

神奈川県衛生研究所研究報告

第49号（令和元年10月）

目次

総説

食品と医薬品の安全・安心に関する調査研究

危険ドラッグの生体影響試験について

宮澤真紀 1

短報

感染症の監視と予防に関する調査研究

神奈川県域の保健所等におけるHIV検査数の推移と陽性例の解析

佐野貴子, 嘉手苜将, 渡邊寿美, 鈴木理恵子, 稲田貴嗣, 近藤真規子 7

食品と医薬品の安全・安心に関する調査研究

ダイズ穀粒の組換えDNA定量検査における解析方法の検討

垣田雅史, 内山陽介, 田中由紀子, 関戸晴子, 大森清美 13

フェニルカラムを用いた液体クロマトグラフィーによる化粧品中の防腐剤の一斉分析法の検討

羽田千香子, 甲斐茂美, 熊坂謙一, 宮澤真紀 18

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30年度）

古川一郎, 政岡智佳, 中嶋直樹 22

神奈川県域の公園における蚊の生息状況

稲田貴嗣 26

感染性胃腸炎患者からの原因ウイルス検出状況（平成30年度）

鈴木理恵子, 高橋淳子, 日紫喜隆行, 近藤真規子 29

神奈川県域におけるインフルエンザの検出状況（2018/2019シーズン）

渡邊寿美, 嘉手苜将, 佐野貴子, 稲田貴嗣, 近藤真規子 32

食品と医薬品の安全・安心に関する調査研究

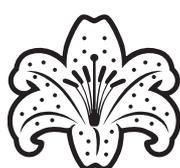
コメの組換えDNA検査方法におけるマスターミックスの同等性確認について

大森清美, 垣田雅史, 田中由紀子, 関戸晴子 35

野菜エキス等を使用した食肉製品中の亜硝酸根の含有量調査

松阪綾子, 森口真理子, 殿原真生子, 横溝香 39

他誌掲載論文抄録（平成30年4月～平成31年3月） 41



県の花：山ゆり

神奈川県衛生研究所（令和元年度）

| | |
|------|------|
| 高崎智彦 | 山下穰 |
| 白井政美 | 寺西大 |
| 玉木博志 | 関戸晴子 |
| 櫻木淳一 | 宮澤真紀 |
| 白土弘美 | |

神奈川県衛生研究所研究報告編集員（令和元年度）

| | |
|-----------|-------|
| 玉木博志（編集長） | 福田武二郎 |
| 田坂雅子 | 中嶋直樹 |
| 佐野貴子 | 関戸晴子 |
| 芳賀勇太 | 殿原真生子 |
| 渡邊裕子（事務局） | |

神奈川県衛生研究所研究報告第49号

令和元年10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

危険ドラッグの生体影響試験について

宮澤眞紀

Neurobehavioral assays to evaluate the effect of illegal drugs

Maki MIYAZAWA

Key Words : 危険ドラッグ, 条件付け場所嗜好性試験, CPP 試験

はじめに

近年、麻薬や覚せい剤と同様に、興奮、多幸感や幻覚作用を得るために危険ドラッグが流通し、乱用による交通事故や救急搬送が頻発し大きな社会問題となっている。危険ドラッグは、麻薬や覚せい剤の代替として使用され、化学構造も従来の麻薬や覚せい剤成分の側鎖を変化させた類似化合物であり、数百以上の物質が存在し、ほとんどが新規化合物である。

危険ドラッグを迅速に規制するため、2007年に薬事法（現医薬品医療機器等法）が改正され、乱用の実態があるものについては指定薬物として規制されることとなった¹⁾。しかし、特定の危険ドラッグを指定して規制しても、類似の化学構造を有する危険ドラッグがすぐに流通し、いわゆるいたちごっこの状態が長く続いている。

一方、これらの指定薬物については、事件、事故が起こっているにもかかわらず、有害性に関する科学的データは少ない。特に依存性に関する情報は指定薬物の指定に必須の情報ではなく、ほとんどない状態である。

そこで本総説では、当所で行った危険ドラッグの依存性試験を中心に、危険ドラッグの生体影響を測定する動物実験について報告する。

危険ドラッグとは

危険ドラッグの流通が問題になり始めた1998年頃は、これら乱用薬物が麻薬や覚せい剤などの規制薬物ではないために合法ドラッグと呼ばれていた。しかし、その実態は法律による規制の網をすり抜けるために化学構造を

改変した規制薬物の類似物質であることから、脱法ドラッグと呼ばれるようになった。その後、その違法性や問題性を明確にするために、2005年に厚生労働省は“違法ドラッグ（いわゆる脱法ドラッグ）”と呼び方を改め法規制を進めたが、事件事故が頻発したため、その危険性を周知することを目的に、2014年より危険ドラッグという呼称に再度改めた²⁾。

危険ドラッグは粉末や液体、植物などの形状で流通し、人体に使用することを製品に表記することは違法になるため、クリーナー、バスソルト、ハーブ、お香等の名目で販売されていた。デザイン性が高いパッケージを使用し、主にインターネットや路上で販売され、カプセルトイによる販売などもあり、比較的安価であることから、未成年や20代の若者に急速に浸透していった。

流通する化学物質も法規制の網をかいくぐり、様々に変化している^{3,4)}。亜硝酸イソアミル（2007年指定薬物）などの亜硝酸アミル、BZP（1-benzylpiperazine, 2003年麻薬指定）などのピペラジン類、5-MeO-DIPT（5-methoxy-N,N-diisopropyltryptamine, 2005年麻薬指定）などのトリプタミン類、2C-T-7（2,5-dimethoxy-4-(n)-propylthiophenethylamine, 2006年麻薬指定）などのフェネチルアミン類、methyline（2007年麻薬指定）などのカチノン類、JWH-018（1-pentyl-3-(1-naphthoyl)indole, 2012年麻薬指定）などの合成カンナビノイド類等が主な化合物である。近年では、AH-7921（3,4-dichloro-N-[[1-(dimethylamino)cyclohexyl]methyl]benzamide, 2015年麻薬指定）などのオピオイド受容体に作用する薬物、diphenidine（1-(1,2-diphenylethyl)piperidine, 2014年指定薬物）などのフェンサイクリジン系薬物や一酸化二窒素（2016年指定薬物）など新たな物質が流通している。

危険ドラッグの作用

危険ドラッグは、麻薬、覚せい剤や向精神薬など既存の向精神作用を有する規制薬物の類似化合物である。したがって、規制薬物と同様に中枢神経系に作用し、興奮、鎮静、幻覚、多幸感などをひきおこすことを期待して使用される。しかし実際は、規制薬物の化学構造の一部が変化しただけで既存の規制薬物より強い薬理作用を有する化合物がある一方、作用が消失している化合物もある。また、予想外の毒性作用を有する可能性もあり、個々の化合物について生体影響を明らかにする必要がある。

危険ドラッグの生体影響試験

危険ドラッグの危険性は、化学構造、神経伝達物質の動態、動物への行動影響や神経毒性作用等によって評価



clear plastic cage
(41.5 × 25 × 18.5cm)
in locomotor activity
measuring system

open field apparatus
(45 × 45 × 30cm)

light/dark box
(29 × 15 × 10cm)

Fig. 1 Apparatus for detecting neurobehavioral effects on illegal drugs

される。危険ドラッグが引き起こす興奮、多幸感、幻覚や依存性といった生体影響を明らかにするために、様々な細胞試験や動物実験が行われている。

細胞試験としては、培養神経細胞株を用いた細胞毒性試験や神経伝達物質受容体やモノアミントランスポーターに対する作用測定など、動物実験では、マイクロダイアリシス法による中枢神経内のモノアミンなどの神経伝達物質測定、自発運動量測定、神経毒性試験および行動薬理試験、依存性試験などが実施されている。

当所では、「合法ドラッグ」として危険ドラッグが社会問題化した2003年頃より、危険ドラッグの生体影響を明らかにし、その危険性を周知するため、自発運動量測定試験、神経毒性試験および行動薬理試験、依存性試験として条件付け場所嗜好性試験を行っている。

1. 実験動物および飼育条件

危険ドラッグの生体影響について動物実験を行う場合、実験に供する十分量の薬物の確保が難しいため、体重が軽いマウスを用いる。当所では、8~13週齢の雄性マウス(Slc:ddY 日本エスエルシー)を使用した。飼料(CE-2 日本クレア)および水道水は自由摂取させ、室温23±3℃、湿度50±10%、12時間の明暗サイクル条件下で1ケージ当たり5匹で飼育した。マウスは購入から1週間は同条件下で馴化後実験に使用し、実験中は1ケージ当たり1匹で飼育した。

2. 行動薬理試験

行動薬理試験は、実験動物の行動や神経症状を観察することによって、ヒトでの神経系への影響を類推するために行う。動物の行動や神経症状を観察し、有用な指標行動(症状)の発生頻度や重篤度を数値化して行動プロフィールを作成し評価するものであるが、客観的かつ総

Table 1 Functional and observational tests

| Behavioral | Neurologic | Autonomic |
|---------------------|-----------------|------------------|
| Body position | Convulsion | Respiration rate |
| Stereotypy | Tremor | Piloerection |
| Parapebral closure | Gait | Lacrimation |
| Bizarre behavior | Tail elevation | Salivation |
| Pinna reflex | Body tone | Defecation |
| Approach response | Abdominal tone | Urination |
| Touch response | Limb tone | Skin color |
| Aggression | Grip strength | Heart rate |
| Vocalization | Finger splay | Body temperature |
| Locomotor activity | Righting reflex | |
| Rearing | Wire maneuver | |
| Transfer arousal | | |
| Tail pinch response | | |
| Visual placing | | |

合的な判定は難しく、複数の熟練した観察者による評価が必要である。また、一部の危険ドラッグの主要な作用である幻覚症状をマウスなどのげっ歯類で判定することは容易ではない。

当所では、薬物の神経作用を確認するために、マウスを用いてIrwinの多次元観察法⁵⁾を簡便化した観察表に従い、行動観察および数種類の機能試験を行った。使用した装置をFig.1に示す。

マウスに被験物質を経口投与後15分間ホームケージ内で観察し、15分間の自発運動量測定、5分間のオープンフィールドでの行動観察後、刺激反応試験、体温測定および機能試験を行った。観察項目は、症状発現の有無や強度で評価し、正常は0、促進は1または2、抑制は-1または-2でスコア化した。観察および測定項目をTable 1に示す。動物への投与経路は、使用実態に即した経口投与が適しているが、投与30分以内に神経症状

を発現させるため、一部危険ドラッグについては腹腔内投与を行った。指標行動等の発現強度の容量依存性を確認するため、複数の投与量群を設定し、一群あたりの投与匹数は6から8匹とした。

3. 自発運動量測定試験

自発運動量測定試験は、運動量解析装置により被験物質投与後の自発運動量を測定する試験で、当所では小動物三次元運動解析装置 (SCANET SV-20, メルクエスト) を用いた。水平方向と垂直方向の動物の動きをセンサーでとらえて数値化し、それぞれ自発運動量、立ち上がり回数としてカウントするものである。プラスチックケージ (41.5×25×18.5cm) をSCANET内に設置し、投与30分前からマウスをケージに入れて馴化させた後に被検物質を投与し、1分間隔で180分間測定した。

自発運動量測定試験は、危険ドラッグの興奮作用や鎮静作用を評価する方法として有効である。

4. 条件付け場所嗜好性試験

薬物の精神依存性を評価する方法には、薬物自己投与試験、薬物弁別試験、条件付け場所嗜好性試験 (conditioned place preference test ; CPP試験) などがある⁶⁾。

薬物の精神依存性を評価する方法の中で最も信頼性の高い方法は薬物自己投与試験で、薬物摂取行動の強化効果を評価する方法である。一方CPP試験は、薬物の依存性を報酬効果から予測する方法である。自己投与方法による薬物の強化効果とCPP試験による薬物の報酬効果はよく対応することから、報酬効果から薬物の精神依存形成能を予知することが可能であると考えられている⁷⁾。

CPP試験は操作が簡単で短期間で報酬効果を評価することができる。また、報酬効果の発現強度を容量反応性から検討できるなどの有用性があり、本方法を用いた報告が多くなっているが、安定的な結果を得るためには、環境 (環境刺激) が重要な因子となる^{6,7)}。CPP試験は仕切り可能な明暗2つのコンパートメントに分かれた明暗ボックスを用いて試験を行う。動物は暗ボックスを好む傾向があるため、照明を暗くし、床素材を工夫して明暗各ボックスでの滞在時間のバランスをとる必要がある。当所では、照明や床素材の検討に加えて前試験で滞在時間に偏りが無いマウスを選別し、条件付け試験で被検物質処置ボックスを本来好まない明ボックスに固定することによってばらつきの少ない結果を得ることができた。当所で行っているCPP試験の詳細は以下のとおりである。

4-1. 前試験 マウスを仕切りのない明暗ボックスに入れ、15分間の各ボックスの滞在時間比 (明ボックス/暗ボックス) を3日間連続で測定し、3日目の滞在時間がほぼ等しい動物を選別した。また、3日目の明ボックスの滞在時間をpre-conditioned score (秒)

とした。

4-2. 条件付け試験 薬物による条件付け試験は、4日目から実施した。薬物投与群では薬物を腹腔内投与し、仕切りを閉じた明ボックス (被検物質処置ボックス) に30分隔離した。対照群には生理食塩液を投与し、暗ボックスと同様に隔離した。24時間後、薬物投与群、対照群ともに生理食塩液を投与し、前日のボックスの反対側に30分隔離した。この2日間の操作を1セットとし、この操作を3または5回繰り返し、条件付けを行った。

4-3. 本試験 条件付け試験終了翌日に、仕切りを取った明暗ボックスに何も投与しないマウスを15分間入れ、明ボックスでの滞在時間を測定し、post-conditioned scoreとした。

4-4. CPP score post-conditioned scoreからpre-conditioned scoreを引いた値をCPP scoreとし、この値を対照群と投与群で比較して報酬効果を評価した。マウスは暗ボックスを好むため、条件付け試験で何も投与しなければ環境に慣れ、CPP scoreはほぼマイナスになることを確認している。薬物投与群においてCPP scoreがプラスになっている場合、薬物報酬効果により本来好まない明ボックスの滞在時間が長くなると解釈できる。対照群は条件付け試験において暗ボックスで生理食塩液の腹腔内注射をされており、CPP scoreは注射のストレスにより暗ボックスへの嗜好性が減弱された値であると解釈される。

CPP試験の結果

当所で行った CPP試験の結果について解説する。

試験に使用した危険ドラッグは、試薬メーカーから購入した試薬以外は、インターネットで購入したものであり、内容物の成分や純度を確認する必要がある。そのため、インターネットで購入した危険ドラッグはGC-MSによって性状を確認し、HPLCで純度を測定して使用した。分析条件の詳細は、清水らの方法⁸⁾に従った。

1. トリプタミン系薬物

トリプタミン系危険ドラッグは、危険ドラッグが顕在化し始めたころに数多く流通していたが、現在ではほとんど流通していない化合物である。神経伝達物質であるセロトニンはトリプタミン類に属するため、トリプタミン系危険ドラッグはセロトニン受容体に作用し、幻覚作用を持つと考えられる⁹⁾。代表的なものにAMT (α -methyltryptamine, 2005年麻薬指定) や死亡事故が多発した5-MeO-DIPT等がある。

1-1. 被検物質 6種類のトリプタミン系化合物-5-MeO-DIPTおよびその構造異性体である5-MeO-DPT

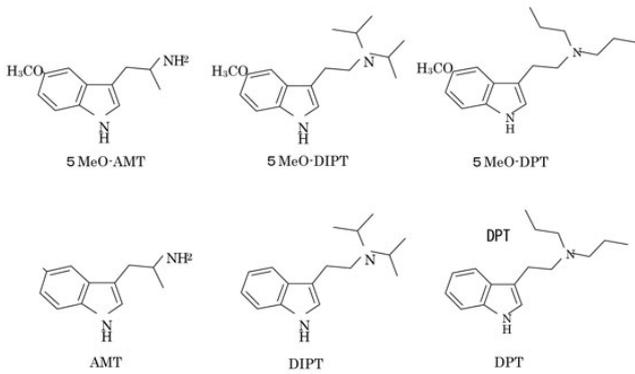


Fig. 2 Chemical structures of tryptamines tested

(5-methoxy-N,N-dipropyltryptamine, 2007年指定薬物), DIPT (N,N-diisopropyltryptamine, 2007年指定薬物), DPT (N,N-dipropyltryptamine, 2007年指定薬物), AMT, 5MeO-AMT (5-methoxy- α -methyltryptamine, 2007年指定薬物) を用いてCPP試験を行った。AMT (Sigma-Aldrich) 以外の化合物はインターネットで購入した。使用した被検物質の化学構造式をFig.2に示す。

1-2. CPP試験結果 6種類のトリプタミン化合物のCPP試験の結果, 5-MeO-DIPT, 5MeO-DPT, DIPTおよびDPTで, 対照群に対し投与群で有意にCPP scoreが高く, 報酬効果があることが明らかになった。一方, 5-MeO-AMTおよびAMTでは報酬効果は確認で

きなかった。結果をFig.3に示す。この結果から, 報酬効果の形成にはN側鎖の影響が大きい可能性が示唆された。今回使用した6化合物のうち麻薬指定されている5-MeO-DIPTとAMT以外の化合物は指定薬物であるが, 指定薬物の中にも依存性薬物が存在する可能性があることが明らかになった。

2. フェネチルアミン系薬物およびメチロン

フェネチルアミン系の代表的な規制薬物は覚せい剤であるmethamphetamineなどであるが, 危険ドラッグとしても類似化合物が多く流通している。また, カチノン類もフェネチルアミン類に類似した構造を有し, 合成カンナビノイドとともに包括規制の対象となるほど危険ドラッグとして蔓延している。フェネチルアミン類およびカチノン類とも興奮作用や幻覚作用を有しているものが多いと考えられている¹⁰⁾。

2-1. 被検物質 フェネチルアミン類であるMMD A-2 (2-methoxy-4,5-methylenedioxyamphetamine, 2007年指定薬物), methamphetamineとカチノン類のmethylenoneについて CPP試験を実施した。

methamphetamine (大日本住友ファーマ) 以外の化合物は, インターネットから購入した。使用した被検物質の化学構造式をFig.4に示す。

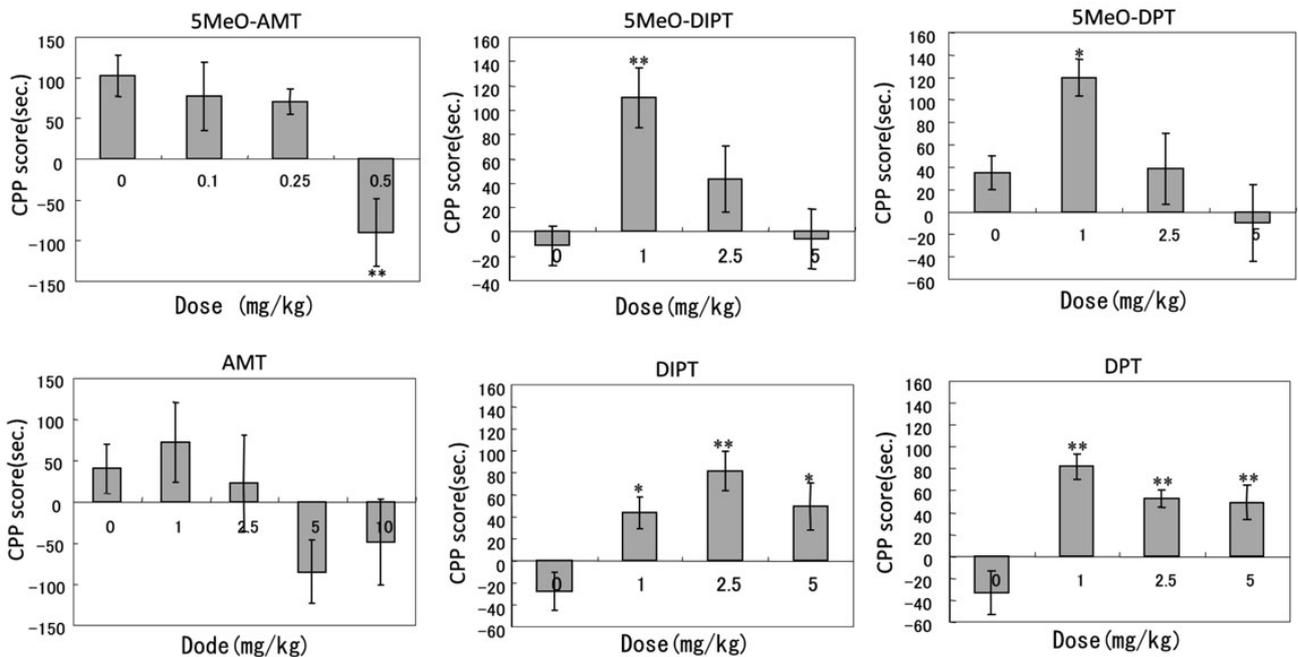


Fig. 3 Results of tryptamines on the CPP test.

Mice were injected with each tryptamine. CPP score was expressed in scores calculated as the difference between post-conditioning and pre-conditioning time spent in the compartment treated with tryptamines. Data are represented as the mean \pm SD of 10-14 mice. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, indicates significant difference from the saline treated group.

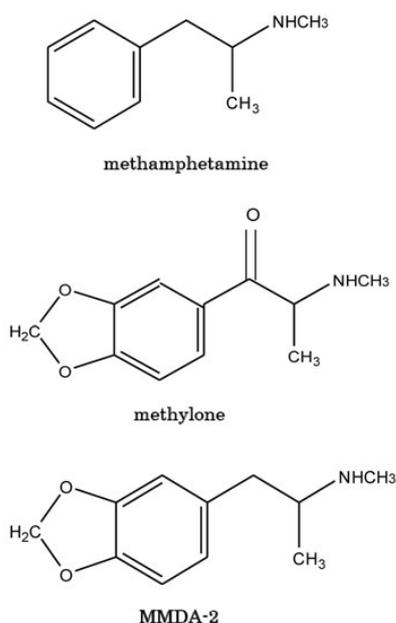


Fig. 4 Chemical structures of methamphetamine, methylone and MDMA-2

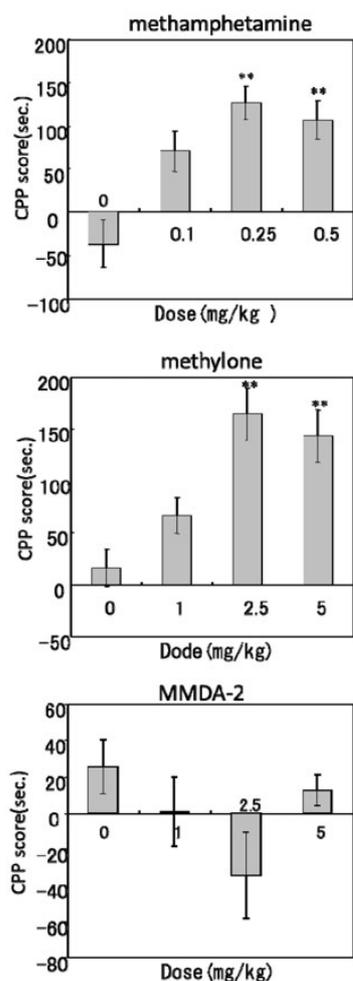


Fig. 5 Results of methamphetamine, methylone and MDMA-2 on the CPP test.

