Analysis of antibiotics in livestock products by high-performance liquid chromatography
using clean up with metal chelate solid phase extraction column
Norihito KOSUGE, Masumi WAKI, Shigemi KAI and Hiroko KISHI 22
- Simultaneous analysis of preservatives in cosmetics by high-performance liquid
chromatography/photodiode array detection
Chikako HADA, Kenichi KUMASAKA and Maki MIYAZAWA 27

Data

Surveillance study on monitoring and prevention of infectious disease

- Occurrence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in Kanagawa Prefecture (April, 2011 - March, 2012)
Ichiro FURUKAWA, Tomoe ISHIHARA and Yuko WATANABE 32
- Occurrence of bacterial foodborne disease in Kanagawa Prefecture (2010 - 2011)
Akiko KOIZUMI, Miyuki HARA, Yoshimi DATE and Kayoko NIWA 35
- Surveillance of viral gastroenteritis in Kanagawa Prefecture (April, 2011 - March, 2012)
Rieko SUZUKI, Keiko KINJO, Takayuki SAITO and Yumiko FURUYA 38
- Epidemic of influenza in Kanagawa Prefecture (2011/2012 season)
Sumi WATANABE, Takako SANO, Makiko KONDO and Takayuki SAITO 42
- Occurrence of tsutsugamushi disease in Kanagawa Prefecture (April, 2011 - March, 2012)
Rieko SUZUKI, Keiko KINJO, Takashi KATAYAMA, Takayuki SAITO and Yumiko FURUYA45

Surveillance study to assure safety of food products and medicine

- Analytical results of genetically modified foods in Kanagawa Prefecture (2011)
Kiyomi OHMORI, Yasuhiro SAKAI, Haruko SEKIDO, Yukiko TANAKA and Hiroko KISHI 49

-
- Abstracts of original papers by research staffs (April, 2011 - March, 2012) 52
-