2-2. CPP試験結果 methamphetamine および methyloneとも有意な報酬効果が認められた。強力な依存性物質であるmethamphetamineでは、methyloneの十分の一の量かつ条件付け試験3セットで報酬効果が発現した。

MMDA-2はMDMA(3,4-methylenedioxyamphetamine, 麻薬)の主要代謝物であるMDA(3,4-methylene-dioxyamphetamine, 麻薬)と同様の作用があると報告されている¹¹⁾が、当所の実験では報酬効果は認められず、低濃度投与群で明ボックス滞在時間が減少し、嫌悪作用を有する可能性が示唆された。

おわりに

CPP試験以外の試験でも、自発運動量測定試験の結果AMTは自発運動量の有意な増加を、5-MeO-AMTは自発運動量の有意な減少を引き起こしたが、dipropyl基を持つ4化合物では自発運動量の変化は認められなかった。また、dipropyl基を持つ4化合物では5methoxy基が存在することにより神経毒性作用が増強される傾向にあった。MDMA-2はMDMAとは異なり自発運動量は減少傾向にあり、MDMAで認められる中枢神経作用は観察されなかった。また、methyloneもMDMAと極めて類似した構造を持つが、自発運動量はMDMAより高く、報酬効果を示す量は2.5mg/kgであり10mg/kgと過去に報告¹²⁾されているMDMAより低かった。以上のように、同系統の薬物であっても化合物の側鎖の違いにより生体作用は異なっており、その構造から生体影響を正確に予測することは容易ではない。

合成カンナビノイドやカチノン系化合物が構造活性予測をもとに包括規制され、危険ドラッグの法規制が強化されたことから、その流通は下火になったように見えるが、新規薬物の出現は続いている。

医療機関からの報告では、最近の危険ドラッグ中毒症例の特徴として重症化や常用化が示唆されている¹³⁾。乱用薬物の危険性の周知や薬物依存症対策の強化のために、新規薬物の検出方法や生体影響試験に関する研究をとおして貢献していくことが公的研究機関には求められている。今後も、現在ではマウスでは評価が難しい幻覚作用の指標行動の検討や依存性試験を含めた詳細な行動毒性実験を行い、危険ドラッグ成分の生体影響を解明していく必要がある。

謝辞

本研究は、神奈川県重点基礎研究および厚生労働科学研究費により実施しました。本稿を終えるにあたり、研究に協力していただいた理化学部薬事毒性食品機能グルー

プの皆様および帝京科学大学小島尚教授に深謝します。

参考文献

- 1) 内閣府：ストップ危険ドラッグに手を出すな
<https://www8.cao.go.jp/souki/drug/stop_drug.html> (2019/8/8アクセス)
- 2) 厚生労働省：議員立法による法改正
<https://www.mhlw.go.jp/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/iyakuhin/yakubuturanyou/oshirase/20150819-1-02.html> (2019/8/8アクセス)
- 3) 花尻 (木倉) 瑠理：危険ドラッグの規制と流通実態について, 薬剤学, **75**, 121-127 (2015)
- 4) 鈴木勉：危険ドラッグの乱用と規制, 日薬理誌, **150**, 124-128 (2017)
- 5) Irwin S. : Comprehensive observational Assessment Ja. A systematic, quantitative procedure for assessing the behavioral and physiologic state of the mouse, Psychopharmacologia, **13**, 222-257(1968)
- 6) 鈴木勉：薬物の報酬効果測定法－CPP (条件づけ場所嗜好性) 試験について, 日薬理誌, **114**, 365-371 (1999)
- 7) 船田正彦：条件付け場所嗜好性試験による薬物報酬効果の評価：基礎と応用, 日薬理誌, **126**, 10-16 (2005)
- 8) Shimizu E, Watanabe H, Kojima T, Hagiwara H, Fujisaki M, Miyatake R, Hashimoto K. : Combined intoxication with methylone and 5-MeO-MIPT, Progr Neuro-psychopharmacol Biol Psychiatry, **31**, 288-291(2007)
- 9) Nagai F, Nonaka R, Satoh H, Kamimura K.:The effects of non-medically used psychoactive drugs on monoamine neurotransmission in rat brain, Eur J Pharmacol, **559**, 132-137(2007)
- 10) 佐藤かな子, 福森信隆, 中野良一, 不破達, 田中豊人：違法ドラッグ生体影響試験の開発, 東京都健康安全研究年報, **60**, 21-35(2009)
- 11) Shulgin, A. and Shulgin, A. : PiHKAL, pp.792-795, Transform Press, Berkley(1992)
- 12) Salzman J, Marie-Claire C, Le Guen S, Roques BP, Noble F. : Importance of ERK activation in behavioral and biochemical effects induced by MDMA in mice, Br J Pharmacol, **140**, 831-838(2003)
- 13) 明石暁子, 柏浦正弘, 三上学, 濱邊祐一：危険ドラッグ中毒の深刻化の現状, 中毒研究, **29**, 21-25(2016)

Neurobehavioral assays to evaluate the effect of illegal drugs

Maki MIYAZAWA

Various psychoactive drugs are widely used recreationally throughout the world. Most non-controlled psychoactive drugs are synthesized to be chemically similar to illegal drugs. Because of their similar structures, they are expected to produce similar effects on their users. The Japanese Ministry of Health, Labour and Welfare amended the Pharmaceutical Affairs Act to control quickly the use of these drugs in 2007. In vivo tests, such as neurotoxicity tests and behavioral tests, for evaluating the hazards of illegal drugs, are being conducted, but there are limited data on dependency tests.

In this review, the method of the conditioned place preference (CPP) test in mice is described and the dependent effects of some tryptamines and phenethylamines are evaluated.

短報

神奈川県域の保健所等における HIV検査数の推移と陽性例の解析

佐野貴子, 嘉手苅将*, 渡邊寿美, 鈴木理恵子,
稲田貴嗣, 近藤真規子

The analysis of changes in the number of HIV tests and positive cases in public health centers at Kanagawa Prefecture

Takako SANO, Sho KADEKARU,
Sumi WATANABE, Rieko SUZUKI,
Takatsugu INADA and Makiko KONDO

はじめに

我が国における保健所等でのHIV検査は、世界で大流行していたHIVの国内での感染拡大を防ぐため、昭和62年(1987年)に開始された¹⁾。開始当初は抗HIV-1抗体のみの検査であり、匿名・有料であったが、HIV/エイズに対する社会的情勢から平成5年(1993年)4月に無料化された²⁾。同年には国内初のHIV-2感染者の報告例があったことから、抗HIV-1抗体に加え抗HIV-2抗体検査も同時に実施されることとなった³⁾。また、自治体での保健所以外の検査日時や場所に配慮した特設検査施設が平成5年に初めて東京に開設され⁴⁾、その後全国の自治体でも設置されるようになった。平成16年(2004年)には迅速検査試薬を用いた検査結果の即日返し(以下、即日検査)の導入が推進されることとなり⁵⁾、平成30年(2018年)には全国保健所の約7割で即日検査が実施された⁶⁾。

昭和62年2月から当時の神奈川県(横浜市、川崎市および横須賀市を除く)の保健所においてHIV抗体検査の受付が開始され、その検査は当所で実施した。平成12年(2000年)4月には相模原市、平成18年(2006年)4月には藤沢市、平成29年(2017年)4月には茅ヶ崎市が保健所設置市となり、各市にHIV検査が移管された。

神奈川県域の保健福祉事務所(以下、HWC)では、平成18年から即日検査が順次導入され、4月に平塚HWC、6月に小田原HWC、茅ヶ崎HWCおよび厚木HWC、平成26年4月に鎌倉HWCで開始された。一方で、三崎HWC、秦野HWCおよび足柄上HWCが平成26年4月にセンター化され、HIV検査の受付を停止したことから、当所での検査も終了となった。これらの経緯から、現在のHWCでの検査体制は、平塚HWC、鎌倉HWC、小田原HWCおよび厚木HWCの4箇所での即日検査、厚木HWC大和センターの1箇所での通常検査(受検者に結果を1週間後に通知する方法)を実施している。特設検査施設としては、平成17年(2005年)8月に即日検査施設として横浜YMCA(厚木)に「神奈川県HIV即日検査センター」(以下、即日検査センター)が設置され、毎月第2日曜日に検査が行われている。また、平成26年(2014年)には個別施策層の男性同性間性的接触者(以下、MSM)および日本語に不慣れな受検者に配慮した対象者限定の即日検査会(以下、個別施策層検査)を開始し、かながわ県民センターで日曜日に隔月一回の検査が実施されている。

本稿では、これまでに神奈川県域の保健所および特設検査施設で実施されたHIV検査数と陽性数の動向をまとめるとともに、即日検査導入後にHIV検査陽性となった事例について、患者属性および感染HIV-1の遺伝子型の解析を行ったので報告する。

方法

1. HIV検査の実施体制

神奈川県域でのHIV検査は大きく分けてHWCでの即日検査(以下、HWC即日検査)、HWCでの通常検査(以下、HWC通常検査)および特設検査施設での即日検査(以下、特設検査施設即日検査)の3体制で行われてきた。

HWC即日検査は、当所微生物部および地域調査部の細菌検査員が各HWCに派遣され、その場で迅速検査試薬を用いたスクリーニング検査を実施した。迅速検査試薬は平成28年(2016年)8月までは抗体検査試薬(ダイナスクリーン・HIV-1/2, アリーアメディカル社)、9月以降は抗原抗体同時検査試薬(ダイナスクリーン・HIV Combo, アリーアメディカル社)を用いた。迅速検査試薬の結果が陰性の場合、当日のうちにHWCから受検者にスクリーニング結果が通知された。判定保留となった場合には、微生物部においてウエスタンブロット法(以下、WB法)(ラブプロット1, 2, バイオ・ラッド ラボラトリーズ社)および核酸増幅検査(KK-TaqMan法)⁷⁾によるHIV確認検査を実施した。結果は1週間

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 地域調査部

後にHWCから受検者に通知された。

HWC通常検査は、大和センターで採血された血液が微生物部に搬入され、平成25年（2013年）9月までは粒子凝集法（PA法）による抗体検査試薬（ジェネディアHIV-1/2ミックスPA、富士レビオ社）、10月以降は自動免疫測定装置による抗原抗体同時検査試薬（バイダスアッセイキット HIV デュオII、バイオメリュー・ジャパン社）を用いたスクリーニング検査を実施した。結果が陽性の場合、引き続きWB法および核酸増幅検査を用いたHIV確認検査を実施し、確認検査も含めた最終結果は1週間後にHWCから受検者に通知された。

特設検査施設即日検査のスクリーニング検査は医療機関に委託されており、迅速検査試薬で判定保留となった場合には、微生物部においてHIV確認検査を実施した。結果は受検者が希望するHWCにおいて約1週間後に通知された。

2. HIV検査数および陽性数の動向

神奈川県域でHIV検査が開始された昭和62年から平成30年までの各年について検査数と陽性数の集計を行っ

た。HWCでの即日検査導入後の平成18年以降については、検査体制別（HWC即日検査、HWC通常検査および特設検査施設即日検査）での検査数と陽性数の集計を行い、陽性率、スクリーニング検査の偽陽性率および陽性適中率を算出した。

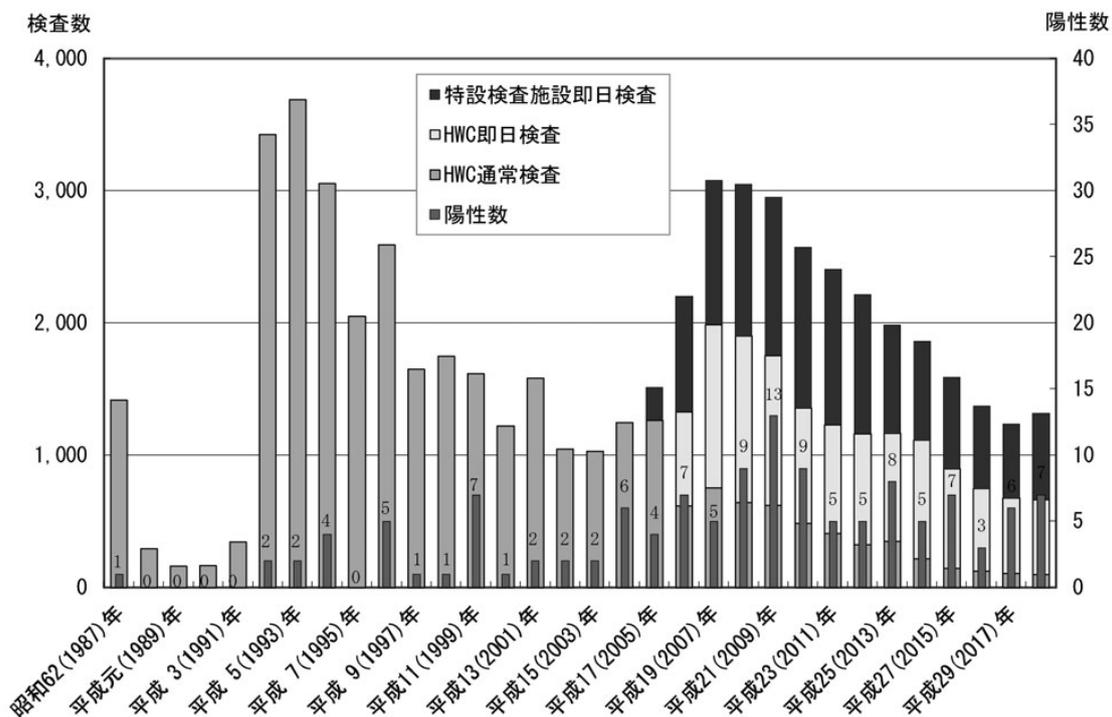
3. HIV陽性例の属性および遺伝子型の解析

平成18年から平成30年の13年間にHIV検査で陽性と判定された事例について、感染HIV-1の遺伝子型を調査し、性別、年齢、国籍等の患者属性と遺伝子型との関連について解析した。遺伝子型別にはHIV-1 env C2V3領域およびpol（プロテアーゼ、逆転写酵素）領域を用い、RT（逆転写）-nested PCRで増幅後、ダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定し、neighbor-joining法による系統樹解析を行った。なお、本研究は神奈川県衛生研究所倫理委員会にて承認された。

結果及び考察

1. HIV検査数および陽性数の動向

神奈川県域でのHIV検査数および陽性数の年次推移を



- * 昭和62年：平塚HWC、鎌倉HWC、藤沢HWC、小田原HWC、茅ヶ崎HWC、相模原HWC、三崎HWC、秦野HWC、大和HWC、足柄上HWC、厚木HWCおよび津久井HWCでHIV検査を開始。
- * 平成12年：相模原HWCが相模原市に移管。
- * 平成17年：神奈川県即日検査センターが即日検査を開始。
- * 平成18年：平塚HWC、小田原HWC、茅ヶ崎HWCおよび厚木HWCが即日検査を開始。藤沢HWCが藤沢市に移管。
- * 平成19年：津久井HWCが相模原市に統合。
- * 平成26年：鎌倉HWCが即日検査を開始。対象者限定の即日検査会（個別施策層検査）を開始。
- * 平成29年：茅ヶ崎HWCが茅ヶ崎市に移管。

図1 神奈川県域でのHIV検査数および陽性数の年次推移（1987～2018年）

表1 神奈川県域でのHIV検査体制別による検査数および陽性数（2006～2018年）

| | HWC即日検査* | | | HWC通常検査** | | | 特設検査施設即日検査 (即日検査センターおよび 個別施策層検査) | | | 合計 | | | 全国平均 陽性率 (エイズ動 向委員会 データより 算出) |
|-------------|----------|-----|------|-----------|-----|------|--|-----|------|--------|-----|------|--|
| | 検査数 | 陽性数 | 陽性率 | 検査数 | 陽性数 | 陽性率 | 検査数 | 陽性数 | 陽性率 | 検査数 | 陽性数 | 陽性率 | |
| 平成18(2006)年 | 712 | 2 | 0.3% | 615 | 1 | 0.2% | 874 | 4 | 0.5% | 2,201 | 7 | 0.3% | 0.4% |
| 平成19(2007)年 | 1,237 | 2 | 0.2% | 750 | 1 | 0.1% | 1,093 | 2 | 0.2% | 3,080 | 5 | 0.2% | 0.3% |
| 平成20(2008)年 | 1,258 | 2 | 0.2% | 643 | 3 | 0.5% | 1,146 | 4 | 0.3% | 3,047 | 9 | 0.3% | 0.3% |
| 平成21(2009)年 | 1,132 | 2 | 0.2% | 621 | 5 | 0.8% | 1,198 | 6 | 0.5% | 2,951 | 13 | 0.4% | 0.3% |
| 平成22(2010)年 | 872 | 4 | 0.5% | 484 | 0 | 0.0% | 1,216 | 5 | 0.4% | 2,572 | 9 | 0.3% | 0.4% |
| 平成23(2011)年 | 824 | 2 | 0.2% | 405 | 1 | 0.2% | 1,176 | 2 | 0.2% | 2,405 | 5 | 0.2% | 0.4% |
| 平成24(2012)年 | 838 | 3 | 0.4% | 323 | 0 | 0.0% | 1,051 | 2 | 0.2% | 2,212 | 5 | 0.2% | 0.4% |
| 平成25(2013)年 | 817 | 2 | 0.2% | 347 | 0 | 0.0% | 819 | 6 | 0.7% | 1,983 | 8 | 0.4% | 0.3% |
| 平成26(2014)年 | 897 | 0 | 0.0% | 216 | 0 | 0.0% | 748 | 5 | 0.7% | 1,861 | 5 | 0.3% | 0.3% |
| 平成27(2015)年 | 752 | 1 | 0.1% | 144 | 2 | 1.4% | 691 | 4 | 0.6% | 1,587 | 7 | 0.4% | 0.4% |
| 平成28(2016)年 | 625 | 0 | 0.0% | 121 | 0 | 0.0% | 627 | 3 | 0.5% | 1,373 | 3 | 0.2% | 0.4% |
| 平成29(2017)年 | 568 | 0 | 0.0% | 105 | 3 | 2.9% | 563 | 3 | 0.5% | 1,236 | 6 | 0.5% | 0.4% |
| 平成30(2018)年 | 569 | 1 | 0.2% | 95 | 1 | 1.1% | 652 | 5 | 0.8% | 1,316 | 7 | 0.5% | 0.3% |
| 合計 | 11,101 | 21 | 0.2% | 4869 | 17 | 0.3% | 11,854 | 51 | 0.4% | 27,824 | 89 | 0.3% | 0.3% |

* 平成18年4月から平塚HWC, 平成18年6月から小田原HWC, 茅ヶ崎HWCおよび厚木HWC, 平成26年4月から鎌倉HWCで実施。平成29年4月から茅ヶ崎HWCは茅ヶ崎市に移管。

**平成26年3月まで鎌倉HWC, 三崎HWC, 秦野HWC, 大和HWCおよび足柄上HWCで実施。平成26年4月から大和センターのみ。

図1に示した。検査数は平成4年(1992年)に厚生省(当時)によるストップエイズキャンペーンの実施により急増し、平成5年のHIV検査の無料化により3,689件と最も多くなったが、それ以降、平成15年(2003年)まで年々減少した。平成16年に全国的に即日検査の導入が始まったことにより、当県でも検査数が増加し始め、平成17年の即日検査センターの設置、平成18年のHWCでの即日検査の導入によって検査数が急激に増加した。しかしながら、平成19年(2007年)の3,080件をピークに減少傾向が続いており、平成29年は1,236件であった。その要因としては、平成21年(2009年)の新型インフルエンザの流行、平成23年(2011年)の東日本大震災による社会的影響、また、HIV感染症に対する関心の低下等が考えられた。全国でのHIV検査数も同様の傾向を示しており⁸⁾、近年は神奈川県域だけではなく、全国的に検査数が減少していたことが分かった。平成30年は神奈川県域では1,316件と前年と比較し若干の検査数の増加が認められた。陽性数は平成21年の13件が最も多く、近年は毎年3～8件と横ばいで推移している。

HIV検査体制別による検査数および陽性数を表1に示した。検査数はHWC即日検査では平成20年(2008年)、

HWC通常検査では平成19年、特設検査施設即日検査では平成22年(2010年)が最も多かった。平成30年の検査体制別による検査数は、HWC即日検査で569件、HWC通常検査で95件、特設検査施設即日検査では652件であり、HWCと特設検査の検査数割合は同率であった(図2)。前年と比較すると、HWC即日検査での検査数

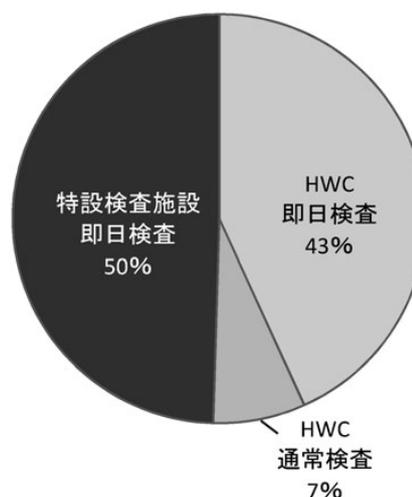


図2 HIV検査体制別の検査数割合(2018年)

はほぼ同数、HWC通常検査は10%の減少、特設検査施設即日検査は16%の増加となり、全体としては6%の増加となった。増加の要因の一つとしては、平成30年10月以降にHIV感染症に関するニュースや映画の特集がマスメディアで複数回取り上げられ、HIV検査実施施設を紹介するウェブサイト「HIV検査・相談マップ」(https://www.hivkensa.com)へのアクセス数が216万件と前年度の37%増加となっていることから⁹⁾、国民全体のHIV感染症への関心が高まり、神奈川県域の検査希望者も増加したことが考えられた。

即日検査導入後の平成18年から平成30年の総検査数27,824件のうち、スクリーニング検査陽性数は172件で、確認検査の結果、HIV陽性と判定された検体は89件であった。このことから、神奈川県域でのHIV陽性率は0.3%となり、厚生労働省エイズ動向委員会データ¹⁰⁾で算出した全国平均陽性率0.3%と同率であった。また、神奈川県域でのスクリーニング検査の偽陽性率は0.3%であり、一般的なHIVスクリーニング検査試薬の偽陽性率0.3~1.0%¹¹⁾と同程度であった。陽性適中率(確認検査陽性/スクリーニング検査陽性)は50%であり、スクリーニング検査陽性例の半数は真の陽性、半数は偽陽性反応であることが分かった。検査体制別の平均陽性率をみると、HWC即日検査は0.2%、HWC通常検査は0.3%、特設検査施設即日検査は0.4%であり、検査場所・日時の利便性の高い特設検査施設において、感染リスクが高い検査希望者がより多く受検していると思われた。平成30年では、HWC検査(即日検査および通常検査)で0.3%、特設検査施設即日検査では0.8%であった。平成30年の全国保健所におけるHIV検査体制に関する調査によると、HIV陽性率は保健所で0.2%、特設検査施設では0.4%であり⁶⁾、神奈川県域ではどちらも全国平均を上回っていた。

2. HIV陽性例の属性および遺伝子型の解析

平成18年から平成30年のHIV陽性例89件の性別および国籍の内訳は、日本国籍男性が58件、外国籍男性が17件、日本国籍女性が3件、外国籍女性が11件であった(表2)。性別および国籍別の年齢階級をみたところ、日本国籍男性では、20~30歳代が多く、10歳代の陽性者も見られた。外国籍男性は20~40歳代、外国籍女性は30歳代が多かった(図3)。

HIV陽性例89件のうち85件の遺伝子型が決定された(表3)。遺伝子型はサブタイプBが61件(72%)と最も多く、次いでCRF01_AEが17件(20%)、CRF01_AEを含む組み換え体が5件(サブタイプBとの組み換え(以下、01B):3件、CRF07_BCとの組み換え(以下、0107):2件)、サブタイプAが1件、CRF02_AGが1件であった。

表2 HIV陽性例の性別および国籍別の件数

| 性別 | 国籍 | 件数 | |
|----|----|----|----|
| | | 日本 | 58 |
| 外国 | 17 | | |
| 女性 | 日本 | 3 | 14 |
| | 外国 | 11 | |

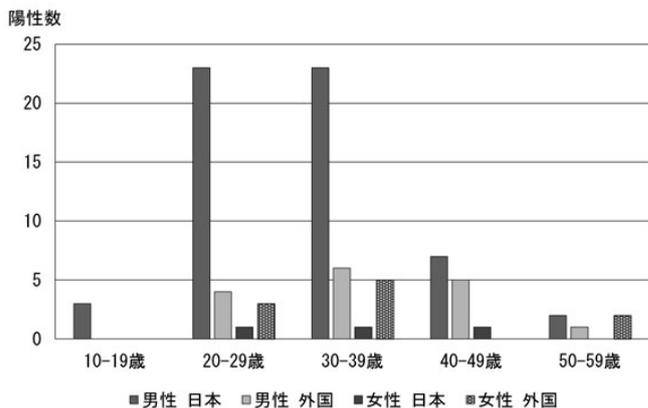


図3 性別および国籍別の年齢階級における陽性数

表3 性別および国籍別での遺伝子型

| 遺伝子型 | 男性 | | 女性 | | 合計 |
|---------------------------|----|----|----|----|----|
| | 日本 | 外国 | 日本 | 外国 | |
| サブタイプA | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| サブタイプB | 50 | 7 | 2 | 2 | 61 |
| CRF01_AE* | 4 | 4 | 1 | 8 | 17 |
| CRF02_AG* | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| サブタイプB/CRF01_AE* (01B) | 1 | 1 | 0 | 1 | 3 |
| CRF01_AE/CRF07_BC* (0107) | 0 | 2 | 0 | 0 | 2 |
| 型別未決定 | 3 | 1 | 0 | 0 | 4 |
| 合計 | 58 | 17 | 3 | 11 | 89 |

* CRF:Circulating Recombinant Form

01_AE: サブタイプAとAEの組み換え体

02_AG: サブタイプAとGの組み換え体

07_BC: サブタイプBとCの組み換え体

サブタイプBの61件中50件(82%)は日本国籍男性から検出されており、遺伝子型が決定できた日本国籍男性55件のうち50件(91%)がサブタイプBに感染していた。サブタイプBは1980年代中頃に欧米から日本に流入後、非加熱製剤や男性同性間の性的接触等による感染で拡大し、国内での主流株となっている¹²⁾。

外国籍男性および外国籍女性ではサブタイプBの他に東南アジアや東アジアで流行しているCRF01_AEとその組み換え体(01B, 0107)の感染が多く見られた¹³⁾。CRF01_AEは1980年代中頃にタイで異性間の性的接触による感染爆発が起こり、その後東南アジアに拡大して

いった¹⁴⁾。日本では1990年代始めから異性間の性的接触でCRF01_AEの流行が確認された¹⁵⁾。また我々は、中国のMSMで流行しているCRF01_AEのバリエーションの1つであるCN.MSM.01-1が2010年から2012年に日本のMSM間で小規模な流行を起こし、その後も首都圏を中心に拡散していることを報告した¹⁶⁾。

サブタイプBとCRF01_AEの組み換え体01Bは2003年以降、東南アジア、東アジアで多数同定され、日本国内でも2014年にCRF69_01B、CRF76_01Bが同定されている¹³⁾。また、CRF01_AEとCRF07_BCの組み換え体が2014年に中国のMSMで確認され、その後も様々な組み換えパターンの0107が検出されている¹³⁾。遺伝子型の解析を行うことで感染経路の推定が可能であり、本データはHIV感染予防対策を講じる上での一助となることから、今後も解析を継続していく必要があると考える。

まとめ

神奈川県域での近年のHIV検査数は平成19年以降、毎年減少傾向にあったが、平成30年は前年比6%の増加となった。しかしながら、ピーク時の平成19年と比較すると57%の減少となっており、県民のHIV/エイズへの関心の低下が危惧される。一方で、神奈川県域でのHIV陽性率は近年上昇しており、HIV感染者は20~40歳代の日本国籍男性と外国籍が多くを占めている。HIV/エイズの早期発見・早期治療は感染者の予後を改善し、社会においても感染拡大の防止につながることから、神奈川県ではさらにHIV検査体制を強化していくとともに、MSMおよび外国籍者等の個別施策層を対象とした検査普及啓発活動を積極的に行っていく必要があると考える。

謝辞

本検査を実施するにあたり、多大なるご協力を頂きました県健康危機管理課、各保健福祉事務所および地域調査部職員の皆様に深謝いたします。

文献

- 1) 厚生省健康政策局計画課長，厚生省保健医療局結核難病感染課感染症対策室長：エイズ対策の推進について。健医感発第20号，昭和62年3月14日。
- 2) 厚生省保健医療局長：保健所におけるエイズストップ作戦関連事業について。健医発第406号，平成5年3月31日。
- 3) 厚生省保健医療局エイズ結核感染症課長：保健所におけるHIV-2の検査体制の整備について。健医感発第76号，平成5年7月9日。
- 4) 上木隆人，佐野貴子，今井光信，村主千明，櫻井具

- 子，中村早緒里，他：検査体制検討と指導介入によるMSM受検者支援に関する研究 ①検査項目をふやすことによるMSM受検者増加の試み。厚生労働科学研究費補助金エイズ対策研究事業HIV検査相談の充実と利用機会の促進に関する研究 平成25年度研究報告書，128-134 (2014)
- 5) 厚生労働省健康局疾病対策課長：「HIV検査の実施について」の改廃について (HIV抗体検査に係る迅速な検査方法の導入等)。健疾感発第1029004号，平成16年10月29日。
- 6) 土屋菜歩，佐野貴子，近藤真規子，今井光信，須藤弘二，加藤真吾，他：保健所におけるHIV検査・相談の現状評価と課題解決に向けての研究。厚生労働科学研究費補助金エイズ対策政策研究事業HIV検査受検勧奨に関する研究 平成30年度研究報告書，90-119 (2019)
- 7) Kondo M, Sudo K, Tanaka R, Sano T, Sagara H, Iwamuro S, et al.: Quantitation of HIV-1 group M proviral DNA using TaqMan MGB real-time PCR. *J Virol Methods*. **157**, 141-146 (2009)
- 8) 今村顕史，土屋菜歩，今井光信，加藤真吾，佐野貴子，貞升健志，他：保健所等におけるHIV即日検査のガイドライン第4版 (平成31年3月版)。pp.1-4 (2019)
https://www.hivkensa.com/tantousya/img/guideline_v4.pdf (2019/5/14アクセス)
- 9) 佐野貴子，近藤真規子，須藤弘二，星野慎二，井戸田一朗，土屋菜歩，他：インターネットサイトを用いた効果的なHIV検査相談施設の情報提供と利用向上に関する研究。厚生労働科学研究費補助金エイズ対策政策研究事業HIV検査受検勧奨に関する研究平成30年度研究報告書，175-191 (2019)
- 10) エイズ予防情報ネット：日本の状況＝エイズ動向委員会報告。http://www.api-net.jfap.or.jp/status/index.html (2019/5/14アクセス)
- 11) 国立感染症研究所：後天性免疫不全症候群 (エイズ)/HIV 感染症病原体検出マニュアル (2018年10月改訂 Ver1.1)。https://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/HIV20181031.pdf (2019/5/14アクセス)
- 12) Hattori J, Shiino T, Gatanaga H, Yoshida S, Watanabe D, Minami R, et.al.: Trends in transmitted drug-resistant HIV-1 and demographic characteristics of newly diagnosed patients: Nationwide surveillance from 2003 to 2008 in Japan. *Antiviral Research*, **88**, 72-79 (2010)

- 13) Los Alamos National Laboratory: HIV Circulating Recombinant Forms (CRFs). <https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/CRFs/CRFs.html> (2019/5/14アクセス)
- 14) 武部豊：東南アジア地域におけるHIV/AIDS流行の分子疫学. ウイルス, **43**, 101-110 (1993)
- 15) 今井光信, 近藤真規子, 須藤弘二, 斎藤隆行, 佐藤裕徳, 武部豊, 他：PCRによるHIV-1サブタイプ (BとE) の鑑別. 感染症学雑誌, **71**, 918-923 (1997)
- 16) Kondo M, Lemey P, Sano T, Itoda I, Yosimura Y, Sagara H, et.al.: Emergence in Japan of an HIV-1 variant associated with transmission among Men Who have Sex with Men (MSM) in China: First indication of the international dissemination of the Chinese MSM lineage. *J. Virol.* **87**, 5351-5361 (2013)

短報

ダイズ穀粒の組換えDNA定量検査における解析方法の検討

垣田雅史, 内山陽介, 田中由紀子,
関戸晴子, 大森清美

Study on analytical method for DNA quantitative examination of the genetically modified soybean

Masashi KAKITA, Yosuke UCHIYAMA,
Yukiko TANAKA,
Haruko SEKIDO and Kiyomi OHMORI

緒言

我が国における大豆の自給率は平成27年の統計では約7%であり、ほとんどが輸入に頼っている¹⁾。遺伝子組換えダイズに関しては、承認済であるRoundReady Soybean (以下, RRS) が海外で収穫され国内に流通しているが、近年, Liberty Link Soybean (以下, LLS) 及びRoundup Ready 2 Yield (Event MON89788) (以下, RRS2) についても承認され、海外で収穫されている状況である²⁾。そのため、遺伝子組換え表示のない大豆に遺伝子組換えダイズが混入し、県内市場に流通する可能性があり、当所においてもダイズ穀粒の組換えDNA定量検査 (RRS, LLS, RRS2) を実施している。

消費者庁通知「食品表示基準について」における(別添)「安全性審査済みの遺伝子組換え食品の検査方法」²⁾では、リアルタイムPCR装置の機種やマスターミックス等の試薬が検査方法ごとに定められている。現通知²⁾のダイズ穀粒の検査法では、ABI PRISM7900HT (以下, 7900HT) 及びLightCycler 480 (以下, LC480) のいずれの機種も使用可能であり、TaqMan Universal PCR Master Mix (以下, TMU) もEagle Taq Master Mix (以下, Eagle Taq) も両方使用可能である。そこで、LC480及びEagle Taqを用いて定量検査を行ったところ、LC480の解析方法である2nd Derivative Max法を用いた場合に、LLSのNo template control (以下, NTC)

において、PCR増幅産物が既定の閾値に達したときのサイクル数を示すCrossing Point値 (以下, Cp値) が得られる事例が認められた。本件のような事例は、7900HTを用いた定量検査では一度も認められず、検査結果の信頼性を損なう問題として危惧された。LC480の解析方法にはCp値の算出方法が2種 (2nd Derivative Max法・Fit Point法) ある。そこで、これらの解析方法を用いた場合に、NTCでCp値が得られる事例が認められるかを検証した。また、7900HT及びLC480のそれぞれの解析方法による定量PCR結果を比較検討し、LC480の各種解析方法の特性について評価した。

方法

1. 試料

ダイズ穀粒由来DNA試料液6検体 (1検体につき3抽出) を用いた。なお、全検体について、予め7900HT及びTMUを用いてDNA定量検査を行い、LLSのコピー数がすべて0であることを確認した。

2. 試薬

プライマー及びプローブはダイズ内在性DNA Le1 オリゴヌクレオチドセット及びGMダイズ (LLS) 系統別DNA LLS オリゴヌクレオチドセット (共にニッポンジーン)、陽性対照プラスミドはGMダイズ (LLS) プラスミドセット -ColE1/TE- (ニッポンジーン)、マスターミックスはTMU (Thermo Fisher Scientific) 及びEagle Taq (Roche Diagnostics) を用いた。

3. 装置

リアルタイムPCR装置は7900HT (Applied Biosystems) 及びLC480 (Roche Diagnostics) を用いた。

4. LLS陽性DNA試料液の調製

DNA試料液について、3検体ずつ抽出No. ごとに等量混合し、各々、A及びBの抽出No. 1~3とした。このDNA試料液に適宜、TE緩衝液で希釈したLLSのコントロールプラスミドを添加し、5% (H)、0.5%程度 (L) のLLS陽性DNA試料液を調製した。5%の混入率は不適切な分別流通管理が行われた可能性がある²⁾とみなされる値であり、0.5%は暫定的な当所の定量下限値である。LLS陰性のDNA試料液及びLe-1のDNA試料液には、コントロールプラスミドの添加量と同容量のTE緩衝液を添加し、DNA試料液中の夾雑成分の割合を一定にした。

5. 定量PCR及び解析方法

検知対象はLe-1及びLLSとし、各々のコピー数を定量した。解析方法 (1) は7900HTを用い、解析方法 (2) ~ (4) はLC480を用いた。

(1) Th.Line法

1 神奈川県衛生研究所 理化学部
〒253-0087 茅ヶ崎市下町屋1-3-1

表 1 Th.Line決定表 (Le-1)

| m | 2 ^m | Th. Line | Slope | y-intercept | 備考 | Error | 採用値 |
|----|----------------|----------|--------|-------------|----------|-------|---------|
| 0 | 1 | 0.010 | -2.429 | 22.550 | | 0.113 | |
| 1 | 2 | 0.020 | -2.523 | 24.720 | | 0.103 | |
| 2 | 4 | 0.040 | -2.617 | 26.880 | | 0.094 | |
| 3 | 8 | 0.080 | -2.710 | 29.050 | | 0.087 | |
| 4 | 16 | 0.160 | -2.817 | 31.270 | | 0.081 | |
| 5 | 32 | 0.320 | -2.947 | 33.580 | | 0.077 | |
| 6 | 64 | 0.640 | -3.077 | 35.880 | | 0.078 | 解析方法(3) |
| 7 | 128 | 1.280 | -3.199 | 38.170 | | 0.082 | |
| 8 | 256 | 2.560 | -3.324 | 40.520 | | 0.061 | 解析方法(4) |
| 9 | 512 | 5.120 | -3.418 | 42.660 | | 0.101 | |
| 10 | 1024 | 10.240 | -3.518 | 44.840 | | 0.109 | |
| 11 | 2048 | 20.480 | -3.613 | 47.010 | | 0.115 | |
| 12 | 4096 | 40.960 | | | plot out | | |
| 13 | 8192 | 81.920 | | | | | |

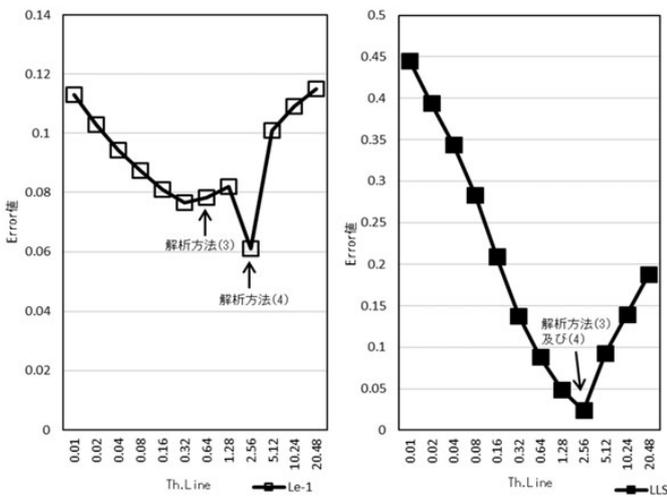


図 1 Fit Point法におけるTh.Line及びError値の相関図

通知²⁾のとおりJAS 分析試験ハンドブック³⁾のTh.Line決定表を用いて定量した。

(2) 2nd Derivative Max法

LC480の2nd Derivative Max法は Amplification Curvesを2回微分し、その極大値のサイクル数をCp値として自動的に算出する方法である。

通知²⁾に従い、NTCでCp値が得られていないことを確認した後、検量線においては「Error値」を確認し、0.2未満であった場合に定量した。モードはHigh Confidenceモード及びHigh Sensitivityモードの2種で行った。

(3) Fit Point法 (中点)

LC480のFit Point法は7900HTの解析方法(1)と同様に、縦軸の蛍光強度が対数表記であり、Amplification CurvesとTh.Lineとの交点にCp値を算出する方法である。Fit Point法によるコントロールプラスミドの蛍光強度の最大値が解析方法(1)によるコン

トロールプラスミドの蛍光強度の最大値の10倍以上であった。そこで、解析方法(1)のTh.Line決定表³⁾をLC480に適用するためTh.Lineの値を10倍とし、Error値等を項目に入れた表1を作成した。NoisebandはAutoとし、Backgroundは解析方法(1)のManual Baselineと同様、3~15サイクルとした。以降の手順はTh.Line決定表の入力方法³⁾のとおりとした。表1のTh.Line決定表を用いて、Error値が0.2未満かつ「NTC」及び「Plot out」ではないTh.Lineについて中点のTh.Lineを決定し、定量値を求めた。その際、中点が上下のTh.Lineに挟まれる場合、下段のTh.Lineを採用した。

(4) Fit Point法 (Error値最小)

Th.Line決定表の入力方法は解析方法(3)と共通とした。表1のTh.Line決定表を用いて、Error値が最小かつ「NTC」及び「Plot out」ではないTh.Lineを決定し、定量値を求めた。

結果及び考察

解析方法(3)及び(4)では、解析方法(1)と同様に検知対象ごとにTh.Line決定表が必要となるため、Le-1及びLLSについてそれぞれTh.Line決定表を作成した。なお、Le-1について表1に示した。Th.Line決定表から得られたTh.Line及びError値を用いて、解析方法(4)で決定したTh.Lineの値を確認し、解析方法(3)で決定したTh.Lineの値と比較した。その結果、Le-1では解析方法(4)で決定したTh.Lineの値の方が解析方法(3)で決定したTh.Lineの値よりも高くなった(図1)。一方、LLSでは解析方法(3)及び(4)で決定したTh.Lineの値が一致した(図1)。解析方法(3)によるLe-1のコントロールプラスミドのAmplification Curves(中点)(図2)では、Noisebandよりも低い範囲のAmplification Curvesは引かれず非表示となるため、Th.LineとコントロールプラスミドのAmplification Curvesの延長線上との交点にCp値が得られた。解析方法(4)によるLe-1のコントロールプラスミドのAmplification Curves(Error値最小)(図3)では、Th.LineとコントロールプラスミドのAmplification Curvesの直線部分との交点にCp値が得られた。解析方法(3)及び(4)によるLLSのコントロールプラスミドのAmplification Curves(中点及びError値最小)(図4)では、解析方法(4)によるLe-1の場合(図3)と同様にCp値が得られた。一方、解析方法(3)及び(4)において、Le-1及びLLSのいずれのNTCのAmplification CurvesもNoisebandまで達しなかったため、グラフには表示されずCp値が得られなかった(図2~4)。

7900HT及びTMUを用いた場合の定量PCR結果を基

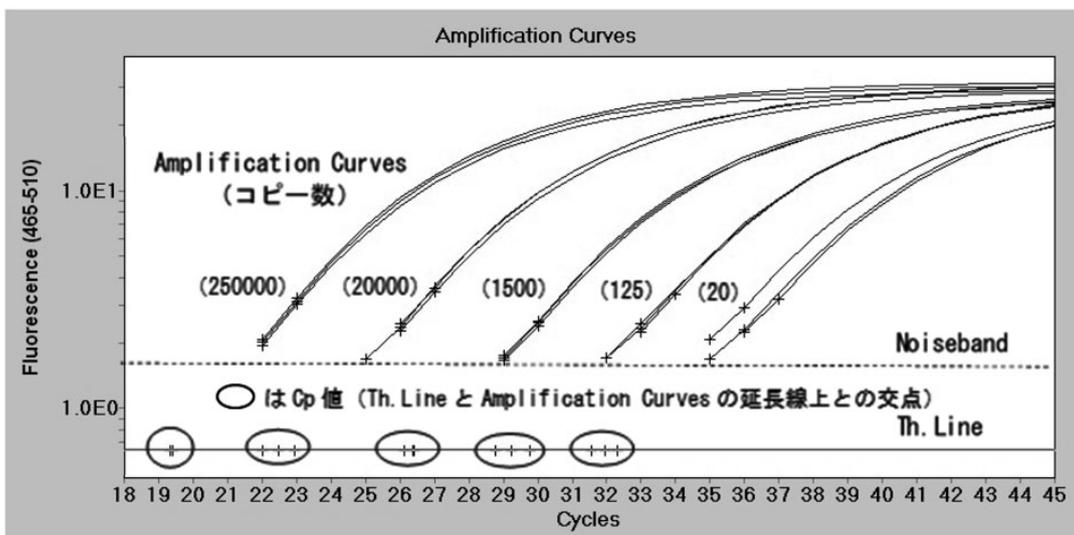


図2 Le-1のコントロールプラスミドのAmplification Curves (中点) 解析方法(3) Th=0.640

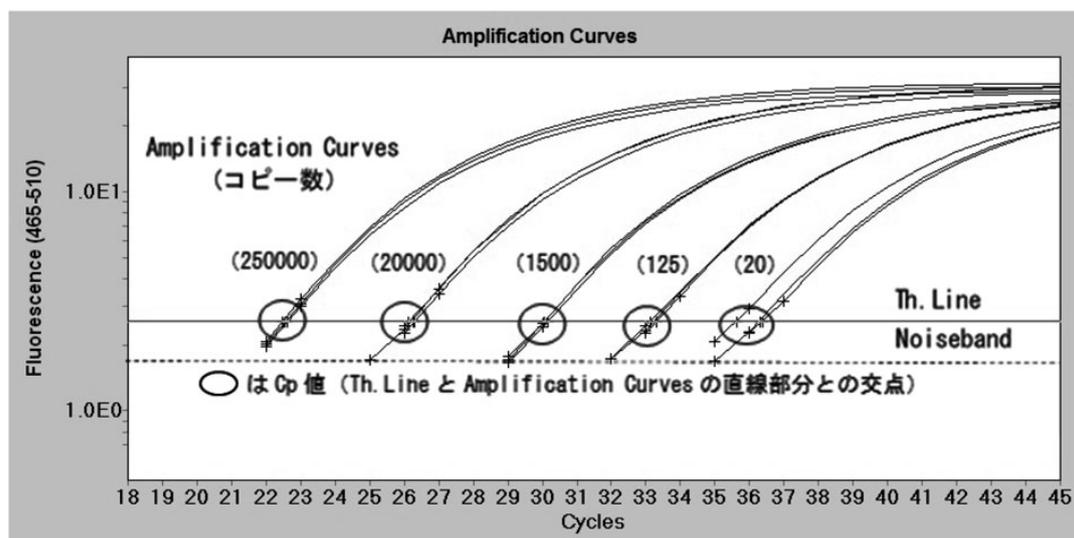


図3 Le-1のコントロールプラスミドのAmplification Curves(Error値最小) 解析方法(4) Th=2.560

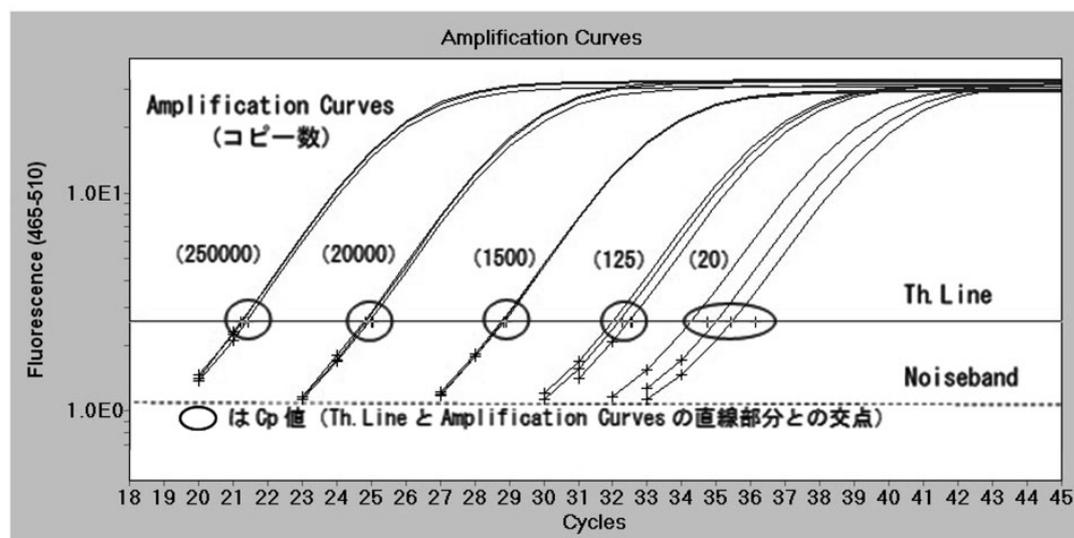


図4 LLSのコントロールプラスミドのAmplification Curves (中点及びError値最小) 解析方法(3)及び(4) Th=2.560

表 2 解析方法別のLLSの含有率の結果

| LLS陽性 DNA試料液 | 抽出No. | LLS添加 量 | 解析方法(1) | | 解析方法(2) | | 解析方法(3) | | 解析方法(4) | |
|-----------------|-------|------------|---------|-----------------------|---------|-----------------------|---------|-----------------------|---------|-----------------------|
| | | | 含有率(%) | 平均含有率 (%)±標準偏 差 | 含有率(%) | 平均含有率 (%)±標準偏 差 | 含有率(%) | 平均含有率 (%)±標準偏 差 | 含有率(%) | 平均含有率 (%)±標準偏 差 |
| A | 1 | L | 0.161 | | 0.125 | | 0.130 | | 0.129 | |
| | 2 | | 0.182 | 0.150±0.037 | 0.139 | 0.128±0.009 | 0.117 | 0.138±0.025 | 0.154 | 0.142±0.012 |
| | 3 | | 0.109 | | 0.120 | [0.85] | 0.167 | [0.91] | 0.145 | [0.94] |
| | 1 | H | 3.034 | | 2.977 | | 3.161 | | 3.147 | |
| | 2 | | 3.081 | 2.881±0.306 | 2.906 | 2.853±0.156 | 2.099 | 2.762±0.578 | 2.770 | 2.844±0.273 |
| | 3 | | 2.528 | | 2.678 | [0.99] | 3.028 | [0.95] | 2.615 | [0.98] |
| B | 1 | L | 0.106 | | 0.120 | | 0.162 | | 0.136 | |
| | 2 | | 0.144 | 0.130±0.021 | 0.151 | 0.131±0.017 | 0.118 | 0.142±0.022 | 0.164 | 0.145±0.016 |
| | 3 | | 0.142 | | 0.122 | [1.00] | 0.147 | [1.08] | 0.136 | [1.11] |
| | 1 | H | 2.732 | | 2.449 | | 3.051 | | 2.570 | |
| | 2 | | 3.434 | 3.040±0.358 | 3.325 | 2.835±0.447 | 2.205 | 2.825±0.543 | 3.065 | 2.874±0.266 |
| | 3 | | 2.956 | | 2.732 | [0.93] | 3.220 | [0.92] | 2.987 | [0.94] |

LLSの内標比=0.98 (7900HT), 1.07(LC480)

【】内は解析方法(1)によるLLSの平均含有率(%)を基準とし、1としたときに、解析方法(2)~(4)による平均含有率(%)の比率を示す

準として、LC480及びEagle Taqを用いた場合の比較を行った。表2に解析方法別のLLSの含有率の結果を示した。LLSの含有率はLLS陽性DNA試料液の抽出No.ごとの3ウェルの含有率の平均値とした。解析方法(1)~(4)において、Le-1及びLLSのNTCのCp値(解析方法(1)ではCt値)がすべてのウェルで得られず、LLS陰性のDNA試料液のLLSがすべてのウェルで0コピーであったため、表2への記載を省略した。なお、解析方法(2)による定量値はデータの確実性を重要視し、High Confidenceモードの結果を採用した。High Sensitivityモードの結果では、LLSのNTCにおいて、3ウェル中、2ウェルでCp値が得られ、「最終の5サイクルでは、より不確実性が高い」と表示された。High Confidenceモードは信頼性の高いCp値を算出するために最適化されており、High Sensitivityモードと比べて偽陽性となるようなCp値の算出を減らしたモードであるからと考えられた。

解析方法(1)による定量値と解析方法(2)~(4)による定量値を次のように比較した。解析方法(1)によるLLSの平均含有率を基準とし、1としたときに、解析方法(2)~(4)によるLLSの平均含有率の比率は0.85~1.11となり、概ね良好な結果となった(表2)。よって、解析方法(2)~(4)で得られた定量値は解析方法(1)に近似した値であった。

解析方法(2)~(4)による定量値のばらつきを比

較したところ、解析方法(3)によるLLSの含有率の標準偏差が、NTC陽性DNA試料A及びBの両添加量で最も大きくなった(表2)。その原因の一つとして、解析方法(3)によるLe-1において、Noisebandの位置がTh.Lineよりも高かったため、Th.LineがいずれのAmplification Curvesとも交差せず、Cp値の算出過程で誤差が生じた可能性が考えられた。今回のFit Point法の解析条件では、解析方法の客観性を重視しNoisebandをAutoにしたため、決定したTh.Lineの位置に関わらずNoisebandの位置が固定された。そのため、解析方法(3)によるLe-1において、Noisebandの位置がTh.Lineよりも高くなる現象が起きたと考えられた。一方、解析方法(4)によるLLSの含有率の標準偏差は、NTC陽性DNA試料A及びBの両添加量で解析方法(1)よりも小さくなり(表2)、解析方法(4)では解析方法(1)と比較してもばらつきが小さい定量値が得られた。

解析方法(2)とFit Point法との特性について比較すると、解析方法(2)は全自動の解析方法であり、解析者の主観的要素が入らない反面、NTCが陽性判定となるような事例への対応が難しいと思われる。一方、Fit Point法は解析条件を任意に設定できる解析方法であり、自由度が高く、適用性が広い反面、解析データの客観性を確保するためには規定を設ける必要がある。今回の結果から、解析方法(3)及び(4)について、解析方法

(1) による定量値との差及び定量値の標準偏差を比較したところ、解析方法 (4) は解析方法 (3) よりも総合的に良好な解析方法であることが示唆された。

まとめ

ダイズ穀粒の組換えDNA定量検査について、LC480及びEagle Taqを用いて2nd Derivative Max法による解析を行ったところ、LLSのNTCにおいてCp値が得られる事例が認められた。そこで、その解決策を探るためLC480での3種の解析方法について比較を行った。その結果、2nd Derivative Max法の適切なモード選択及びFit Point法を用いることで、LLSのNTCにおいてCp値は得られなくなり、7900HTのTh.Line法と比較しても遜色ない定量値が得られた。

LC480による行政検査では、通知²⁾の記載どおりに2nd Derivative Max法を第一に選択する方針に変わりはない。しかし、今回の事例のように、2nd Derivative

Max法でNTCからCp値が得られた場合に備える上で、Fit Point法 (Error値最小) が代用できる可能性について示すことができた。

文献

- 1) 農林水産省：大豆のまめ知識
(http://www.maff.go.jp/j/seisan/ryutu/daizu/d_tisiki/index.html#Q5) (2019/04/24アクセス)
- 2) 消費者庁次長通知 「食品表示基準について」 (消食表第139号,平成27年3月30日)(別添)「安全性審査済みの遺伝子組換え食品の検査方法」,一部改正 (消食表第135号,平成31年3月28日)
- 3) 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」
(農林水産消費安全技術センター 平成24年9月24日)

短報

フェニルカラムを用いた 液体クロマトグラフィーによる 化粧品中の防腐剤の一斉分析法の検討

羽田千香子, 甲斐茂美, 熊坂謙一, 宮澤眞紀

Simultaneous analysis of preservatives in cosmetics by HPLC using Phenyl Column

Chikako HADA, Shigemi KAI, 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、ほとんどの製品に防腐剤が配合されている。その配合制限については、化粧品基準別表第3に詳細が記載されており、製造にあたり遵守する基準となっている¹⁾。

過去に著者らは、化粧品基準に記載されている防腐剤のうち東京都の報告²⁾から汎用性がある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)) について、ODSカラムを用いたHPLC法による一斉分析法を報告した³⁾。しかしながら、このうち、IBPとBPについては、分離度が1.3と完全分離である1.5に満たない状況であった。成分の同定のためには、分離度の改善が必要であると考えられる。そこで新たな一斉分析法の開発のため、機器条件等の検討を行ったところ、分離度が改善し有用な結果を得たので報告する。

方法

1. 試薬

防腐剤の標準品として、PE, MP, EP, BP, SA, BA, DA, IM及びSOは和光純薬工業(株)(現:富士フィルム和光純薬(株))製の和光特級を用いた。IP(純度

98%), IBP(純度98%)は富士フィルム和光純薬(株)より購入した。CPはAlfa Aesar製(純度99%), PPは東京化成工業製(等級:GR)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富士フィルム和光純薬(株)製のHPLC用を用い、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、HPLCシステムとして、島津製作所製Nexera-i LC-2040シリーズを用いた。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YMC-Triart Phenyl(粒径1.9 μm , 2.0 mm ϕ \times 75 mm,ワイエムシー製), Inertsil Ph-3(粒径3 μm , 3.0 mm ϕ \times 150 mm,ジーエルサイエンス製)及びAcquity UPLC BEH Phenyl(粒径1.7 μm , 2.1 mm ϕ \times 100 mm,ウォーターズ製)を用い、カラム温度は45 $^{\circ}\text{C}$ 、移動相はA液(10 mmol/l酢酸緩衝液)とB液(5 mmol/l 酢酸含有メタノール/アセトニトリル(1:1))を用いたグラジエント送液とした。10 mmol/l酢酸緩衝液は、酢酸ナトリウム三水和物0.68gに酢酸287 μl を添加し、水を加えて1lとして調製した。送液条件は、流量0.5 ml/minにてA液/B液混合比率95:5を初期条件として1分間保持した後、24分間で混合比率60:40まで直線的に変化させた。注入量は1 μl とした。メンブランフィルターはメルクミリポア製マイレクスLG(孔径0.20 μm , 直径13 mm)を用いた。

3. 標準溶液調製

各標準品約50 mgを精密に量り、メタノールを用いて溶解し、各々5 mg/mlの標準原液とした。さらに直線性範囲の確認用として、各原液につきメタノールを用いて混合、希釈し、2.5, 5, 10, 50, 75, 125及び250 $\mu\text{g/ml}$ 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 $\mu\text{g/ml}$ の混合標準溶液を調製した。

4. 直線性

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、成分濃度とピーク面積値との回帰直線の相関係数から直線性の範囲を評価した。

5. 試料溶液調製

試料約0.4 gを精密に量り、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、メタノールを加えて正確に20 mlとした後、遠心分離し上澄液を得た。

この液をメンブラン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、クリーム及びシャンプーを用い、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 mg/g, 2.5 mg/g, 5 mg/gになるよう添加し、繰り返し回数は6回とした。

7. 実製品への適用

BA, PE, MP, PP, 及びBPを含む化粧水、クリーム及びシャンプーについて、5. 試料溶液調製と同様に調製し、上記の分析条件にて含有成分を定量した。併せて既報³⁾を用いて分析し、定量値及び標準偏差を比較した。

結果及び考察

1. 分離度の改善に向けた検討

IBPとBPの分離度を改善するためには、ピーク形状を維持したまま十分なピーク保持時間の差を確保するか、理論段数の向上を目指す対応が考えられる。ところが、IBPとBPは構造異性体であるため、一斉分析におけるグラジエント送液では、その送液条件を変更するのみではピークの保持時間の差異を確保することは非常に困難であった。そのため、理論段数を向上させる条件について検討することとした。すなわち、充填剤の粒子径の小さい(2 μ m以下)カラムを選択することとし、そのために必要な高圧仕様のHPLC条件を検討した。また、カラムの充填剤については、フェニル基等の π 電子を有する構造異性体の分離に向くとされているフェニルカラムの適用について検討することとした。既報³⁾及び青山らの報告⁴⁾ではODSカラムを用いていることから、フェニルカラムの使用は異なるメカニズムを用いる点でも有用であると考えられた。同じフェニルカラムでも製造メーカー

ごとにエンドキャップの有無、炭素含有率、比表面積、スパーサーが異なることから、スパーサーの種類や炭素含有率の観点で異なる3種のカラムを検討することとした。13成分全てのピーク間の分離度1.5以上となるクロマトグラムを得たことから、最終的に化学修飾基にフェニルブチル基を有するYMC-Triart Phenylを選定した。

移動相については、水系溶液としては酸性度を、有機溶媒についてはアセトニトリル、メタノールを検討することとした。水系溶液としては、0.1%りん酸、0.1%酢酸、pH4.7の酢酸緩衝液及びpH6.9のりん酸緩衝液等を用いた。有機溶媒の選定にあたっては、フェニルカラムの π - π 電子相互作用に基づく選択性を利用する点ではメタノールの方が有利と考えられる⁵⁾が、機器の耐圧性能を考慮し、システム圧を抑える目的からアセトニトリルとの混液とした。カラム温度は、圧力上昇を抑制するため、既報より5 $^{\circ}$ C高い45 $^{\circ}$ Cとした。更に、高速化のため、できる限り流量を上げることとし、0.5 ml/minとした。

最終的に移動相として10 mmol/l酢酸緩衝液、5 mmol/l酢酸含有アセトニトリルとメタノール(1:1)を用いたグラジエント送液の条件により、全ての成分で分離度1.9以上を達成した。クロマトグラムを図1に示す。また、流量を上げることとカラム長の短いカラムを用いることで高速分析が可能となり、1回あたりの分析時間が48分から32分へ16分短縮した。

溶出順については、既報と比較してDAとPE、IBP及びBPとIMの間で変化が生じた。本法と既報では移動相の組成は類似していることから、主にカラム充填剤の修飾基の変更が分離挙動に影響した可能性が考えられた。すなわち、充填剤の修飾基を疎水性相互作用の違いによる分離挙動を示すODS基から、疎水性相互作用に加えて π - π 電子相互作用を併せ持つフェニルブチル基に変えたことで、対象成分とカラム充填剤の修飾基の相互作用に変化が生じたと考えられる。本法により、IBPとBPの分離度が改善しただけではなく、既報の代替法あるいは

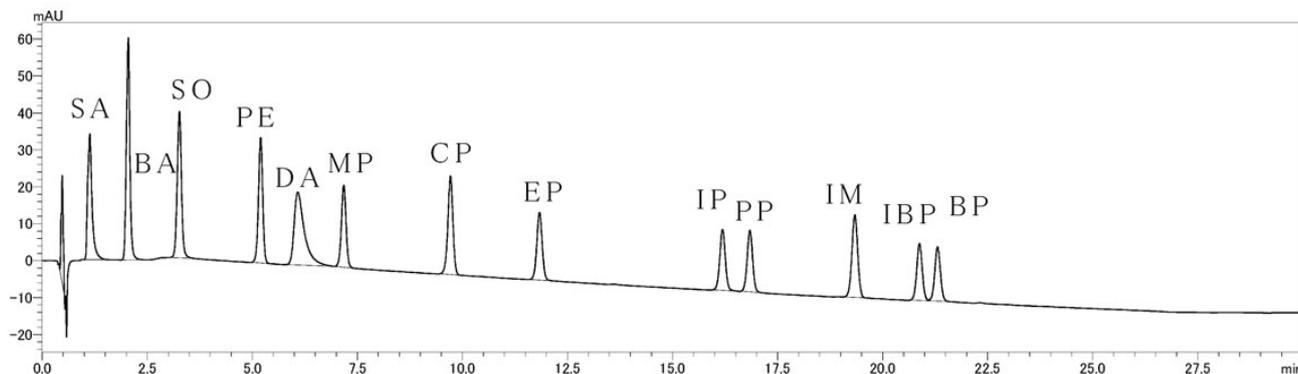


図1 防腐剤13成分のクロマトグラム

既報との併用により、検出成分の確認手段として有用であると考えられる。

2. 直線性範囲及び検出限界

混合標準溶液を用いて分析を行ったところ、直線性範囲、回帰式及び相関係数は表1のとおりであった。各成分とも相関係数0.999以上であり、良好な直線性を確認できた。また、検出限界はPDAスペクトルが確認できる濃度とし、概ね1 μg/mL程度であった。

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 |
|-----|---------|--------------------|--------|
| | μg/ml | | |
| SA | 2.5~250 | y = 5028x - 30.88 | 0.9998 |
| BA | 2.5~125 | y = 6768x - 1731 | 0.9998 |
| SO | 2.5~125 | y = 5471x - 290.7 | 0.9998 |
| DA | 5~125 | y = 6864x - 11884 | 0.9998 |
| MP | 5~250 | y = 2743x + 3341 | 0.9999 |
| PE | 2.5~125 | y = 4608x - 679.6 | 0.9998 |
| CP | 2.5~125 | y = 4470x - 1098 | 0.9998 |
| EP | 5~125 | y = 3175x - 1067 | 0.9998 |
| IP | 5~125 | y = 2910x - 2433.5 | 0.9998 |
| PP | 5~125 | y = 2927x - 1390 | 0.9998 |
| IM | 2.5~125 | y = 4358x - 893.1 | 0.9998 |
| IBP | 5~125 | y = 2693x - 1247 | 0.9998 |
| BP | 5~125 | y = 2731x - 1661 | 0.9998 |

3. 真度及び精度

添加回収の回収率をそれぞれ表2に示す。クリームで回収率の低下とバラツキが見られたが、これは脂溶性の高い成分を含むことからメタノールを加えてもサンプルが完全には溶解せず、試料溶液調製の際に若干の偏りが発生したためと思われるが、全体としては概ね100%近い回収率であり、良好な結果を得た。

4. 試料への適用

化粧水、クリーム及びシャンプー各2製品を対象に分析を実施した。定量値を表3に、各製品のクロマトグラムを図2に示す。試料(B)で保持時間約21分に検出波長262 nmでグリチルリチン酸のピークを認めたが、対象成分のピークとの重なりはなく、本分析条件において防腐剤13成分のピークに対する他の配合成分の影響は見られなかった。また検出された成分は製品の表示成分と一致しており、既報と同等の定量値が得られた。

結論

化粧品中の防腐剤成分13成分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、酢酸緩衝液とメタノール及びアセトニトリル混液を用いたグラジエント送液により、IBPとBPの分離度1.9を達成した。また、直線性、定量限界、添加回収試験の結果も良好であった。また、実製品への適用を行い既報と同等の定量値を示すことから、既報の代替法として使用できる他、既報で検出されたピークの再確認法として検査結果の信頼性向上に資すると考えられる。

文献

- 1) 化粧品基準，厚生省告示第331号，平成12年9月29日
- 2) 森謙一郎，中村義昭，大貫菜穂美，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) 羽田千香子，熊坂謙一，宮澤真紀：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

表2 防腐剤成分の添加回収試験

| 成分 | 化粧水 | | | クリーム | | | 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 | 0.5 mg/g | 2.5 mg/g | 5 mg/g |
| SA | 101.5±1.3 | 99.0±1.3 | 99.3±0.6 | 89.2±4.1 | 94.6±1.9 | 93.9±0.8 | 96.3±1.5 | 97.3±3.9 | 100.6±2.3 |
| BA | 100.1±1.0 | 100.7±1.0 | 100.5±0.5 | 101.6±5.5 | 96.5±1.8 | 94.2±0.7 | 93.5±1.1 | 95.1±3.7 | 97.9±2.2 |
| SO | 99.6±1.2 | 100.5±1.1 | 100.2±0.5 | 99.6±4.4 | 95.4±2.0 | 93.9±0.5 | 95.8±1.7 | 95.7±3.6 | 97.9±2.1 |
| PE | 100.7±1.0 | 101±0.9 | 100.6±0.6 | 98.8±5.4 | 95.3±1.9 | 93.9±0.6 | 96.4±1.5 | 96.1±3.6 | 98.7±2.1 |
| DA | 101.6±1.1 | 100.6±0.9 | 100.3±0.5 | 101.4±7.3 | 96.9±2.0 | 95.5±0.6 | 98.8±1.4 | 92.1±3.6 | 95.1±2.0 |
| MP | 99.6±1.2 | 100.3±1.0 | 99.7±0.6 | 90.6±4.7 | 94.2±2.0 | 93.1±0.8 | 93.5±1.1 | 96.3±3.9 | 99.3±2.2 |
| CP | 99.6±0.9 | 100.1±0.9 | 100.0±0.7 | 90.6±4.1 | 93.9±2.0 | 92.9±0.9 | 95.8±1.7 | 96.2±4.0 | 99.4±2.3 |
| EP | 99.6±1.2 | 100.2±1.0 | 99.8±0.7 | 88.1±4.3 | 93.5±2.0 | 93.0±0.8 | 96.4±1.5 | 95.7±3.7 | 99.0±2.3 |
| IP | 99.7±0.9 | 100.1±0.9 | 99.8±0.6 | 83.1±3.7 | 93.3±3.2 | 92.9±0.7 | 89.3±1.5 | 94.5±3.9 | 98.4±2.2 |
| PP | 98.9±0.7 | 100.0±0.9 | 99.7±0.6 | 89.8±4.1 | 93.6±1.9 | 92.7±0.8 | 91.6±1.6 | 94.9±3.9 | 98.1±2.2 |
| IM | 99.0±0.8 | 98.4±0.9 | 98.3±0.6 | 87.7±4.4 | 91.5±1.8 | 91.5±0.7 | 94.2±1.4 | 95.5±3.8 | 98.6±2.3 |
| IBP | 101.7±0.8 | 100.2±0.9 | 99.8±0.6 | 96.1±4.8 | 94.0±1.9 | 93.3±0.8 | 96.6±1.5 | 96.3±3.9 | 99.2±2.2 |
| BP | 102.1±1.2 | 100.2±1.0 | 99.5±0.7 | 91.7±3.8 | 92.7±1.9 | 92.6±0.7 | 95.9±1.2 | 96.2±4.0 | 99.1±2.2 |

平均 (%) ±標準偏差, n=6

表3 実製品の定量値 (mg/g)

| 試料 | 成分 | 定量値(mg/g) | |
|--------|----|-----------|-----------|
| | | 本法 | 既報 |
| 化粧品1 | PE | 1.98±0.01 | 1.89±0.00 |
| | MP | 0.98±0.01 | 0.97±0.00 |
| 化粧品2 | PE | 2.82±0.03 | 2.78±0.00 |
| | MP | 1.46±0.01 | 1.56±0.01 |
| クリーム1 | PE | 5.25±0.03 | 5.10±0.00 |
| | MP | 1.78±0.02 | 1.82±0.00 |
| | PP | 0.59±0.01 | 0.61±0.00 |
| クリーム2 | PE | 1.93±0.02 | 2.04±0.00 |
| | MP | 1.78±0.02 | 1.82±0.00 |
| | BP | 0.27±0.00 | 0.29±0.00 |
| シャンプー1 | BA | 2.47±0.01 | 2.48±0.00 |
| | PE | 2.87±0.03 | 3.00±0.00 |
| シャンプー2 | BA | 4.83±0.09 | 4.87±0.02 |
| | PE | 5.66±0.09 | 6.00±0.00 |

平均±標準偏差, n=3

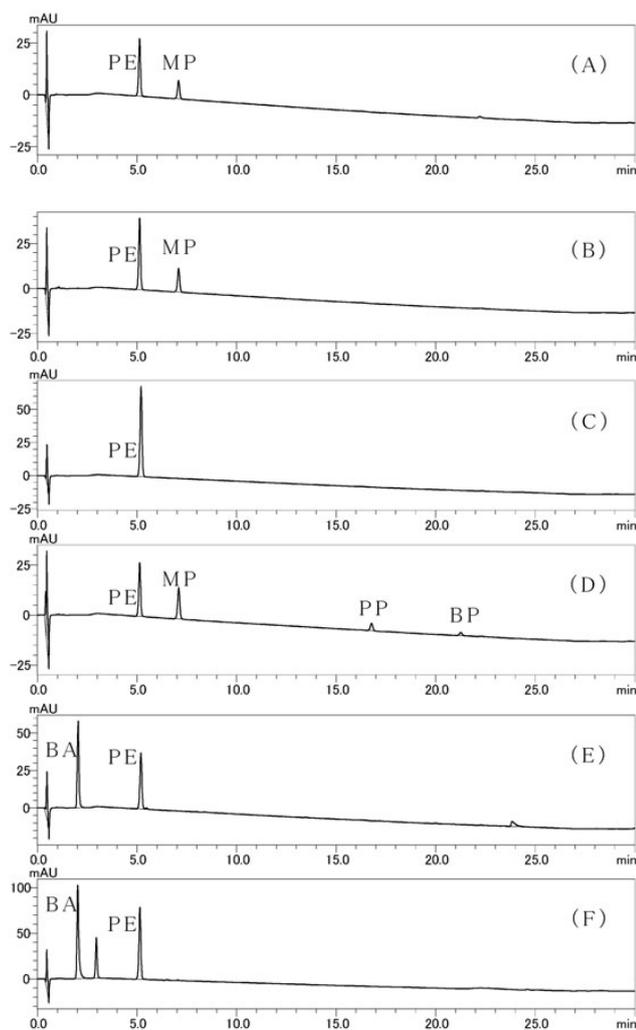


図2 実サンプルのクロマトグラム

(A) 化粧品1 (B) 化粧品2 (C) クリーム1
(D) クリーム2 (E) シャンプー1 (F) シャンプー2

化粧品に配合される防腐剤の一斉分析法の検討, 神奈川県衛生研究所研究年報, **42**,27-31(2012)

- 4) A.Aoyama, T.Doi,T.Tagami and K.Kajimura : Simultaneous Determination of 11 Preservatives in Cosmetics by High-Performance Liquid Chromatography, Journal of Chromatographic Science, **52**,1010-1015 (2014)
- 5) M.Yang,S.Fazio,D.Munch and P.Drumm:Impact of methanol and acetonitrile on separations based on π - π interactions with a reversed-phase phenyl column,Journal of Chromatography A, **1097**,124-129(2005)

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30年度）

古川一郎，政岡智佳，中嶋直樹

Occurrence of enterohemorrhagic
Escherichia coli in Kanagawa Prefecture
 (April,2018-March,2019)

Ichiro FURUKAWA, Tomoka MASAOKA
 and Naoki NAKAJIMA

腸管出血性大腸菌（enterohemorrhagic *Escherichia coli*：以下，EHECと略す）感染症は、「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律」（平成10年10月2日法律第114号）で三類感染症に分類される¹⁾。患者あるいは保菌者から分離された菌株はそれぞれの地方衛生研究所（以下，地研と略す）に集められ，生化学的性状，血清型，毒素型等を確認したのち，地研は「病原性大腸菌O-157の検体提供依頼について」（平成8年6月19日付，衛食第160号）および「飲食店における腸管出血性大腸菌食中毒対策について」（平成19年5月14日付，食安監発第0514001）に基づき，国立感染症研究

所（以下，感染研と略す）細菌第一部に菌株を送付している。さらに，EHECの広域的な感染事例を迅速に探知するため「腸管出血性大腸菌による広域的な感染症・食中毒に関する調査について」（平成30年6月29日付事務連絡，厚生労働省健康局結核感染症課，厚生労働省医薬・生活衛生局食品監視安全課）に従い，各症例の疫学的な情報と菌株の遺伝子解析の結果について国および自治体が情報共有することとなった。

感染研では遺伝子解析の手法として，パルスフィールド・ゲル電気泳動（以下，PFGEと略す）に代わり，EHECの主要な血清型であるO157，O26およびO111について Multilocus variable-number tandem-repeat analysis（以下，MLVAと略す）を用いた解析法が平成26年度から導入された。現在は，O103，O121，O145，O165およびO91を加えた合計8つの血清型について実施されている。

当所では，神奈川県域（横浜市，川崎市，相模原市および横須賀市を除く神奈川県内，以下，県域と略す）から集まったEHECについて血清型別，ベロ毒素（以下，VTと略す）型別，薬剤感受性試験およびPFGE法を実施している。さらに，血清型がO157，O26およびO111の株については，MLVA法を用いた遺伝子解析を併せて実施している。本報では，平成30年度に収集したEHEC 111株の遺伝子解析および薬剤感受性試験の結果について報告する。

当所微生物部に搬入されたEHEC 111株の内訳は，県内の保育施設における集団事例で分離されたO26(VT1) 34株を含むヒト由来111株であった。111株のうち64株は，地域の医療機関等で分離され，47株は当所地域調

表1 EHEC 111株の血清型およびVero毒素型（平成30年度）

| 管轄施設 | 菌株数 | O157 | | O26 | | O111 | O103 | O121 | OUT |
|------------|-----|---------------|---------------|---------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | | VT1&2 | VT2 | VT1 | VT2 | VT1&2 | VT1 | VT2 | VT2 |
| 平塚保健福祉事務所 | 16 | 7 | 6 | 1 | | | | 1 | 1 |
| 同上 秦野センター | 6 | 3 | 2 | 1 | | | | | |
| 鎌倉保健福祉事務所 | 3 | 3 | | | | | | | |
| 同上 三崎センター | 1 | | 1 | | | | | | |
| 小田原保健福祉事務所 | 7 | 6 | 1 | | | | | | |
| 同上 足柄上センター | 2 | 2 | | | | | | | |
| 厚木保健福祉事務所 | 51 | 7 | 6 | 34 | | 3 | 1 | | |
| 同上 大和センター | 6 | 1 | 4 | 1 | | | | | |
| 茅ヶ崎市保健所 | 3 | 1 | | | | | | 2 | |
| 藤沢市保健所 | 16 | 7 | 4 | 1 | 2 | | 2 | | |
| 計（割合） | 111 | 37 (33.3%) | 24 (21.6%) | 38 (34.2%) | 2 (1.8%) | 3 (2.7%) | 3 (2.7%) | 3 (2.7%) | 1 (0.9%) |

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 |
|-------|----|----|-----|
| 0 - 5 | 17 | 15 | 32 |
| 6-10 | 2 | 1 | 3 |
| 11-20 | 8 | 8 | 16 |
| 21-30 | 7 | 10 | 17 |
| 31-40 | 3 | 6 | 9 |
| 41-50 | 2 | 4 | 6 |
| 51-60 | 1 | 12 | 13 |
| 61-70 | 2 | 6 | 8 |
| >70 | 4 | 3 | 7 |
| 計 | 46 | 65 | 111 |

査部において患者家族および一般の検便から分離された。表1には管轄施設別の搬入菌株数, EHECの血清型, 毒素型および分離株数を示した。111株の血清型およびVT型は, O157(VT1&2) 37株, O157(VT2) 24株, O26(VT1) 38株, O26(VT2) 2株, O111(VT1&2) 3株, O103(VT1) 3株, O121(VT2) 3株, OUT(VT2) 1株であった。

EHECが分離された患者および保菌者の性別と年齢構成は, 男性が46名, 年齢範囲0~82歳で平均21.6歳(中央値18.0歳), 女性が65名, 年齢範囲1~91歳で平均42.5歳(中央値44.0歳)であった(表2)。

PFGEは, 制限酵素Xba I を使用し, 6V/cm, パルスタイム2.2 - 54.2秒, 12°Cの条件下で19時間行った。泳動パターンについてBioNumerics (Applied Maths社) を用いてクラスター解析し, デンドログラムを作成した。O157, O26およびO111についてはMLVAを併せて行い,

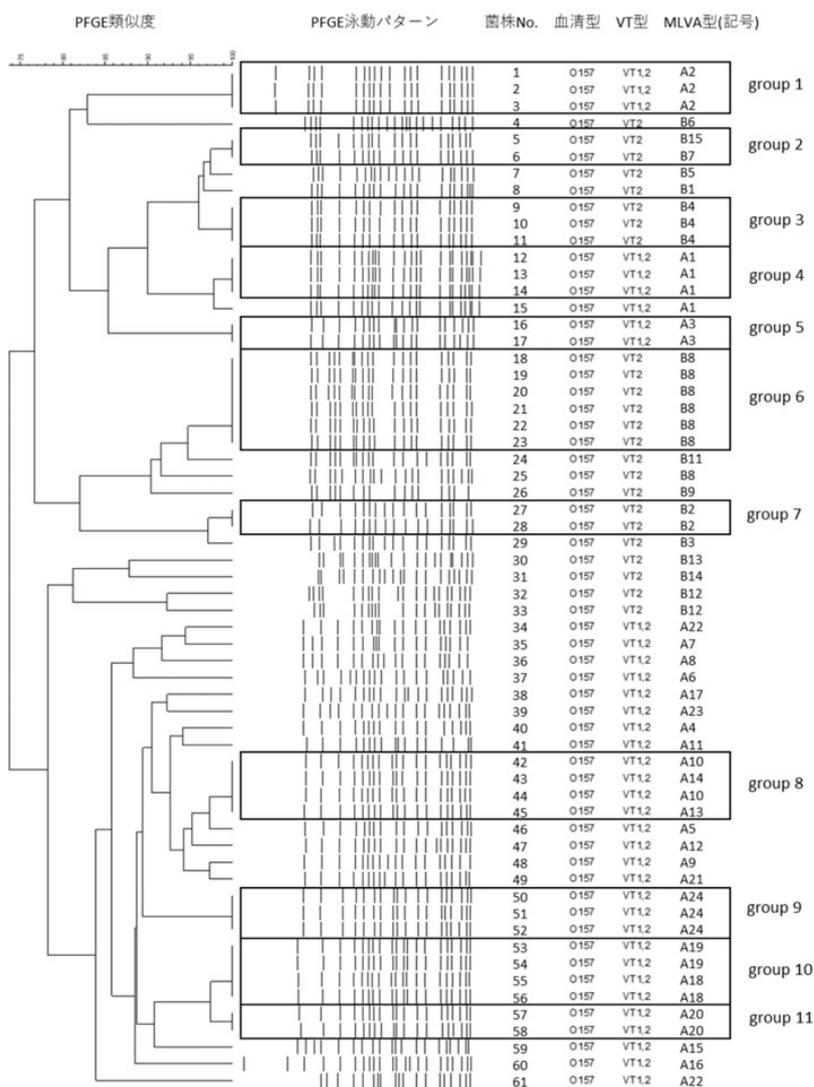


図1 EHEC O157 (61株) の遺伝子解析結果

表 3 EHEC 111株の薬剤感受性試験結果

| 判 定 | 薬剤の数とその内訳 | 血清型 | 菌株数 |
|-----|---------------------|------------|-----|
| 耐 性 | 4剤 ABPC, CP, SM, TC | O157 VT1&2 | 2 |
| | SM, TC | O157 VT2 | 2 |
| | 2剤 ABPC, CTX | O157 VT2 | 1 |
| | ABPC, SM | O157 VT1&2 | 1 |
| | CP | O157 VT1&2 | 5 |
| | CTX | O157 VT1&2 | 1 |
| | 単剤 FOM | O26 VT1 | 1 |
| | SM | O26 VT1 | 1 |
| 感 性 | | | 97 |
| 計 | | | 111 |

方法は腸管出血性大腸菌MLVAハンドブックO157, O26, O111編(地研協議会保健情報疫学学会マニュアル作成ワーキンググループ編)に従って実施した。PFGEの結果を基にデンドログラムを作成し、PFGEパターンが一致した場合は1つのgroupとして図中に示した(図1, 2)。また、MLVA法の結果についてはパターンごとに記号で表記した。

O157(VT1&2)およびO157(VT2) 61株の遺伝子解析の結果、group 1, 3および4は家族内事例の分離株であり、PFGEおよびMLVAの遺伝子パターンはそれぞれの事例ごとに一致していた(図1)。group 6は2家族からの分離株が含まれ、さらに家族間における共通食品の接点があるなど疫学的な関連が認められた。group 2, 5, 7, 8, 10および11については、group 10に含まれる菌株No.55およびNo.56の家族から分離された菌株以外は、患者・保菌者における共通食品の喫食等、疫学的

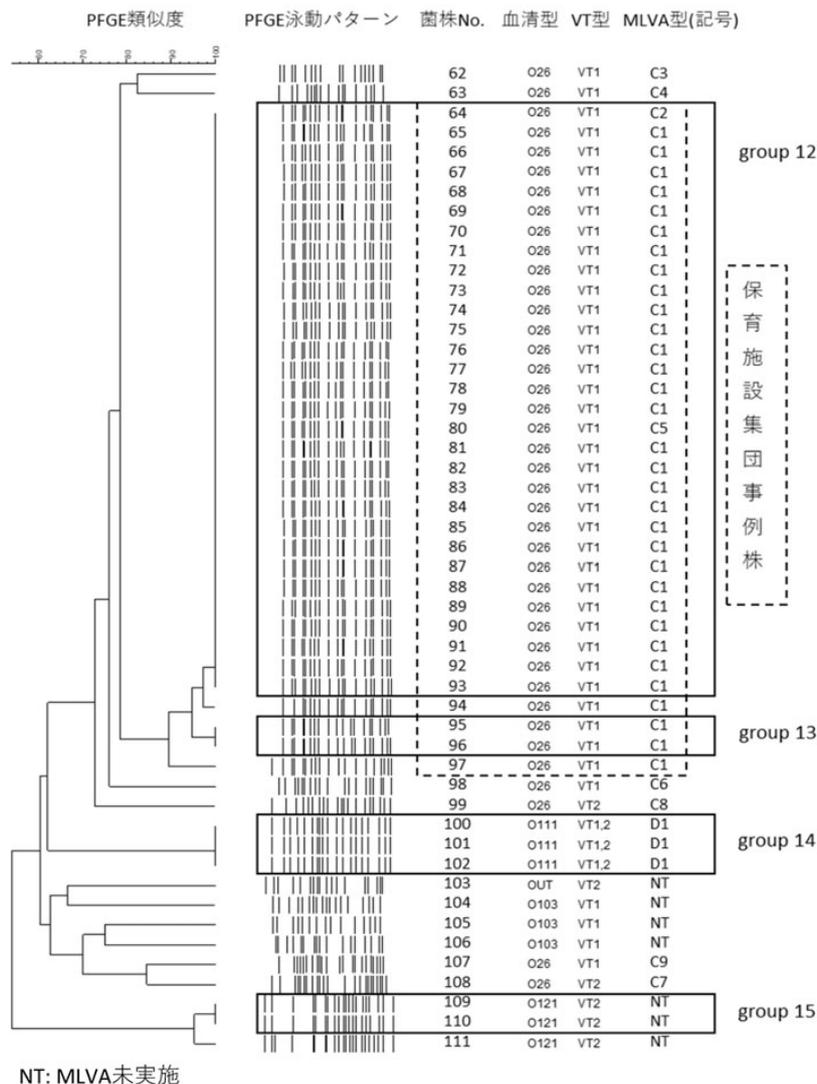


図 2 EHEC O26, O111, O103, O121, OUT (47株) の遺伝子解析結果

な関連は認められなかった。group 9の3菌株が分離された患者は同一の福祉施設を利用していることが確認され、PFGEおよびMLVAの結果も一致していたが感染源および感染経路は不明であった。

O26, O111, O103, O121およびO型別不能(以下、OUT)の菌株50株の遺伝子解析の結果を図2に示した。group 12および13を含むO26(VT1)の34株は、同一保育施設の利用者およびその家族から分離された菌株であり、施設従事者からは分離されなかった。これらの菌株を遺伝子解析した結果、PFGEは4パターン、MLVAは3パターンに分けられたが、すべての菌株はPFGEあるいはMLVAのいずれかのパターンが最も大きなグループと一致するなど、34菌株は同一感染源由来と思われた。O111(VT1&2)の3株を含むgroup 14は、同一家族から分離されており、PFGEおよびMLVAの結果も一致していた。group 15のO121(VT2)2株は、県内のファーストフード店で購入した食品を喫食した家族から分離され、感染研の還元データによると他にも13の自治体において同じ遺伝子型のO121が分離されたことが明らかとなった。菌株No.111はこの2株とPFGEパターンの類似度が90%以上を示し、さらに感染研が実施した遺伝子解析により同一遺伝子型であることが確認された。

次に、EHEC 111株について、CLSI(米国臨床検査標準化協会)法に準拠して薬剤感受性試験を実施した。12薬剤〔アミノベンジルペニシリン(ABPC)、セフトキシム(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)、ノルフロキサシン(NFLX)、ストレプトマイシン(SM)、スルフアマトキサゾール・トリメトプリム合剤(ST)およびテトラサイクリン(TC)]を用い、試験の結果は薬剤ごとの阻止円の基準に従い、耐性・感受性に分けて判定した(表3)。4剤に耐性を示したO157(VT1&2)の2株は、図1のgroup 5の菌株であり遺伝子型も一致していた。

SMおよびTCの2剤に耐性を示したO157(VT2)の2株は、遺伝子型は一致せず散発的な分離株であった。CP単剤に耐性を示したO157(VT1&2)5株のうち4株は、図1のgroup 10の4株であり、残りの1株は遺伝子型が異なる株であった。保育施設における集団事例の分離株であるO26(VT1)34株は、今回用いたすべての薬剤に感受性を示した。

平成30年度は、県域に関連する事例としては上述のように複数の自治体をまたぐO121(VT2)の集団事例が発生し、疫学情報ならびに遺伝子解析結果の迅速な情報共有が有効であった。さらに、平成29年度に引き続き保育施設におけるEHECの集団事例が発生し、施設利用者やその家族34名の感染者が確認された。今後感染症の発生抑制や感染拡大防止のために、児童やその家族に対する啓発あるいは保育施設における日頃の感染症対策が一層求められると考える。

なお、この報告の一部は、厚生労働科学研究費補助金(食品由来感染症の病原体情報の解析及び共有化システムの構築に関する研究)によって実施した。

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、生活衛生課、健康危機管理課、藤沢市保健所ならびに茅ヶ崎市保健所の方々に感謝いたします。

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

神奈川県のパークにおける蚊の生息状況

稲田貴嗣

Survey on mosquitoes in parks in Kanagawa Prefecture

Takatsugu INADA

デング熱、チクングニア熱、ジカ熱など、蚊が媒介する疾病が東南アジア諸国、南アメリカなどで流行している。これらの感染症を媒介する蚊として、ネッタイシマカ *Aedes aegypti* やヒトスジシマカ *Ae. albopictus* が知られている。ヒトスジシマカは体色が黒、胸部背面や側面、脚に白い鮮明な紋様がある、俗にヤブカと呼ばれる蚊である。日本では青森県以南に分布し、流れの少ない小型の水域が発生源となる。そのため人工の器物（植木鉢の水受けなど）も発生源になることから、庭先でも多く見られるなど身近なところに生息する蚊である。現在、海外との物、人の往来が頻繁に行われており、海外の流行地から感染症のウイルスを持ったヒトスジシマカが日本に侵入する、または輸入感染者の血液を在来の蚊が吸血して感染が広がることが強く懸念されている。日本国内ではデング熱などの輸入感染例は毎年見られていたが、日本脳炎を除き蚊が媒介する感染症の国内感染は長く発生していなかった。しかし、2014年には約70年ぶりにヒトスジシマカが媒介するデング熱の国内感染が起これ、その危惧が現実のものとなった。また、2016年よりジ

カ熱と小頭症の関連が濃厚になり、新たな蚊媒介感染症の問題が発生している。

デング熱などの輸入感染者から蚊媒介感染症の国内感染が広がる場合、感染者の住居あるいは日常的行動域を中心とした範囲に生息する蚊（ヒトスジシマカ）に吸血され、その地域に生息する蚊と人との間で感染が広がっていく可能性が高いと考えられる。特に、日常的に多くの人と蚊が接触する機会の多い公園を介して感染が広がることが考えられることから、住宅地に整備されている街区公園などの公園における蚊の生息状況を把握しておくことが重要である。

そこで、街区公園等で2015年から2016年に蚊の生息状況を調査し、加えて蚊媒介感染症ウイルスの保有状況を調査したので報告する。

蚊成虫の採集は公園内の数カ所、8分間スウィーピング法により行った。

蚊は同定後、5～26匹を1プールとしてRNAの抽出を行い、RT-PCR法によりデングウイルス、チクングニアウイルス、ジカウイルス、日本脳炎ウイルス、ウエストナイルウイルスの遺伝子検出を行った。

RNAの抽出にはQIAamp MinElute Virus Vacuum Kit (QIAGEN)を用いた。PBS 500 μ Lを試料に添加し、マルチビーズショッカー（安井器械(株)）(2000rpm, 30秒)で蚊を破碎した。破碎液を遠心(12000rpm, 5分)し、上清をRNA抽出試料とした。

遺伝子検出には、TaKaRa One Step RNA PCR Kit (タカラバイオ(株))を用いた。PCR用プライマーを表1に示した。

増幅装置はGeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems)を用いた。増幅条件は、53°C 10分間インキュベートした後、熱変性92°C 1分間、アニーリング53°C 1分間、伸長反応72°C 1分間を35サイクル行い、72°Cで10分間インキュベートした。

増幅バンドの有無は、反応産物を1.5%アガロースゲ

表1 遺伝子の検出に用いたプライマー

| 検出ウイルス | プライマー | 配列 |
|-----------------------|------------|-------------------------------|
| デングウイルス | Dus | TCAATATGCTGAAACGCGCGAGAAACCG |
| | Duc | TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTTT |
| チクングニアウイルス | Chik10294s | ACGCAATTGAGCGAAGCACAT |
| | Chik10573c | AAATTGTCCTGGTCTTCCTG |
| ジカウイルス | cFD2 | GTGTCCCAGCCGGCGGTGTCATCAGC |
| | MA | CATGATGGGAAARAGRARRAG |
| 日本脳炎ウイルス及びウエストナイルウイルス | Fla-U5004 | GGAACDTCMGGHTCNCCHAT |
| | Fla-U5457 | GTGAARTGDGCYTCRTCCAT |

ルで電気泳動した後、エチジウムブロマイドで染色し、紫外線照射下で確認した。

2015年は8～10月に11市町村26公園、2016年は7～10月に9市町村143公園で蚊の採集を行った(表2)。2015年は、ヒトスジシマカが200匹(メス:138匹, オス:62匹)、オオクロヤブカ *Armigeres subalbatus* (メス) 8匹、ヤマトヤブカ *Ae. japonicus* (メス) 1匹、キンバラナガハシカ *Tripteroides bambusa* (メス) 1匹、不明(メス) 1匹、合計211匹が採集された。

2016年は、ヒトスジシマカが798匹(メス:583匹, オス:215匹)、オオクロヤブカ(メス) 2匹、キンバラナガハシカ(メス) 3匹、合計803匹が採集された。

デング熱等の感染症を媒介する蚊として知られているヒトスジシマカ(メス)が採集されなかった公園は、2015年8カ所、2016年56カ所、計64カ所(37.9%)、最大1～5匹採集されたポイントがあった公園は2015年14カ所、2016年54カ所、計68カ所(40.2%)、最大6～10匹採集されたポイントがあった公園は2015年2カ所、2016年22カ所、計24カ所(14.2%)、11匹以上

採集されたポイントがあった公園は2015年2カ所、2016年11カ所、計13カ所(7.7%)であった(表3)。同一公園内でも、場所により蚊の採集数に差があり、多くの場所で蚊が採集されず、一部のポイントのみ蚊が採集された公園が多く見られた。

蚊の採集数が少なかった公園の植生は、低木がまばらな公園が多く、低木の根本付近に下草が少なく風通しもよく地面が乾燥していた。一方、蚊が11匹以上採集された公園の植生は、連続的に低木が植えられている、または下草が多く生えている状態で、蚊が潜みやすい環境であったと考えられた。また、公園の低木等が隣接する住宅の塀沿いに植えられている場所でも多くの蚊が採集される傾向が見られた。

採集したすべての種類の蚊(メス)をプール(2015年:14プール、2016年:36プール)に分けてRNA抽出を行い、PCR検査を行った結果、デングウイルス、チクングニアウイルス、ジカウイルス、日本脳炎ウイルス、ウエストナイルウイルスはすべてのプールで検出されなかった。

表2 8分間スウィーピング法による蚊種類別捕獲数

| 捕獲年月 年 月 | 捕獲場所 | 調査公園数 | 捕獲数(匹) | | | | | |
|-------------|-----------|-------|---------------|---------------|---------------|--------------|-----------------|----------|
| | | | ヒトスジシマカ メス | ヒトスジシマカ オス | オオクロヤブカ メス | ヤマトヤブカ メス | キンバラナガハシカ メス | 不明 メス |
| 2015 | 8 伊勢原市 | 3 | 3 | 6 | | 1 | | |
| | 8 中井町 | 1 | 3 | 1 | 1 | | | |
| | 9 二宮町 | 4 | 20 | 3 | 4 | | | |
| | 9 大磯町 | 1 | 4 | 1 | | | | 1 |
| | 9 葉山町 | 1 | 2 | 1 | | | | |
| | 9 逗子市 | 3 | 23 | 20 | | | | |
| | 9 南足柄市 | 3 | 13 | 7 | 2 | | | |
| | 10 綾瀬市 | 4 | 61 | 22 | 1 | | 1 | |
| | 10 愛川町 | 3 | 9 | 1 | | | | |
| | 10 清川村 | 1 | 0 | 0 | | | | |
| 10 湯河原町 | 2 | 0 | 0 | | | | | |
| 合計 | | 26 | 138 | 62 | 8 | 1 | 1 | 1 |
| 2016 | 7 湯河原町 | 2 | 0 | 0 | | | | 2 |
| | 7 清川村 | 1 | 1 | 0 | | | | |
| | 8 愛川町 | 2 | 0 | 1 | | | | |
| | 8 秦野市 | 2 | 9 | 0 | | | | |
| | 8 海老名市 | 11 | 29 | 10 | | | | |
| | 8-9 茅ヶ崎市 | 33 | 124 | 32 | | | | |
| | 9 平塚市 | 32 | 138 | 47 | 1 | | | |
| | 9 厚木市 | 32 | 173 | 60 | 1 | | 1 | |
| | 9-10 小田原市 | 28 | 109 | 65 | | | | |
| | 合計 | | 143 | 583 | 215 | 2 | 0 | 3 |

表3 8分間スウィーピング法によるヒトスジシマカの公園内最大捕獲数

| 捕獲年月 年 月 | 捕獲場所 | 調査公園数 | 最大捕獲数(匹) | | | |
|-------------|-----------|-------|----------|-----|------|------|
| | | | 0 | 1-5 | 6-10 | 11以上 |
| 2015 | 8 伊勢原市 | 3 | 1 | 2 | | |
| | 8 中井町 | 1 | | 1 | | |
| | 9 二宮町 | 4 | 2 | 1 | | 1 |
| | 9 大磯町 | 1 | | 1 | | |
| | 9 葉山町 | 1 | | 1 | | |
| | 9 逗子市 | 3 | | 2 | 1 | |
| | 9 南足柄市 | 3 | 1 | 1 | 1 | |
| | 10 綾瀬市 | 4 | | 3 | | 1 |
| | 10 愛川町 | 3 | 1 | 2 | | |
| | 10 清川村 | 1 | 1 | | | |
| | 10 湯河原町 | 2 | 2 | | | |
| 合計 | | 26 | 8 | 14 | 2 | 2 |
| 2016 | 7 湯河原町 | 2 | 2 | | | |
| | 7 清川村 | 1 | | 1 | | |
| | 8 愛川町 | 2 | 2 | | | |
| | 8 秦野市 | 2 | | 2 | | |
| | 8 海老名市 | 11 | 4 | 6 | | 1 |
| | 8-9 茅ヶ崎市 | 33 | 15 | 10 | 5 | 3 |
| | 9 平塚市 | 32 | 13 | 9 | 7 | 3 |
| | 9 厚木市 | 32 | 9 | 12 | 9 | 2 |
| | 9-10 小田原市 | 28 | 11 | 14 | 1 | 2 |
| | 合計 | | 143 | 56 | 54 | 22 |

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30年度）

鈴木理恵子, 高橋淳子, 日紫喜隆行, 近藤真規子

Surveillance of viral gastroenteritis
 in Kanagawa Prefecture
 (April, 2018 – March, 2019)

Rieko SUZUKI, Junko TAKAHASHI,
 Takayuki HISHIKI, Makiko KONDO

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（川崎市、横浜市、横須賀市、相模原市及び藤沢市を除く）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及び学校、施設等で発生した集団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による胃腸炎、冬期後半を中心にA群ロタウイルスによる胃腸炎の流行が良く知られている¹⁾。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、サポウイルス、アストロウイ

ルスも検出されている。また、冬期以外でも幼稚園や小学校及び老人福祉施設でノロウイルス、A群ロタウイルス、サポウイルス及びC群ロタウイルスによる感染性胃腸炎の集団発生報告があることから、時期・年齢に関わらず複数のウイルスの検索を行っている。

平成30年4月から平成31年3月に感染性胃腸炎と診断された患者便63検体について、ノロウイルス、サポウイルス、アストロウイルス、アデノウイルス、A群ロタウイルス及びC群ロタウイルスの検索を行った。ノロウイルス、サポウイルス、アストロウイルスの検出にはRT-PCRを用い、アデノウイルス、A群ロタウイルス及びC群ロタウイルスにはこれらを同時に検出するRT-マルチプレックスPCR²⁾による遺伝子検出を行った。また、検出された各種ウイルスの一部について、ダイレクトシーケンシング法を用いて塩基配列を決定し、系統樹解析（NJ法）による型別を実施した。

表1に年齢別ウイルス検出状況を示した。検査依頼のあった63検体中36検体（57%）が6歳以下の小児からの検体であった。63検体中24検体からウイルスが26株検出され、その内訳は、ノロウイルス10株（38.5%）、アデノウイルス10株（38.5%）、サポウイルス2株（7.7%）アストロウイルス2株（7.7%）A群ロタウイルス2株（7.7%）で、C群ロタウイルスは検出されなかった。また、1歳と22歳の2検体から複数ウイルス検出され、検出ウイルスはサポウイルスとアデノウイルス、アストロウイルスとアデノウイルスであった。

月別のウイルス検出状況を表2に示した。例年、感染性胃腸炎のウイルス検出は、冬期に多く検出される傾向にあるが、平成30年度は例年同様、26株中20株が冬期に検出された。

表1 年齢別ウイルス検出状況（平成30年4月～平成31年3月）

| | 検体数 | 陽性検体数 | 検出ウイルス数 (%) | | | | | | | 合計 (%) |
|---------|-----|------------------|-------------------|--------------------|------------|------------|--------------|------------|----------|-------------|
| | | | ノロウイルス | | サポウイルス | アストロウイルス | アデノウイルス | A群ロタウイルス | C群ロタウイルス | |
| | | | G I ¹⁾ | G II ²⁾ | | | | | | |
| 6歳以下 | 36 | 20 ³⁾ | 0 | 8 | 1 | 2 | 8 | 2 | 0 | 21 |
| 7歳～12歳 | 9 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 13歳～22歳 | 6 | 2 ⁴⁾ | 0 | 0 | 1 | 0 | 2 | 0 | 0 | 3 |
| 23歳～64歳 | 9 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 65歳以上 | 3 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 合計 | 63 | 24 | 10 (38.5) | 8 (31.5) | 2 (7.7) | 2 (7.7) | 10 (38.5) | 2 (7.7) | 0 | 26 (100) |

1: genogroup I
 2: genogroup II
 3: 複数ウイルス検出 1例（アストロウイルス、アデノウイルス）
 4: 複数ウイルス検出 1例（サポウイルス、アデノウイルス）

表 2 月別ウイルス検出状況

| 年 月 | 検出ウイルス数 | | | | | | | 合計 |
|----------|-------------------|--------------------|-----------------|-----------------|-----------------|----------|----------|----|
| | ノロウイルス | | サポウイルス | アストロウイルス | アデノウイルス | A群ロタウイルス | C群ロタウイルス | |
| | G I ¹⁾ | G II ²⁾ | | | | | | |
| 平成30年 4月 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 5月 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 6月 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| 7月 | 0 | 1 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 3 |
| 8月 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 9月 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 10月 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 11月 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 12月 | 0 | 0 | 1 ³⁾ | 1 | 4 ³⁾ | 0 | 0 | 6 |
| 平成31年 1月 | 0 | 4 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 6 |
| 2月 | 0 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 |
| 3月 | 0 | 0 | 0 | 1 ⁴⁾ | 1 ⁴⁾ | 2 | 0 | 4 |
| 小計 | 0 | 10 | | | | | | |
| 合計 | | 10 | 2 | 2 | 10 | 2 | 0 | 26 |

1 : genogroup I
 2 : genogroup II
 3,4 : 複数ウイルス検出例

表 3 ノロウイルス・アデノウイルス遺伝子型別状況

| 年 月 | 型別実施数 | ノロウイルス | | | アデノウイルス | | |
|----------|-------|---------|---------|---------|---------|------|----|
| | | 遺伝子型 | | | 型別実施数 | 遺伝子型 | |
| | | G II. 2 | G II. 4 | G II. 5 | | 2 | 41 |
| 平成30年 4月 | | | | | | | |
| 5月 | | | | | | | |
| 6月 | | | | | 1 | 1 | |
| 7月 | 1 | 1 | | | 2 | 1 | 1 |
| 8月 | 1 | | | 1 | | | |
| 9月 | | | | | | | |
| 10月 | | | | | | | |
| 11月 | | | | | | | |
| 12月 | | | | | 4 | | 4 |
| 平成31年 1月 | 4 | 1 | 3 | | 2 | | 2 |
| 2月 | 4 | | 4 | | | | |
| 3月 | | | | | 1 | 1 | |
| 合計 | 10 | 2 | 7 | 1 | 10 | 3 | 7 |

平成30年度に検出されたノロウイルス10株のgenogroupは、すべてG IIであった。これらの株についてノロウイルスG IIのcapsid領域の一部について塩基配列を決定し系統樹による遺伝子型別を実施した(表3, 図1)。ノロウイルスG IIの遺伝子型はG II.1からG II.22の22種類に分類される。遺伝子型別の結果、10株中 G II.4が7株(70%)で最も多く、G II.2が2株、G II.5が1株であった。

G II.4の7株中5株は、G II.4 (AX76716)、2株は平成24年に報告されたG II.4変異型(JX459908)と同じクラスターを形成していた。全国のノロウイルス主要流行株は、平成26年12月まではG II.4変異型であったが、平成27年度はG II.17変異型、平成28年度はG II.2変異

型、平成29年には再びG II.4変異型に入れ替った。G II.4変異型は、本県でも平成24年から毎年検出され、平成29年度の主要流行株であったが、平成30年度はG II.4 (AX76716)が主要流行株となった。

平成30年の全国の感染性胃腸炎患者数は、平成29年同様、例年より低く推移した(図2)。遺伝子型の入れ替わりや新たな変異型の出現時には、ノロウイルスによる感染性胃腸炎が大流行する可能性が高まる。流行初期の遺伝子型を迅速に解析し新たな変異型の出現を探知し、本格的な流行が始まる前に予防対策の重要性を周知することで、ノロウイルスによる感染性胃腸炎の流行規模を抑えることが可能になると考えられる。

アデノウイルスについてはHexon C4領域の遺伝子型別を実施した(表3)。アデノウイルスのSerotypeは1型から51型の51種類に分類される。遺伝子型別の結果、腸管アデノウイルスとも呼ばれ乳幼児の下痢症を起こすことが多い41型が7株(70%)、2型が3株(30%)であった。また、41型は冬期、2型は夏期に多く検出されていた。

我々は、平成23年度以降、感染性胃腸炎において検出数の多かったウイルスについて系統樹解析(NJ法)を実施し、流行ウイルスの遺伝子学的特徴を調査している。感染経路の推定や流行の動向を把握するためには、系統樹解析による型別が有効であり、解析により新型ウイルスを探知できた場合には、予防対策を早期に講ずる

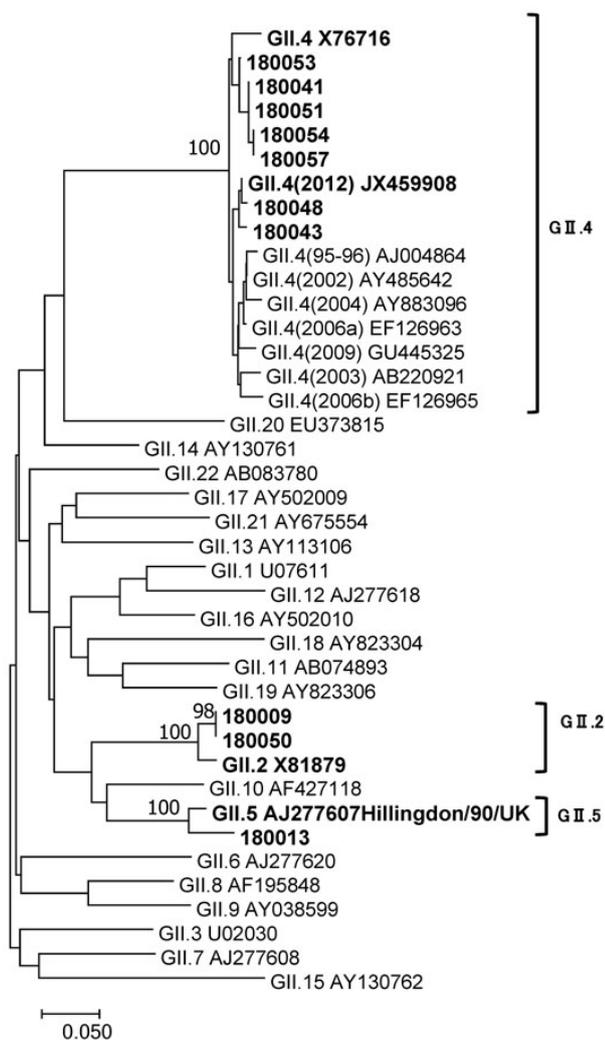


図1 ノロウイルスGII capsid領域の系統樹 (275bp)

ことが可能となる。感染症の流行を未然に防ぐために、今後も継続して遺伝子解析を実施する予定である。また、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、検体及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及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。

文献

- 1) 藤井克樹, 片山和彦：ノロウイルスの概要, 病原体検出情報(IASR), 35, 65-66 (2014)
- 2) Development of RT-multiplex PCR Assay for Detection of Adenovirus and Group A and C Rotaviruses in Diarrheal fecal Specimens from Children in China, 感染症学雑誌 78(8),699-709 (2004)

報告数

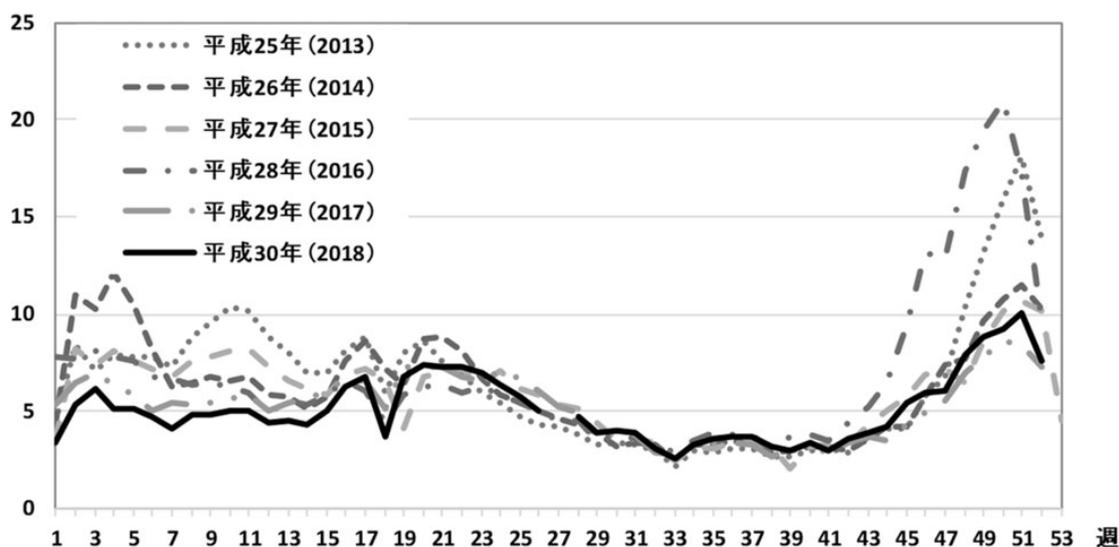


図2 感染性胃腸炎患者定点あたりの報告数 (全国)

資料

神奈川県域における インフルエンザウイルスの 検出状況 (2018/2019シーズン)

渡邊寿美, 嘉手苅将, 佐野貴子,
稲田貴嗣, 近藤真規子

Surveillance of influenza virus in Kanagawa Prefecture (2018/2019 season)

Sumi WATANABE, Sho KADEKARU,
Takako SANO, Takatsugu INADA
and Makiko KONDO

神奈川県域 (横浜市, 川崎市, 相模原市および横須賀市を除く神奈川県内, 以下県域) における季節性インフルエンザ (AH1pdm09, AH3, B) の動向を把握するため, 通年で季節性インフルエンザ調査を行っている。

また, 鳥インフルエンザ (AH5, AH7等) のヒト感染事例が報告されている地域からの帰国者等, 鳥インフルエンザ感染が疑われる患者に対しては, 季節性インフルエンザの他に鳥インフルエンザのAH5とAH7も組み込んだ病原体検査対応を行っている。2018/2019シーズン (以下本シーズン) におけるインフルエンザウイルスの検出状況を報告する。

ウイルス調査は, 2018年9月~2019年3月の間にウイルスサーベイランス (県域の病原体定点調査) 328例, 入院サーベイランス (県域のインフルエンザと診断された入院症例) 29例, 集団かぜ調査 (県域各保健福祉事務所およびセンター, 藤沢市, 茅ヶ崎市の初発事例) 10集団42例, 一般依頼検査 (藤沢市と茅ヶ崎市からの依頼検査) 60例, 計459例の患者検体 (鼻腔ぬぐい液, 咽頭ぬぐい液, うがい液) を対象に行った。ウイルスサーベイランス328例, 入院サーベイランス29例, 集団かぜ42例, 計399例についてMDCK細胞を用いてインフルエンザウイルス分離検査を行った。2代の継代培養を経ても細胞変性効果が見られなかった場合は分離陰性と判定した。分離株 (214株) は, 標準抗血清 (国立感染症研究所配付) とモルモット血球を用いた血球凝集抑制試験 (HI試験) を実施し, AH1pdm09, AH3, Bビクトリア系統, B山形系統に型別した。HI試験に必要なHA価が得られずにHI試験が実施できなかつたり, 標準抗血清との反応が悪くて型別できなかった分離株については, HA遺伝子を検出対象としたリアルタイムRT-PCR法を

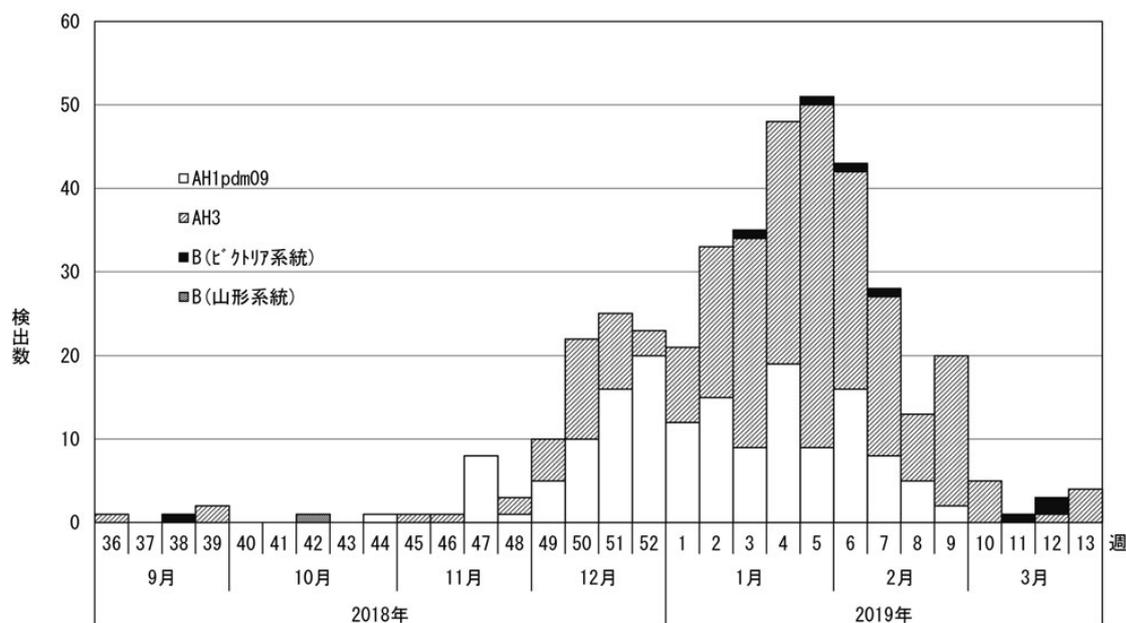


図1 インフルエンザウイルス検出数

表1 入院症例からのインフルエンザウイルス検出状況

| 症例 | 検体採取週 | 年齢 | 症状 | 検出ウイルス |
|----|-------|---------|---------------------|-----------|
| 1 | 2018年 | 39週 96歳 | 発熱（最高38.3℃）、上気道炎、悪寒 | AH3 |
| 2 | | 39週 53歳 | 発熱（最高39.1℃）、上気道炎、悪寒 | AH3 |
| 3 | | 48週 15歳 | 発熱（最高38℃）、咽頭炎 | AH3 |
| 4 | | 52週 3歳 | 発熱（最高40℃）、痙攣 | AH1pdm09 |
| 5 | | 52週 0歳 | 発熱（最高40℃） | AH1pdm09 |
| 6 | | 52週 67歳 | 発熱（最高38.4℃） | AH1pdm09 |
| 7 | | 52週 66歳 | 発熱（最高39.9℃） | AH1pdm09 |
| 8 | | 52週 66歳 | 発熱（最高38℃）、上気道炎 | AH1pdm09 |
| 9 | | 52週 01歳 | 発熱（最高40℃）、熱性痙攣 | AH1pdm09 |
| 10 | | 52週 91歳 | 下気道炎（肺炎） | AH3 |
| 11 | 2019年 | 1週 60歳 | 発熱（最高39℃）、下気道炎 | AH1pdm09 |
| 12 | | 1週 63歳 | 発熱（最高39℃）、肝機能障害 | AH1pdm09 |
| 13 | | 1週 89歳 | 発熱 | AH1pdm09 |
| 14 | | 1週 40歳 | 発熱（最高39.5℃）、意識障害 | AH3 |
| 15 | | 1週 7歳 | 発熱（最高38℃） | AH1pdm09 |
| 16 | | 1週 27歳 | 発熱（最高38℃）、肺炎 | AH1pdm09 |
| 17 | | 1週 84歳 | 発熱（最高38℃）、関節痛、肺炎 | AH3 |
| 18 | | 1週 87歳 | 発熱（最高38℃）、肺炎 | AH3 |
| 19 | | 1週 97歳 | 発熱（最高38℃）、筋肉痛 | AH3 |
| 20 | | 3週 66歳 | 発熱（最高39℃） | AH1pdm09 |
| 21 | | 3週 52歳 | 発熱（最高38.7℃）、下痢、嘔吐 | AH3 |
| 22 | | 3週 1歳 | 発熱（最高40℃）、意識障害 | AH1pdm09 |
| 23 | | 4週 29歳 | 発熱 | AH3 |
| 24 | | 4週 96歳 | 発熱（最高38.4℃）、肺炎 | AH3 |
| 25 | | 4週 78歳 | 発熱（最高40.4℃）、肺炎 | AH1pdm09 |
| 26 | | 5週 90歳 | 発熱（最高37.9℃）、肺炎 | AH3 |
| 27 | | 5週 78歳 | 発熱（最高39.4℃）、上気道炎 | AH3 |
| 28 | | 6週 84歳 | 発熱（最高40.6℃）、意識障害 | AH3 |
| 29 | | 8週 3歳 | 発熱、気管支炎 | AH1pdm09* |

* オセルタミビル耐性

用いて型別した。一般依頼検体60例とウイルス分離陰性検体185例、計245例については、リアルタイムRT-PCR法を用いてインフルエンザウイルスの検出と型別を行った。さらに、AH1pdm09分離株については、NA（ノイラミニダーゼ）遺伝子のオセルタミビル耐性マーカー（H275Y変異）を調査した。

インフルエンザウイルス検出数を図1に示した。2018年9月にAH3が3例、Bビクトリア系統1例、10月にはB山形系統とAH1pdm09が1例ずつ検出され、数は少ないながらもすべての型（亜型）が検出されたが、流行期前（定点あたり患者報告数が1.0人/週を超えていない）¹⁾のこの時点では、どの型が流行の主流になるかは予測できなかった。11月中旬以降に検体数が増えてくると、AH1pdm09およびAH3の検出が続き、本シーズンはAH1pdm09とAH3を中心とした流行になった。検出されたインフルエンザウイルスは403例で、その内訳は、AH3が239例（59.3%）で最も多く、AH1pdm09が155例（38.5%）、Bビクトリア系統が8例（2.0%）、B山形系統が1例（0.2%）であった。

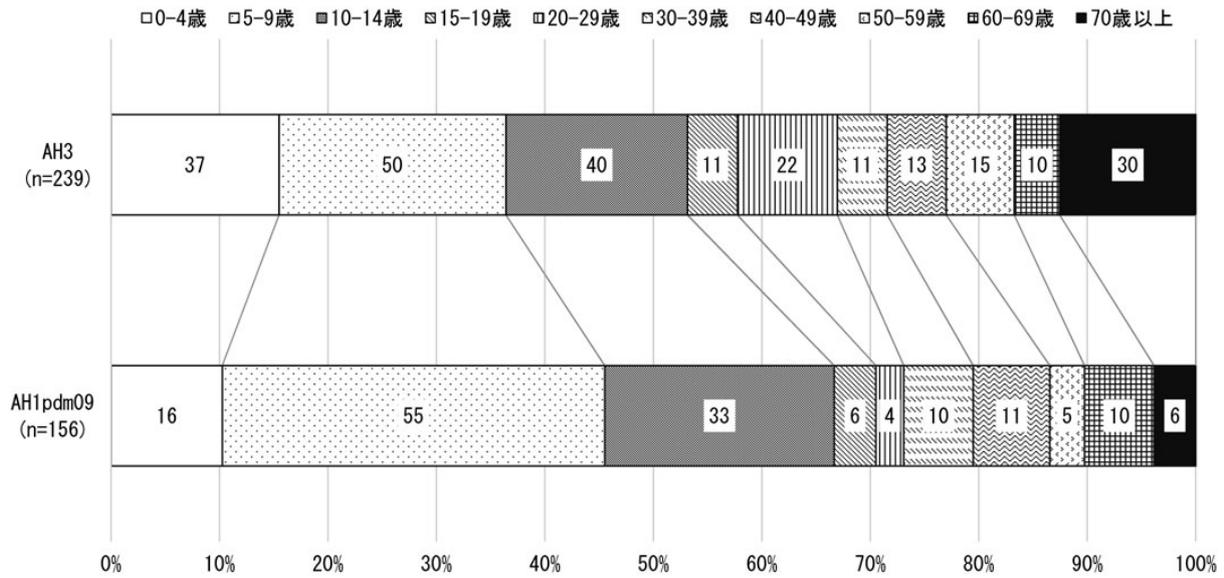
集団かぜ調査においては、11～1月にかけて検査依頼があった。11月の2集団からAH1pdm09、12月の6集団のうち3集団からAH1pdm09、3集団からAH3、

1月の2集団のうち1集団からAH1pdm09、1集団からAH3が検出され、図1のウイルス検出数の推移を反映した結果となった。

入院症例のインフルエンザウイルス検出状況を表1に示した。症例1と2は、流行期前¹⁾の院内感染事例で、2例ともにAH3型が検出された。3例目以降は流行期¹⁾の入院事例で、特に2018年52週～2019年1週の年末年始の症例が16例（AH1pdm09が11例、AH3が5例）で全体の半数を占めていた。3週以降はAH1pdm09が4例、AH3が6例でAH3の方が多く検出された。年齢構成別では、小児（14歳以下）が6例、成人（15歳以上）が23例で成人の方が多く、そのうち11例が70歳以上の高齢者であった。

また、2018年12月に中国からの帰国者でインフルエンザを発症した患者検体についてAH5およびAH7を含めたインフルエンザウイルスの遺伝子検査を行ったところ、AH1pdm09が検出された。この患者は、帰国日に発症しており、渡航先で感染したと考えられた。

AH1pdm09分離株についてNA遺伝子のオセルタミビル耐性マーカーを調査したところ、106株中1株の耐性株を検出した。この株は、入院症例（症例29）からの検出で、検体採取日の6日前にオセルタミビルを処方さ



図中数字は検出数

図2 インフルエンザウイルス検出者の年齢構成

れており、治療の過程で耐性株が出現したと考えられた。鳥インフルエンザ検査を行った1例を含むウイルス検出者全体(404例)の年齢構成は、5～9歳が最も多く110例(27.2%)、次いで10～14歳が73例(18.1%)、0～4歳が53例(13.1%)となっており、小児が58.4%を占めた。他の年齢群は10%未満(4.7～8.9%)であった。検出数の多かったAH1pdm09とAH3の年齢構成は、AH1pdm09(156例)では、5～9歳55例(35.3%)、10～14歳33例(21.2%)、0～4歳16例(10.3%)で、小児が66.7%を占めていた。AH3(239例)は、5～9歳50例(20.9%)、10～14歳40例(16.7%)、0～4歳37例(15.5%)で、AH1pdm09と同様に小児が多く

53.1%を占めていたが、70歳以上30例(12.6%)、20～29歳22例(9.2%)と成人でも患者数の多い年齢群がみられた。(図2)

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所職員の皆様に深謝いたします。

文献

- 1) 神奈川県感染症情報センター：神奈川県感染症発生情報(平成30年36週報～平成31年13週報)

資料

コメの組換えDNA検査方法 におけるマスターミックスの 同等性確認について

大森清美, 垣田雅史, 田中由紀子, 関戸晴子

Evaluation of equivalence of master mix in a test method for the detection of the recombinant DNA in rice.

Kiyomi Ohmori, Masasi Kakita, Yukiko Tanaka
and Haruko Sekido

平成28年8月, 安全性未審査の組換えDNA 技術応用食品の検査方法 (以下, 通知検査法)¹⁾が改正され, 「検査方法の同等性確認方法」が新たに定められた。これに伴い, 「個別検査方法」に記載のないマスターミックスであっても同等性が確認されていれば通知検査法での使用が可能となった。当所では, 遺伝子組換えコメ (63Bt, NNBt, CpTI) の行政検査において, 通知検査法に記載のあるアプライドバイオシステムズ社製の7900HT (以下, 7900HT) とTaqMan universal PCR Master Mix (以下, TMU) を使用してきた。しかし, リアルタイムPCR装置としてロシュ社製LC480 II (以下, LC480 II) を導入したことから, 安全性審査済みのダイズ定量試験²⁾で使用されている比較的安価なEagle Taq Master Mix with ROX (ロシュ社製) (以下, Eagle Taq) を通知検査法でも適用することで検査費用等の削減を図れるものと考えた。そこで, LC480 IIを用いた安全性未審査のコメ検査法におけるTMU及びEagle Taqの同等性の評価を行った。

内在性遺伝子 (PLD) 検知法試験では, シリカゲル膜タイプの抽出精製キット (GM quicker2, ニッポンジーン社製) を用いて, コメ加工品である白玉粉から2並行でDNAを抽出精製しDNA試料原液を調製した。さらにDNA試料原液を滅菌水で10ng/ μ Lに希釈しDNA試料液とした。各DNA試料液に各々TMU及びEagle Taqを

加えて調製したリアルタイムPCR用反応液を2ウェル並行, 合計4ウェルを繰り返し3回測定した。組換えDNA (63Bt, NNBt及びCpTI) の検知は, 市販の陽性プラスミド (ニッポンジーン社製) 原液から2本のリアルタイムPCR用反応液を調製し, PLDと同様に各反応液から2ウェル並行で合計4ウェルを3回測定した。

各々の組換えDNA検知での3回の測定結果についてCp値 (PCR増幅産物が既定の閾値に達したときのサイクル数を示すCrossing Point値, =Ct値) 及びエンドポイント (PCR増幅の最大値) を算出し, 4ウェルごとの平均を集計した (表1)。なお, エンドポイントについては, 「検査方法の同等性確認方法」¹⁾には「大きな差のないことを確認する」と記載があるが, 具体的な数値の基準がないことから判定は行わなかった。一方, Ct値の差の判定基準は, 「Ct値に最大でも1以上の差がない」と記載があるが, 「Ct値の差」については具体的な集計方法の記載がなく, 複数の可能性が考えられた。そこで, 以下の3通り (①~③) の集計方法を想定し, 判定結果を比較した (表1)。

- ① TMU及びEagle Taq各々の最大値と最小値との差
- ② TMU及びEagle Taq各々の平均値同士の差
- ③ TMUの平均値とEagle Taqの個別の測定値との差

各測定値について①~③の集計を行った結果, コメ検査法で検知対象となる全ての遺伝子について, ①~③のいずれの集計方法でも全3回の繰り返し測定結果で「Ct値の差が1未満」の評価基準を満たす検知対象は63Btのみであった。NNBtでは②の集計方法のみが3回の繰り返し測定結果で「Ct値の差が1未満」であったが, PLDおよびCpTIでは①~③のいずれの集計方法でも3回の繰り返し測定結果のうち1回以上はCt値の差が1以上であり, 判定基準を満たさなかった。今回, 同等性確認試験を実施したEagle Taqは, 安全性審査済みのダイズ定量試験で使用されているマスターミックスであり, 検知対象は異なるが通知検査法で使用されている製品である。また, ①~③の集計方法については, 最も厳格なものが①であるが, ②は他と比べて寛容である。それにも関わらずこのような結果が得られたことから, ①~③のいずれの集計方法でも, 3回の繰り返し測定結果の全てで「Ct値の差が1未満」となることは容易ではなく, それはコメ検査法の検知対象に限らず他の検査法においても同様であることが推察された。同等性確認試験の意図は, 検証データに基づいて使用可能な試薬および機器の範囲拡大である。今回の考察を踏まえ, 確認試験がなお「Ct値の差が1未満」であることを必須とするならば, ①~③の集計方法の中では最も寛容な②を適用することが妥当であると考えられた。しかしながら, ②のみでは

表 1 マスターミックスの同等性試験結果

| 検知対象 | 測定回 | マスターミックス | DNA試料液 | Ct値又はCp値 | ①マスターミックス群間での最大値と最小値の差 | Ct値又はCp値の平均 | ②マスターミックス群間での平均値の差 | ③平均(TMU)と個別の反応(Eagle Taq)との差 | RSD(%) | エンドポイント | エンドポイントの平均 | マスターミックス群間での平均値の差 | | |
|---------|-----------|-----------|----------|----------|------------------------|-------------|--------------------|------------------------------|--------|---------|------------|-------------------|-------|-------|
| PLD | 1 | TMU | 1 | 21.89 | 0.97 | 21.88 | 0.93 | 0.09 | 0.09 | 30.75 | 30.24 | 2.58 | | |
| | | | | 21.88 | | | | | | 31.41 | | | | |
| | | | | 21.88 | | | | | | 29.17 | | | | |
| | | ** 21.87 | 29.62 | | | | | | | | | | | |
| | | Eagle Taq | 1 | 22.81 | | | | | | 22.81 | | | 0.93 | 28.18 |
| | | | | 22.81 | | | | | | | | | | 28.01 |
| | * 22.84 | | | 27.31 | | | | | | | | | | |
| | 2 | TMU | 1 | 21.86 | *** 1.04 | 21.87 | *** 1.00 | 0.06 | 0.06 | 27.90 | 26.79 | 1.30 | | |
| | | | | ** 21.85 | | | | | | 27.22 | | | | |
| | | | | 21.89 | | | | | | 26.03 | | | | |
| | | 21.88 | 26.03 | | | | | | | | | | | |
| | | Eagle Taq | 1 | 22.87 | | | | | | 22.87 | | | 1.00 | 26.51 |
| * 22.89 | | | | *** 1.02 | | | | | | | | | | 26.14 |
| 22.86 | 0.99 | | | 24.50 | | | | | | | | | | |
| 2 | TMU | 1 | 21.86 | 0.95 | 21.89 | 0.90 | 0.07 | 0.07 | 27.52 | 26.64 | 3.27 | | | |
| | | | ** 21.87 | | | | | | 27.29 | | | | | |
| | | | 21.91 | | | | | | 25.87 | | | | | |
| | 21.9 | 25.87 | | | | | | | | | | | | |
| | Eagle Taq | 1 | 22.79 | | | | | | 22.79 | | | 0.90 | 23.86 | |
| | | | * 22.81 | | | | | | | | | | 0.92 | 23.74 |
| 22.78 | | | 0.89 | 22.75 | | | | | | | | | | |
| 2 | TMU | 1 | 30.02 | 0.72 | 29.92 | 0.47 | 0.46 | 0.46 | 18.69 | 17.84 | 4.21 | | | |
| | | | 29.98 | | | | | | 17.81 | | | | | |
| | | | 29.86 | | | | | | 16.94 | | | | | |
| | ** 29.8 | 17.94 | | | | | | | | | | | | |
| | Eagle Taq | 1 | * 30.52 | | | | | | 30.39 | | | 0.60 | 22.74 | |
| | | | 30.49 | | | | | | | | | | 0.57 | 22.07 |
| 30.24 | | | 0.32 | 20.71 | | | | | | | | | | |
| 2 | TMU | 1 | 30.05 | 0.54 | 30.12 | 0.40 | 0.18 | 0.18 | 18.90 | 18.23 | 2.05 | | | |
| | | | ** 30.23 | | | | | | 18.80 | | | | | |
| | | | 30.08 | | | | | | 17.92 | | | | | |
| | 30.1 | 17.30 | | | | | | | | | | | | |
| | Eagle Taq | 1 | 30.49 | | | | | | 30.51 | | | 0.37 | 20.10 | |
| | | | * 30.59 | | | | | | | | | | 0.47 | 21.53 |
| 30.46 | | | 0.34 | 20.21 | | | | | | | | | | |
| 2 | TMU | 1 | 30.21 | 0.32 | 30.14 | 0.03 | 0.29 | 0.29 | 17.35 | 17.80 | 0.29 | | | |
| | | | ** 29.92 | | | | | | 18.64 | | | | | |
| | | | 30.19 | | | | | | 18.06 | | | | | |
| | 30.22 | 17.14 | | | | | | | | | | | | |
| | Eagle Taq | 1 | 30.05 | | | | | | 30.11 | | | 0.09 | 18.19 | |
| | | | 30.09 | | | | | | | | | | 0.05 | 19.30 |
| * 30.24 | | | 0.10 | 17.93 | | | | | | | | | | |
| 2 | TMU | 1 | 30.21 | 0.32 | 30.14 | 0.03 | 0.29 | 0.29 | 17.35 | 17.80 | 0.29 | | | |
| | | | ** 29.92 | | | | | | 18.64 | | | | | |
| | | | 30.19 | | | | | | 18.06 | | | | | |
| | 30.22 | 17.14 | | | | | | | | | | | | |
| | Eagle Taq | 1 | 30.05 | | | | | | 30.11 | | | 0.09 | 18.19 | |
| | | | 30.09 | | | | | | | | | | 0.05 | 19.30 |
| * 30.24 | | | 0.10 | 17.93 | | | | | | | | | | |
| 2 | TMU | 1 | 30.21 | 0.32 | 30.14 | 0.03 | 0.29 | 0.29 | 17.35 | 17.80 | 0.29 | | | |
| | | | ** 29.92 | | | | | | 18.64 | | | | | |
| | | | 30.19 | | | | | | 18.06 | | | | | |
| | 30.22 | 17.14 | | | | | | | | | | | | |
| | Eagle Taq | 1 | 30.05 | | | | | | 30.11 | | | 0.09 | 18.19 | |
| | | | 30.09 | | | | | | | | | | 0.05 | 19.30 |
| * 30.24 | | | 0.10 | 17.93 | | | | | | | | | | |
| 2 | TMU | 1 | 30.21 | 0.32 | 30.14 | 0.03 | 0.29 | 0.29 | 17.35 | 17.80 | 0.29 | | | |
| | | | ** 29.92 | | | | | | 18.64 | | | | | |
| | | | 30.19 | | | | | | 18.06 | | | | | |
| | 30.22 | 17.14 | | | | | | | | | | | | |
| | Eagle Taq | 1 | 30.05 | | | | | | 30.11 | | | 0.09 | 18.19 | |
| | | | 30.09 | | | | | | | | | | 0.05 | 19.30 |
| * 30.24 | | | 0.10 | 17.93 | | | | | | | | | | |
| 2 | TMU | 1 | 30.21 | 0.32 | 30.14 | 0.03 | 0.29 | 0.29 | 17.35 | 17.80 | 0.29 | | | |
| | | | ** 29.92 | | | | | | 18.64 | | | | | |
| | | | 30.19 | | | | | | 18.06 | | | | | |
| | 30.22 | 17.14 | | | | | | | | | | | | |
| | Eagle Taq | 1 | 30.05 | | | | | | 30.11 | | | 0.09 | 18.19 | |
| | | | 30.09 | | | | | | | | | | 0.05 | 19.30 |
| * 30.24 | | | 0.10 | 17.93 | | | | | | | | | | |
| 2 | TMU | 1 | 30.21 | 0.32 | 30.14 | 0.03 | 0.29 | 0.29 | 17.35 | 17.80 | 0.29 | | | |
| | | | ** 29.92 | | | | | | 18.64 | | | | | |
| | | | 30.19 | | | | | | 18.06 | | | | | |
| | 30.22 | 17.14 | | | | | | | | | | | | |
| | Eagle Taq | 1 | 30.05 | | | | | | 30.11 | | | 0.09 | 18.19 | |
| | | | 30.09 | | | | | | | | | | 0.05 | 19.30 |
| * 30.24 | | | 0.10 | 17.93 | | | | | | | | | | |
| 2 | TMU | 1 | 30.21 | 0.32 | 30.14 | 0.03 | 0.29 | 0.29 | 17.35 | 17.80 | 0.29 | | | |
| | | | ** 29.92 | | | | | | 18.64 | | | | | |
| | | | 30.19 | | | | | | 18.06 | | | | | |
| | 30.22 | 17.14 | | | | | | | | | | | | |
| | Eagle Taq | 1 | 30.05 | | | | | | 30.11 | | | 0.09 | 18.19 | |
| | | | 30.09 | | | | | | | | | | 0.05 | 19.30 |
| * 30.24 | | | 0.10 | 17.93 | | | | | | | | | | |
| 2 | TMU | 1 | 30.21 | 0.32 | 30.14 | 0.03 | 0.29 | 0.29 | 17.35 | 17.80 | 0.29 | | | |
| | | | ** 29.92 | | | | | | 18.64 | | | | | |
| | | | 30.19 | | | | | | 18.06 | | | | | |
| | 30.22 | 17.14 | | | | | | | | | | | | |
| | Eagle Taq | 1 | 30.05 | | | | | | 30.11 | | | 0.09 | 18.19 | |
| | | | 30.09 | | | | | | | | | | 0.05 | 19.30 |
| * 30.24 | | | 0.10 | 17.93 | | | | | | | | | | |
| 2 | TMU | 1 | 30.21 | 0.32 | 30.14 | 0.03 | 0.29 | 0.29 | 17.35 | 17.80 | 0.29 | | | |
| | | | ** 29.92 | | | | | | 18.64 | | | | | |
| | | | 30.19 | | | | | | 18.06 | | | | | |
| | 30.22 | 17.14 | | | | | | | | | | | | |
| | Eagle Taq | 1 | 30.05 | | | | | | 30.11 | | | 0.09 | 18.19 | |
| | | | 30.09 | | | | | | | | | | 0.05 | 19.30 |
| * 30.24 | | | 0.10 | 17.93 | | | | | | | | | | |
| 2 | TMU | 1 | 30.21 | 0.32 | 30.14 | 0.03 | 0.29 | 0.29 | 17.35 | 17.80 | 0.29 | | | |
| | | | ** 29.92 | | | | | | 18.64 | | | | | |
| | | | 30.19 | | | | | | 18.06 | | | | | |
| | 30.22 | 17.14 | | | | | | | | | | | | |
| | Eagle Taq | 1 | 30.05 | | | | | | 30.11 | | | 0.09 | 18.19 | |
| | | | 30.09 | | | | | | | | | | 0.05 | 19.30 |
| * 30.24 | | | 0.10 | 17.93 | | | | | | | | | | |
| 2 | TMU | 1 | 30.21 | 0.32 | 30.14 | 0.03 | 0.29 | 0.29 | 17.35 | 17.80 | 0.29 | | | |
| | | | ** 29.92 | | | | | | 18.64 | | | | | |
| | | | 30.19 | | | | | | 18.06 | | | | | |
| | 30.22 | 17.14 | | | | | | | | | | | | |
| | Eagle Taq | 1 | 30.05 | | | | | | 30.11 | | | 0.09 | 18.19 | |
| | | | 30.09 | | | | | | | | | | 0.05 | 19.30 |
| * 30.24 | | | 0.10 | 17.93 | | | | | | | | | | |
| 2 | TMU | 1 | 30.21 | 0.32 | 30.14 | 0.03 | 0.29 | 0.29 | 17.35 | 17.80 | 0.29 | | | |
| | | | ** 29.92 | | | | | | 18.64 | | | | | |
| | | | 30.19 | | | | | | 18.06 | | | | | |
| | 30.22 | 17.14 | | | | | | | | | | | | |
| | Eagle Taq | 1 | 30.05 | | | | | | 30.11 | | | 0.09 | 18.19 | |
| | | | 30.09 | | | | | | | | | | 0.05 | 19.30 |
| * 30.24 | | | 0.10 | 17.93 | | | | | | | | | | |
| 2 | TMU | 1 | 30.21 | 0.32 | 30.14 | 0.03 | 0.29 | 0.29 | 17.35 | 17.80 | 0.29 | | | |
| | | | ** 29.92 | | | | | | 18.64 | | | | | |
| | | | 30.19 | | | | | | 18.06 | | | | | |
| | 30.22 | 17.14 | | | | | | | | | | | | |
| | Eagle Taq | 1 | 30.05 | | | | | | 30.11 | | | 0.09 | 18.19 | |
| | | | 30.09 | | | | | | | | | | 0.05 | 19.30 |
| * 30.24 | | | 0.10 | 17.93 | | | | | | | | | | |
| 2 | TMU | 1 | 30.21 | 0.32 | 30.14 | 0.03 | 0.29 | 0.29 | 17.35 | 17.80 | 0.29 | | | |
| | | | ** 29.92 | | | | | | 18.64 | | | | | |
| | | | 30.19 | | | | | | 18.06 | | | | | |
| | 30.22 | 17.14 | | | | | | | | | | | | |
| | Eagle Taq | 1 | 30.05 | | | | | | 30.11 | | | 0.09 | 18.19 | |
| | | | 30.09 | | | | | | | | | | 0.05 | 19.30 |
| * 30.24 | | | 0.10 | 17.93 | | | | | | | | | | |
| 2 | TMU | 1 | 30.21 | 0.32 | 30.14 | 0.03 | 0.29 | 0.29 | 17.35 | 17.80 | 0.29 | | | |
| | | | ** 29.92 | | | | | | 18.64 | | | | | |
| | | | 30.19 | | | | | | 18.06 | | | | | |
| | 30.22 | 17.14 | | | | | | | | | | | | |
| | Eagle Taq | 1 | 30.05 | | | | | | 30.11 | | | 0.09 | 18.19 | |
| | | | 30.09 | | | | | | | | | | 0.05 | 19.30 |
| * 30.24 | | | 0.10 | 17.93 | | | | | | | | | | |
| 2 | TMU | 1 | 30.21 | 0.32 | 30.14 | 0.03 | 0.29 | 0.29 | 17.35 | 17.80 | 0.29 | | | |
| | | | ** 29.92 | | | | | | 18.64 | | | | | |
| | | | 30.19 | | | | | | 18.06 | | | | | |
| | 30.22 | 17.14 | | | | | | | | | | | | |
| | Eagle Taq | 1 | 30.05 | | | | | | 30.11 | | | 0.09 | 18.19 | |
| | | | 30.09 | | | | | | | | | | 0.05 | 19.30 |
| * 30.24 | | | 0.10 | 17.93 | | | | | | | | | | |
| 2 | TMU | 1 | 30.21 | 0.32 | 30.14 | 0.03 | 0.29 | 0.29 | 17.35 | 17.80 | 0.29 | | | |
| | | | ** 29.92 | | | | | | 18.64 | | | | | |
| | | | 30.19 | | | | | | 18.06 | | | | | |
| | 30.22 | 17.14 | | | | | | | | | | | | |
| | Eagle Taq | 1 | 30.05 | | | | | | 30.11 | | | 0.09 | 18.19 | |
| | | | 30.09 | | | | | | | | | | 0.05 | 19.30 |
| * 30.24 | | | 0.10 | 17.93 | | | | | | | | | | |
| 2 | TMU | 1 | 30.21 | 0.32 | 30.14 | 0.03 | 0.29 | 0.29 | 17.35 | 17.80 | 0.29 | | | |
| | | | ** 29.92 | | | | | | 18.64 | | | | | |
| | | | 30.19 | | | | | | 18.06 | | | | | |
| | 30.22 | 17.14 | | | | | | | | | | | | |
| | Eagle Taq | 1 | 30.05 | | | | | | 30.11 | | | 0.09 | 18.19 | |
| | | | 30.09 | | | | | | | | | | 0.05 | 19.30 |
| * 30.24 | | | 0.10 | 17.93 | | | | | | | | | | |
| 2 | TMU | 1 | 30.21 | 0.32 | 30.14 | 0.03 | 0.29 | 0.29 | 17.35 | 17.80 | 0.29 | | | |
| | | | ** 29.92 | | | | | | 18.64 | | | | | |
| | | | 30.19 | | | | | | 18.06 | | | | | |
| | 30.22 | 17.14 | | | | | | | | | | | | |
| | Eagle Taq | 1 | 30.05 | | | | | | 30.11 | | | 0.09 | 18.19 | |
| | | | 30.09 | | | | | | | | | | 0.05 | 19.30 |
| * 30.24 | | | 0.10 | 17.93 | | | | | | | | | | |
| 2 | TMU | 1 | 30.21 | 0.32 | 30.14 | 0.03 | 0.29 | 0.29 | 17.35 | 17.80 | 0.29 | | | |
| | | | ** 29.92 | | | | | | 18.64 | | | | | |
| | | | 30.19 | | | | | | 18.06 | | | | | |
| | 30.22 | 17.14 | | | | | | | | | | | | |
| | Eagle Taq | 1 | 30.05 | | | | | | 30.11 | | | 0.09 | 18.19 | |
| | | | 30.09 | | | | | | | | | | 0.05 | 19.30 |
| * 30.24 | | | 0.10 | 17.93 | | | | | | | | | | |
| 2 | TMU | 1 | 30.21 | 0.32 | 30.14 | 0.03 | 0.29 | 0.29 | 17.35 | 17.80 | 0.29 | | | |
| | | | ** 29.92 | | | | | | 18.64 | | | | | |
| | | | 30.19 | | | | | | 18.06 | | | | | |
| | 30.22 | 17.14 | | | | | | | | | | | | |
| | Eagle Taq | 1 | 30.05 | | | | | | 30.11 | | | 0.09 | 18.19 | |
| | | | 30.09 | | | | | | | | | | 0.05 | 19.30 |
| * 30.24 | | | 0.10 | 17.93 | | | | | | | | | | |
| 2 | TMU | 1 | 30.21 | 0.32 | 30.14 | 0.03 | 0.29 | 0.29 | 17.35 | 17.80 | 0.29 | | | |
| | | | ** 29.92 | | | | | | 18.64 | | | | | |
| | | | 30.19 | | | | | | 18.06 | | | | | |
| | 30.22 | 17.14 | | | | | | | | | | | | |
| | Eagle Taq | 1 | 30.05 | | | | | | 30.11 | | | 0.09 | 18.19 | |
| | | | 30.09 | | | | | | | | | | 0.05 | 19.30 |
| * 30.24 | | | 0.10 | 17.93 | | | | | | | | | | |
| 2 | TMU | 1 | 30.21 | 0.32 | 30.14 | 0.03 | 0.29 | 0.29 | 17.35 | 17.80 | 0.29 | | | |
| | | | ** 29.92 | | | | | | 18.64 | | | | | |
| | | | 30.19 | | | | | | 18.06 | | | | | |
| | 30.22 | 17.14 | | | | | | | | | | | | |
| | Eagle Taq | 1 | 30.05 | | | | | | 30.11 | | | 0.09 | 18.19 | |
| | | | 30.09 | | | | | | | | | | 0.05 | 19.30 |
| * 30.24 | | | 0.10 | 17.93 | | | | | | | | | | |
| 2 | TMU | 1 | 30.21 | 0.32 | 30.14 | 0.03 | 0.29 | 0.29 | 17.35 | 17.80 | 0.29 | | | |
| | | | ** 29.92 | | | | | | 18.64 | | | | | |
| | | | 30.19 | | | | | | 18.06 | | | | | |
| | 30.22 | 17.14 | | | | | | | | | | | | |
| | Eagle Taq | 1 | 30.05 | | | | | | 30.11 | | | 0.09 | 18.19 | |
| | | | 30.09 | | | | | | | | | | 0.05 | 19.30 |
| * 30.24 | | | 0.10 | 17.93 | | | | | | | | | | |
| 2 | TMU | 1 | 30.21 | 0.32 | 30.14 | 0.03 | 0.29 | 0.29 | 17.35 | 17.80 | 0.29 | | | |
| | | | ** 29.92 | | | | | | 18.64 | | | | | |
| | | | 30.19 | | | | | | 18.06 | | | | | |
| | 30.22 | 17.14 | | | | | | | | | | | | |
| | Eagle Taq | 1 | 30.05 | | | | | | 30.11 | | | 0.09 | 18.19 | |
| | | | 30.09 | | | | | | | | | | 0.05 | 19.30 |
| * 30.24 | | | 0.10 | 17.93 | | | | | | | | | | |
| 2 | TMU | 1 | 30.21 | 0.32 | | | | | | | | | | |

表1 つづき

| 検知対象 | 測定回 | マスターミックス | DNA試料液 | Ct値又はCp値 | ①マスターミックス群間での最大値と最小値の差 | Ct値又はCp値の平均 | ②マスターミックス群間での平均値の差 | ③平均(TMU)と個別の反応(Eagle Taq)との差 | RSD(%) | エンドポイント | エンドポイントの平均 | マスターミックス群間での平均値の差 |
|------|-----------|-----------|----------|----------|------------------------|-------------|--------------------|------------------------------|--------|---------|------------|-------------------|
| NNBt | 1 | TMU | 1 | 30.08 | *** 1.22 | 30.04 | 0.97 | 0.75 | 0.75 | 0.75 | 13.36 | 1.30 |
| | | | | ** 29.99 | | | | | | | 13.68 | |
| | | | | 30.01 | | | | | | | 12.90 | |
| | | Eagle Taq | 1 | 30.06 | | 13.77 | | | | | | |
| | | | | * 31.20 | | 15.34 | | | | | | |
| | | | | * 31.21 | | 14.59 | | | | | | |
| | 2 | TMU | 1 | 30.31 | 0.93 | 30.30 | 0.75 | 0.17 | 0.17 | 0.17 | 14.62 | 0.17 |
| | | | | 30.32 | | | | | | | 14.59 | |
| | | | | ** 30.20 | | | | | | | 14.35 | |
| | | Eagle Taq | 1 | 30.36 | | 13.64 | | | | | | |
| | | | | * 31.13 | | 14.61 | | | | | | |
| | | | | 31.03 | | 14.90 | | | | | | |
| 3 | TMU | 1 | 30.33 | 0.26 | 30.32 | 0.02 | 0.24 | 0.24 | 0.24 | 13.84 | 0.47 | |
| | | | 30.28 | | | | | | | 14.59 | | |
| | | | * 30.49 | | | | | | | 13.68 | | |
| | Eagle Taq | 1 | 30.19 | | 13.50 | | | | | | | |
| | | | 30.33 | | 14.44 | | | | | | | |
| | | | 30.25 | | 14.60 | | | | | | | |
| CpTI | 1 | TMU | 1 | 31.73 | *** 1.26 | 31.54 | *** 1.05 | 0.39 | 0.39 | 0.39 | 12.28 | 5.40 |
| | | | | 31.57 | | | | | | | 12.45 | |
| | | | | ** 31.49 | | | | | | | 11.71 | |
| | | Eagle Taq | 1 | 31.38 | | 12.14 | | | | | | |
| | | | | 32.55 | | 17.81 | | | | | | |
| | | | | 32.45 | | 18.34 | | | | | | |
| 2 | TMU | 1 | 32.75 | *** 1.11 | 32.59 | 0.93 | 0.30 | 0.30 | 0.30 | 0.30 | 16.65 | 3.15 |
| | | | 32.62 | | | | | | | | 17.38 | |
| | | | 31.81 | | | | | | | | 12.66 | |
| | Eagle Taq | 1 | 31.79 | | 12.04 | | | | | | | |
| | | | 31.69 | | 11.63 | | | | | | | |
| | | | ** 31.62 | | 12.03 | | | | | | | |
| 3 | TMU | 1 | 32.68 | 0.91 | 32.66 | 0.81 | 0.119 | 0.119 | 0.119 | 0.119 | 16.16 | 4.56 |
| | | | 32.52 | | | | | | | | 15.70 | |
| | | | 32.72 | | | | | | | | 14.93 | |
| | Eagle Taq | 1 | * 32.73 | | 14.16 | | | | | | | |
| | | | 31.74 | | 11.42 | | | | | | | |
| | | | ** 31.66 | | 11.42 | | | | | | | |
| 2 | TMU | 1 | 31.72 | 0.91 | 31.72 | 0.81 | 0.119 | 0.119 | 0.119 | 0.119 | 10.80 | 4.56 |
| | | | 31.75 | | | | | | | | 11.02 | |
| | | | 32.56 | | | | | | | | 16.09 | |
| | Eagle Taq | 1 | * 32.57 | | 15.70 | | | | | | | |
| | | | 32.49 | | 15.56 | | | | | | | |
| | | | 32.51 | | 15.56 | | | | | | | |

精度が判定結果に反映されないことから、②の集計方法を用いる場合は、RSD（相対標準偏差）等の上限値を加えた判定基準の設定を要するものと考えられた。

文献

- 1) 厚生労働省医薬 生活衛生局 生活衛生・食品安全部長，安全性未審査の組換えDNA 技術応用食品の検査方法の一部改正について，生食発0824 第2号，平成28年8月24日。
- 2) 消費者庁次長，食品表示基準について 別添 安全性審査済みの遺伝子組換え食品の検査方法，消食表第135号，平成31年3月28日。

資料

野菜エキス等を使用した食肉製品中の
 亜硝酸根の含有量調査

松阪綾子, 森口真理子, 殿原真生子, 横溝香

Investigation of nitrite in meat products
 using the vegetable extract

Ayako MATSUZAKA, Mariko MORIGUTI,
 Makiko TONOHARA and Kaori YOKOMIZO

発色剤として用いられる亜硝酸塩及び硝酸塩は、安定した食肉の色を保持する効果のほか、ボツリヌス菌をはじめとして多種類の細菌の生育を抑え、食肉製品の腐敗を防止する働きを持つなど様々な効果のある添加物として知られている¹⁾。この亜硝酸塩及び硝酸塩は、食品衛生法において、亜硝酸根として最大残存量が定められている。

近年、「発色剤」として、野菜に含有される硝酸塩を利用した製品が流通するようになっており、発色剤（セロリパウダー）と表示されていた食肉製品から、亜硝酸根が検出された事例があった。硝酸塩は植物がタンパク質を合成するために必要な物質の一つとして土壤中に天然で存在する物質であり、肥料としても使用される窒素化合物である。そのため硝酸塩はもともと野菜中の成分として含まれている²⁾。そこで市販されている食肉製品の表示を調べたところ、野菜パウダーや野菜エキス等を発色剤として使用している製品がいくつか見受けられた。このことから、野菜エキス等を使用した食肉製品中の亜硝酸根含有量を調査した。

試料として、野菜パウダー、野菜エキス等の表示がされている食肉製品20品目を、神奈川県内の小売店及びインターネット販売で購入した。

試薬は0.5mol/L水酸化ナトリウム（富士フィルム和光純薬株式会社製：特級）、硫酸亜鉛七水和物（富士フィルム和光純薬株式会社製：特級）、亜硝酸イオン標準液（富士フィルム和光純薬株式会社製：JCSS）、スルファニルアミド（富士フィルム和光純薬株式会社製：特級）、

N-1-ナフチルエチレンジアミン二塩酸塩（富士フィルム和光純薬株式会社製：特級）及び塩酸（富士フィルム和光純薬株式会社製：特級）を使用した。

装置は紫外可視分光光度計：UV-2600（島津製作所（株）製）を使用した。

試料液の調製及び測定方法は、厚生労働省の通知法に従った³⁾。

野菜エキス等を使用した食肉製品の名称及び原材料名を表1に示した。

表1 食肉製品の名称及び原材料名

| 名称 | 原材料名 |
|-----------------|--|
| 無塩せきウインナーソーセージ | 豚肉、豚脂肪、米粉、食塩、海藻ミネラル、ホークエキス、砂糖、香辛料、麦芽エキス、玉ねぎエキス、酵母エキス、野菜エキス |
| ヒレハム(スライス) | 豚ヒレ肉(九州産)、食塩、タンパク加水分解物、香辛料、魚藻エキス、酵母エキス、発色剤(野菜エキス) |
| サラミソーセージ(スライス) | 豚肉(九州産)、豚脂肪、食塩、香辛料、ジン、ぶどう糖、乳酸菌、発色剤(野菜エキス) |
| リオンソーセージ(スライス) | 豚肉(国産)、豚脂肪、鶏肉、チーズ、ドライトマト、タンパク加水分解物、食塩、香辛料、植物油、酵母エキス、魚藻エキス、発色剤(野菜エキス)(原材料の一部に乳を含む) |
| 無塩せきウインナーソーセージ | 豚肉、豚脂肪、でん粉、食塩(食塩中に島の種塩9%使用)、野菜エキス、牛乳、糖類(ぶどう糖、砂糖)、香辛料、デキストリン、pH調整剤、リン酸塩(Na)、調味料(アミノ酸)、パプリカ色素、(原材料の一部に小麦を含む) |
| ロースハム(スライス) | 豚ロース肉(九州産)、食塩、香辛料、タンパク加水分解物、酵母エキス、魚藻エキス、発色剤(野菜エキス) |
| ベーコン(スライス) | 豚ばら肉(九州産)、食塩、香辛料、タンパク加水分解物、酵母エキス、魚藻エキス、発色剤(野菜エキス) |
| 鶏肉加工品 | 鶏肉(華味島むね肉)、食塩、タンパク加水分解物、香辛料、魚藻エキス、酵母エキス、発色剤(野菜エキス) |
| ウインナーソーセージ(ホーク) | 豚肉(国産)、豚脂肪、タンパク加水分解物、食塩、香辛料、植物油、酵母エキス、魚藻エキス、発色剤(野菜エキス) |
| ウインナーソーセージ(ホーク) | 豚肉(国産)、豚脂肪、食塩、タンパク加水分解物、香辛料、植物油、酵母エキス、魚藻エキス、発色剤(野菜エキス) |
| ボンレスハム(スライス) | 豚モモ肉(九州産)、食塩、タンパク加水分解物、香辛料、酵母エキス、魚藻エキス、発色剤(野菜エキス) |
| 無塩せきベーコン(スライス) | 豚ばら肉、乳たん白、食塩、糖類(砂糖、水飴)、ホークエキス、酵母エキス、麦芽エキス、香辛料、野菜エキス |
| レバーソーセージ | 国産豚肉、豚レバ、塩、ワイン、玉ねぎ、香辛料、発色剤(野菜パウダー)酸化防止剤(ビタミンC) |
| レバーソーセージ | 国産豚肉、豚レバ、塩、ワイン、玉ねぎ、香辛料、発色剤(野菜パウダー)、酸化防止剤(ビタミンC) |
| タックドソーセージ | 国産豚肉、塩、砂糖、香辛料、酸化防止剤(ビタミンC)、リン酸塩(Na)、発色剤(野菜パウダー) |
| ロースハム(スライス) | 豚ロース肉(国産)、岩塩、香辛料、たんばく加水分解物、砂糖、発色剤(乾燥濃縮セロリジュース)、トレハロース |
| ビーフジャーキー | 牛肉、砂糖、大豆たん白、食塩、香辛料、調味料(アミノ酸)香辛料抽出物、保存料(発酵濃縮セロリジュース粉末)、くん漬 |
| 無塩せきボンレスハムスライス | 豚肉(茨城産)、食塩、砂糖、切干大根、昆布 |
| 無塩せきロースハムスライス | 豚肉(茨城産)、食塩、砂糖、切干大根、昆布 |
| 無塩せきベーコン(スライス) | ばら肉、食塩、砂糖、切干大根、昆布 |

発色剤（野菜エキス等）と表示されていたものは20製品中13製品あり、その内訳は野菜エキスが9製品、野菜パウダーが3製品、乾燥濃縮セロリジュースが1製品であった。また、保存料（発酵濃縮セロリジュース粉末）と表示されていたものが1製品、発色剤の表示はなく、「野菜エキス」と表示されていたものが3製品、野菜加工品（切干大根）の名称が表示されていたものが3製品あった。

亜硝酸根含有量(g/kg)を表2に示した。

発色剤と表示されていた13製品は、全てにおいて亜硝酸根の含有が確認された。しかし、亜硝酸根含有量は0.001~0.012g/kgであり、製品により幅が見られた。

今回調査した20製品において、食肉製品における亜硝酸根としての最大残存量0.070g/kgを上回るものはなかった。しかし発色剤として表示がない4製品においても亜硝酸根が確認され、その亜硝酸根含有量は、保存料（発酵濃縮セロリジュース粉末）と表示されていた1製品において0.002g/kg、野菜加工品（切干大根）の名称が表示されていた3製品において0.002~0.020g/kgであった。これらの結果は野菜に含有される硝酸塩の影響によるものと考えられた。このため「無添加」または「無塩せき」と表示されていた場合においても、原材料に野菜等を用いた製品においては、亜硝酸根が含有される可能性が懸念された。

従来、食肉製品に発色剤として使用されている添加物

は、亜硝酸ナトリウム、硝酸カリウム、硝酸ナトリウムであるが、野菜に含有される硝酸塩を発色剤として使用している製品も市場には流通している。このため、亜硝酸塩や硝酸塩の供給源となる成分を有する野菜エキスや野菜加工品等を食肉製品に用いることは、食品添加物としての使用に該当する可能性があることが考えられる。今回調査した製品においても、「発色剤」の表示がない製品の一部から亜硝酸根が確認されたことから、野菜エキスや野菜加工品等を食品の発色や保存等の目的として使用する場合には、用途を「発色剤」と明記することは必要であると考えられた。最後に、本調査を実施するにあたりご協力頂きました山田宏子氏に深謝いたします。

文献

- 1) 食品安全委員会：食品安全総合情報システム 亜硝酸ナトリウム（発色剤）について
<http://www.fsc.go.jp/fsciis/questionAndAnswer/show/mob07005000017>
- 2) 農林水産省：硝酸塩の健康への影響
http://www.maff.go.jp/j/syouan/seisaku/risk_analysis/priority/syosanen/eikyo/
- 3) 衛乳第54号 厚生省生活衛生局長通知:平成5年3月17日

表2 亜硝酸根含有量(g/kg)

| 原材料名に表示されている野菜成分等の名称 | 名称 | 亜硝酸根の含有量 (g/kg) (平均値±S. D. n=3) |
|----------------------|-----------------|------------------------------------|
| 野菜エキス | 無塩せきウインナーソーセージ | ND |
| 発色剤(野菜エキス) | ヒレハム(スライス) | 0.004±0.0001 |
| 発色剤(野菜エキス) | サラミソーセージ(スライス) | 0.006±0.0006 |
| 発色剤(野菜エキス) | リオナソーセージ(スライス) | 0.008±0.0002 |
| 野菜エキス | 無塩せきウインナーソーセージ | ND |
| 発色剤(野菜エキス) | ロースハム(スライス) | 0.003±0.0002 |
| 発色剤(野菜エキス) | ベーコン(スライス) | 0.003±0.0001 |
| 発色剤(野菜エキス) | 鶏肉加工品 | 0.012±0.0015 |
| 発色剤(野菜エキス) | ウインナーソーセージ(ポーク) | 0.003±0.0003 |
| 発色剤(野菜エキス) | ウインナーソーセージ(ポーク) | 0.004±0.0004 |
| 発色剤(野菜エキス) | ボンレスハム(スライス) | 0.004±0.0003 |
| 発色剤(野菜エキス) | 無塩せきベーコン(スライス) | ND |
| 発色剤(野菜パウダー) | レバーソーセージ | 0.003±0.0001 |
| 発色剤(野菜パウダー) | レバーソーセージ | 0.003±0.0005 |
| 発色剤(野菜パウダー) | クックドソーセージ | 0.004±0.0005 |
| 発色剤(乾燥濃縮セロリジュース) | ロースハム(スライス) | 0.001±0.0001 |
| 保存料(発酵濃縮セロリジュース粉末) | ビーフジャーキー | 0.002±0.0002 |
| 切干大根 | 無塩せきボンレスハムスライス | 0.020±0.0008 |
| 切干大根 | 無塩せきロースハムスライス | 0.002±0.0001 |
| 切干大根 | 無塩せきベーコン(スライス) | 0.002±0.0001 |

ND< 0.001g/kg

他誌掲載論文抄録

(平成30年4月～平成31年3月)

High-throughput neutralization assay for multiple flaviviruses based on single-round infectious particles using dengue virus type 1 reporter replicon.

Matsuda M, Yamanaka A, Yato K, Yoshii K, Watashi K, Aizaki H, Konishi E, Takasaki T, Kato T, Muramatsu M, Wakita T, Suzuki R. *Sci Rep.* 8(1):16624. doi: 10.1038/s41598-018-34865-y. 2018

デングウイルス、ジカウイルスなどのフラビウイルス属のウイルスの中には、重篤な病気を引き起こすあるいは世界的に大きな流行を引き起こすウイルスがある。フラビウイルス属のウイルスは血清学的に交差反応をきたしやすく、IgM抗体、IgG抗体ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) により鑑別するのは困難である。そのため1回感染性粒子 (SRIP: single-round infectious particles) を使ってレポーターによる中和試験法を開発した。SRIPはルシフェラーゼ遺伝子とデングウイルスのC領域を組み込んだデングウイルス1型レプリコンにデングウイルス2, 3, 4型, ジカウイルス, 日本脳炎ウイルス, ウエストナイルウイルス, 黄熱ウイルス, ウツスウイルス, ダニ媒介性脳炎ウイルスの構造遺伝子prMおよびE領域を組み込みヒト胎児腎臓由来細胞293Tに導入増殖し作製した。それぞれのSRIPを感染させた細胞のルシフェラーゼ活性は感染細胞数とよく相関し、対応するフラビウイルス抗原で免疫したマウスからの血清によって特異的に中和された。各種フラビウイルスに対するハイスループットレポーターSRIPを用いた中和抗体価測定は、フラビウイルス属感染症の病因をスクリーニングするために、従来のプラーク減少中和試験よりも速く、より安全で労力のかからない診断方法である。

Comparison of Neutralizing Antibody Titers against Japanese Encephalitis Virus Genotype V Strain with Those against Genotype I and III Strains in the Sera of Japanese Encephalitis Patients in Japan in 2016.

Maeki T, Tajima S, Kyaw AK, Matsumoto F, Miura K, Yamashita A, Yoshikawa A, Negishi K, Noguchi Y, Tadokoro K, Abe K, Taruya J, Koh J,

Ito H, Ikegaya A, Abe F, Wada M, Nishigata T, Ikeda M, Kato F, Taniguchi S, Nakayama E, Takasaki T, Morita K, Lim CK, Saijo M. *Jpn J Infect Dis.* 21;71(5):360-364. 2018

日本脳炎ウイルス (JEV) は単一血清型のウイルスであるが、遺伝子型ではI～V型に分類される。近年、中国や韓国でV型ウイルスの検出が頻回に報告されている。現在、日本で活動しているウイルスは遺伝子I型であり、V型は日本国内に侵淫した形跡はない。2016年に対馬で4人の日本脳炎 (JE) 患者が発生したこともあり、JEV遺伝子型V株が2016年に日本で何らかのJE症例を引き起こしたかどうかを決定することを試みた。血清および脳脊髄液サンプルは、2016年に日本で報告された10人のJE患者から収集した。すべてのサンプルからウイルス遺伝子を検出できなかった。そこで、遺伝子型ではあるが原因となるJEVが遺伝子型V型であった場合に、日本のJE患者の血清中のJEV遺伝子V型株に対する中和抗体価は、遺伝子型IおよびIII株に対する中和抗体価よりも高い可能性を考慮し、それぞれの遺伝子型に対して中和抗体価を測定した。遺伝子V型株に対する中和抗体価は、いずれの血清試料においても遺伝子型IまたはIII株に対する中和抗体価よりも高くなかった。したがって、JEV遺伝子V型が2016年に日本で何らかのJE症例を引き起こしたという確証は得られなかった。

Persistent viruses in mosquito cultured cell line suppress multiplication of flaviviruses.

Fujita R, Kato F, Kobayashi D, Murota K, Takasaki T, Tajima S, Lim CK, Saijo M, Isawa H, Sawabe K. *Heliyon.* 23;4(8):e00736. 2018

日本研究バイオリソースコレクション (JCRB) 細胞バンクおよび欧州認証培養細胞コレクション (ECACC) から得たヒトスジマカ由来の C6 / 36細胞株におけるフラビウイルスの増殖動態解析において、これら2つの細胞株はジカウイルス (ZIKV), デングウイルス (DENV), および日本脳炎ウイルス (JEV) に対して異なる感受性を示した。次世代シーケンシング解析は、JCRBのC6/36株がいかなる細胞変性効果も示さずに持続的に2つのウイルスに感染していたことを明らかにした。

1つのウイルスはヒトスジマカから発見されたMenghaiラブドウイルス (MERV) であり、他方はシノピテトラウイルス (SHTV) と命名された新規ウイルスであった。JCRBのC6/36株に持続感染しているこれらのウイルスをクローニングして、それぞれECACCのC6/36株に感染させたところ持続感染が成立した。C6/36細胞におけるジカウイルスの増殖はSHTVやMERVの持続感染で抑えられることが明らかになった。ラブドウイルスまたはパームテトラウイルスによる持続感染が蚊細胞におけるフラビウイルス複製を抑制することを初めて明らかにした。

Human monoclonal antibodies against West Nile virus from Japanese encephalitis-vaccinated volunteers.

Ozawa T, Masaki H, Takasaki T, Aoyama I, Yumisashi T, Yamanaka A, Konishi E, Ohnuki Y, Muraguchi A, Kishi H. *Antiviral Res.*154:58-65. 2018

ウエストナイルウイルス (WNV) はフラビウイルス科フラビウイルス属の日本脳炎血清型群に分類される蚊媒介性RNAウイルスである。ウエストナイル脳炎の多くは不顕性感染であるが依然として死亡率は4~14%と重篤な疾患である。日本脳炎ウイルスに近縁なWNVに対するヒト中和抗体治療薬の開発が強く期待されているが、WNVは、その高い安全レベルの要件のために、BSL2で開発することは出来ない。そこで日本脳炎不活化ワクチン接種者の末梢血単核球からヒトWNVモノクローナル中和抗体を作出した。これらの抗体はインビトロおよびインビボの両方でWNV中和能を示した。この結果は、WNVおよび他の日本脳炎血清型群ウイルスに対する免疫学的治療薬を開発するための抗体交差反応性を用いた新しい戦略を示した。

医療機関の給水設備におけるレジオネラ属菌の汚染実態

大屋日登美, 鈴木美雪, 政岡智佳, 中嶋直樹, 古川一郎 (神奈川衛研), 前川純子, 倉文明, 泉山信司(国立感染症研究所), 黒木俊郎 (神奈川衛研) *感染症学雑誌*,92,678-685 (2018)

院内感染のレジオネラ症が世界で報告されており、給水設備が感染症に関与していることが知られている。しかし、我が国における医療機関の給水設備のレジオネラ属菌による汚染実態はあまり明らかにされていない。本調査では、神奈川県内の3医療機関を対象に給水設備のレジオネラ属菌による汚染を遺伝子の検出と培養により調査した。医療機関内の蛇口水及びシャワー水と蛇口及びシャワーヘッドのスワブを検体とし、3医療機関での

レジオネラDNAの検出は水試料では6.7~93.8%、スワブ試料では0~7.1%であり、培養によるレジオネラ属菌の検出は水試料では26.7~66.7%、スワブ試料では0~14.3%であった。検出されたレジオネラ属菌は、*Legionella pneumophila* SG1, SG5, SG6, *Legionella feeleii* SG1及び*Legionella* sp. L-29であった。水試料の温度、pH、遊離残留塩素濃度、従属栄養細菌数を計測し、レジオネラDNA及びレジオネラ属菌の検出との関連をロジスティック回帰分析により解析したところ、遊離残留塩素濃度との間に負の関連がみられた。医療機関の給水設備において高率にレジオネラ汚染が発生しており、汚染防止対策が強く求められる結果となった。

Comparative evaluation of the Geenius HIV 1/2 Confirmatory Assay and the HIV-1 and HIV-2 Western blots in the Japanese population.

近藤真規子, 佐野貴子 (神奈川衛研), 須藤弘二 (慶應義塾大学医学部), 川畑拓也, 小島洋子, 森治代 (大阪健康安全基盤研究所), 井戸田一朗 (しらかば診療所), 岩室紳也 (厚木市立病院), 吉村幸浩, 立川夏夫 (横浜市立市民病院), 藤原宏, 長谷川直樹, 加藤真吾 (慶應義塾大学医学部), *PLoS ONE* 13(10): e0198924, (2018)

HIVの抗体確認検査としてこれまで長期にわたりウエスタンブロット法 (WB) が使用されてきたが、WBはスクリーニング検査に比べ感度が悪い、HIV-1抗体とHIV-2抗体の交差反応性等の問題があり、信頼性の高い確認検査法やHIV-1/2の鑑別法の開発が必要とされていた。最近WBの改良法としてGeeniusが開発され、アメリカCDCのガイドラインにおいては既にGeeniusの使用が承認されている。我々は日本のHIV検査ガイドラインにGeeniusを導入することを目的として、抗体確認検査及びHIV-1/2鑑別能力について評価した。その結果GeeniusはWBより早い時期から陽性を確認でき、かつHIV-1/2の鑑別能も優れており、HIVの早期診断に有効な検査法であることが明らかとなり、今後、早期に日本のHIV診断システムに導入すべきと考えられた。

Quantitative analysis of Clenbuterol in pig liver by LC-MS/MS/MS. (LC-MS/MS/MSによる豚肝臓中のクレンプテロール分析法)

林 孝子, 藤巻照久, 宮澤真紀 (神奈川衛研) *Chromatography*, 39, 131-137 (2018)

豚の肝臓を対象としたクレンプテロール迅速分析法において、LC-MS/MS/MS測定による定量分析法を検討

した。LC-MS/MSによるSRMモード測定では、試料から目的成分の保持時間近辺に妨害ピークが確認されたが、LC-MS/MS/MS測定では妨害ピークが除かれ、特異性の高いクロマトグラムが得られた。LC-MS/MS/MS測定による定量分析法の妥当性評価の結果、真度は102%、併行精度は5.5%および室内精度は5.1%となり、良好な結果が得られた。また、サロゲートとして用いたクレンプテロール-d9の回収率も73.0%となり、選択性、定量限界においても妥当性が確認された。LC-MS/MS/MS測定は、SRMモード測定でマトリックスによる影響により定量が困難な場合、妨害ピークの影響を回避する選択性の高い定量分析法の一つとして有用であると考えられる。

石英繊維フィルターの粒子捕集効率とフタル酸エステル類の粒径分布

齋藤 育江, 大貫 文 (東京都健安研), 香川 (田中) 聡子 (横浜薬大), 千葉 真弘 (北海道衛研), 上村 仁 (神奈川県衛研), 神野 透人 (名城大), 酒井 信夫 (国立衛研), 小西 浩之, 守安 貴子 (東京都健安研), 東京都健康安全研究センター研究年報, 69, 205-211, (2018)

室内空気中のフタル酸エステル類測定用のサンプラーに、粒子捕集効率の異なる3種の石英繊維フィルターを用い、フタル酸エステル類の捕集状況を比較した。DEHP及びBBPはいずれのフィルターでもほぼ100%捕集されていたが、DEP, DiBP及びDnBPは粒子捕集効率の大きいフィルターの方が捕集割合が高かった。特にDEPで捕集割合が低かった。3種の石英繊維フィルターの粒子捕集効率を実測したところ、各フィルターは平均粒径0.039 μ mの粒子を88%以上捕集可能であることが分かった。また、室内空気中フタル酸エステル類の粒径分布を測定した結果、DEHP及びBBPの粒径分布が明らかになり、最頻粒子径はDEHPが0.5 μ m~0.8 μ m、BBPが6.31 μ mで、2物質とも平均粒径0.039 μ m以上に大部分が分布することが判明した。

甘茶が原因と考えられる食中毒について

小島尚 (帝京科学大学), 甲斐茂美, 岸弘子, 上村仁, 宮澤真紀 (神奈川県衛生研究所), 佐竹元吉 (昭和薬科大学), 日本調理科学会誌 (J. Cookery Sci. Jpn.), 51 (2), 133-134 (2018)

アマチャが原因と考えられる健康被害について、食中毒扱いとなった神奈川県内の事例について報告する。花まつりに参加していた児童ら多数が、悪心、嘔吐等の食中毒様症状を呈した。患者が飲用した甘茶残液等について、マウス生体反応、化学分析、アマチャ原木の鑑定を行い事故原因の究明を行った。更に、味覚認識装置を用い、甘茶による健康被害の原因を検討した。本事例は、農薬や重金属等の混入やアジサイ等の植物との取り違いではなく、甘茶中の苦味成分が高濃度であったことが原因であることが示唆された。

Densification of cyanobacteria from a lake leading to production of β -cyclocitral and related volatile organic compounds and species change (湖で発生するラン藻類の高密度化によっておこる β -シクロシトラールや関連する揮発性有機化合物の生成と種の変遷)

有井鈴江 (名城大学), 辻 清美 (神奈川県衛研), 富田浩嗣, 長谷川真照 (愛知衛研), 山下竜司, Beata Bober, 原田健一 (名城大学), Phycological Research, 66, 161-166 (2018)

湖等で発生するラン藻類の溶藻機構の解明のため、実験室内でモデル実験を行った。ラン藻類を濃縮するために、ガス小胞の浮力を利用した濃縮法(メスシリンダー法)を用いた。湖から採取したラン藻のスカムは主に *Dolichospermum* spp. と *Microcystis* を含み、分散したラン藻類は数時間後に表層に濃縮された。濃縮したラン藻類は徐々に溶藻し、 β -シクロシトラールおよび β -イオノンと共にその酸化生成物が検出された。 β -シクロシトラールは対応するカルボン酸に容易に酸化され、メスシリンダー中の水のpHは低下した。pHの低下とともにフィコシアニンが溶出し、青色化を伴う溶藻が確認できた。

Bulletin of Kanagawa Prefectural Institute of Public Health No.49 (October, 2019)

CONTENTS

Review

Surveillance study to assure safety of food products and medicine

- Neurobehavioral assays to evaluate the effect of illegal drugs
Maki MIYAZAWA 1

Short reports

Surveillance study on monitoring and prevention of infectious disease

- The analysis of changes in the number of HIV tests and positive cases in public health centers at Kanagawa Prefecture
Takako SANO, Sho KADEKARU, Sumi WATANABE, Rieko SUZUKI, Takatsugu INADA
and Makiko KONDO 7

Surveillance study to assure safety of food products and medicine

- Study on analytical method for DNA quantitative examination of the genetically modified soybean
Masashi KAKITA, Yosuke UCHIYAMA, Yukiko TANAKA, Haruko SEKIDO
and Kiyomi OHMORI 13
- Simultaneous analysis of preservatives in cosmetics by HPLC using Phenyl Column
Chikako HADA, Shigemi KAI, Kenichi KUMASAKA, Maki MIYAZAWA 18

Data

Surveillance study on monitoring and prevention of infectious disease

- Occurrence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in Kanagawa Prefecture (April,2018-March,2019)
Ichiro FURUKAWA, Tomoka MASAOKA, Naoki NAKAJIMA 22
- Survey on mosquitoes in parks in Kanagawa Prefecture
Takatsugu INADA 26
- Surveillance of viral gastroenteritis in Kanagawa Prefecture (April, 2018 – March, 2019)
Rieko SUZUKI, Junko TAKAHASHI, Takayuki HISHIKI, Makiko KONDO 29
- Surveillance of influenza in Kanagawa Prefecture (2018/2019 season)
Sumi WATANABE, Sho KADEKARU, Takako SANO, Takatsugu INADA and Makiko KONDO ... 32

Surveillance study to assure safety of food products and medicine

- Evaluation of equivalence of master mix in a test method for the detection of the recombinant DNA in rice
Kiyomi OHMORI, Masasi KAKITA, Yukiko TANAKA, Haruko SEKIDO 35
- Investigation of nitrite in meat products using the vegetable extract
Ayako MATSUZAKA, Mariko MORIGUTI, Makiko TONOHARA and Kaori YOKOMIZO 39

-
- Abstracts of original papers by research staffs (April, 2018 - March, 2019) 41
-