

神奈川県衛生研究所研究報告

第48号（平成30年10月）

目 次

総説

感染症の監視と予防に関する調査研究

蚊媒介ウイルス感染症～日本脳炎とデング熱～

高崎智彦 1

未治療HIV感染者における薬剤耐性株の動向

近藤真規子 6

短報

感染症の監視と予防に関する調査研究

肺炎マイコプラズマの検出状況および薬剤耐性菌出現状況の解析（2013～2016年度）

大屋日登美，古川一郎，中嶋直樹，三谷詠里子，鈴木美雪，黒木俊郎 12

神奈川県域におけるインフルエンザの流行状況（2017/2018シーズン）

渡邊寿美，嘉手苅将，佐野貴子，近藤真規子，黒木俊郎 17

食品と医薬品の安全・安心に関する調査研究

合成樹脂製の器具・容器包装におけるカドミウム及び鉛材質試験に関する検討

関戸晴子，清水 碧，垣田雅史，田中由紀子，飯島育代，岸 弘子 22

ミョウバンの識別分析について

外館史祥，羽田千香子，甲斐茂美，熊坂謙一 27

資料

感染症の監視と予防に関する調査研究

神奈川県における腸管出血性大腸菌の検出状況（平成29年度）

古川一郎，政岡智佳，中嶋直樹 31

感染性胃腸炎患者からの原因ウイルス検出状況（平成29年度）

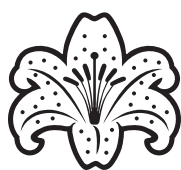
鈴木理恵子，高橋淳子，近藤真規子，黒木俊郎 36

食品と医薬品の安全・安心に関する調査研究

ヒスタミンが原因と疑われる有症苦情事例

脇ますみ，甲斐茂美，福光徹，林孝子，関戸晴子 39

他誌掲載論文抄録（平成29年4月～平成30年3月） 41



県の花：山ゆり

神奈川県衛生研究所（平成30年度）

高 崎 智 彦	山 下 穰
白 井 政 美	白 土 弘 美
玉 木 博 志	寺 西 大
近 藤 真規子	宮 澤 眞 紀
山 崎 直 美	

神奈川県衛生研究所研究報告編集員（平成30年度）

玉 木 博 志（編集長）	戸 村 比呂子
田 坂 雅 子	中 嶋 直 樹
佐 野 貴 子	関 戸 晴 子
外 館 史 祥	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48号

平成30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

蚊媒介ウイルス感染症 ～日本脳炎とデング熱～

高崎智彦

Mosquito-borne viral diseases —Japanese encephalitis and dengue fever—

Tomohiko TAKASAKI

Key Words : Japanese encephalitis, dengue fever,

Vector, Fcγ receptor,

Callithrix jacchus

はじめに

蚊媒介ウイルス感染症のなかで、日本が大きな役割を果たした疾患として日本脳炎とデング熱があげられる。日本脳炎ウイルス、デングウイルスとも世界で初めて日本人により分離された。日本脳炎ウイルスに対するワクチンは、1954年に実用化された後、改良が重ねられVero細胞を用いた細胞培養不活化ワクチンが実用化され現在に至っている。また日本脳炎ウイルスがブタとコガタアカイエカの間で生活環を形成していることが国立予防衛生研究所と多くの地方衛生研究所の協力によって1960年代に明らかにされた。一方、2014年に東京で国内流行が発生したデング熱については、その流行の歴史とワクチン開発の困難な理由とワクチン評価のための動物モデル開発について新世界ザルであるマーモセットを用いた霊長類モデルを中心に詳述する。

日本脳炎研究の歴史

日本脳炎ウイルスが蚊によって媒介されることは、昭和10年から16年にかけて日本の研究陣が明らかにした世界に誇る業績であった。昭和10年（1935年）には日本脳炎患者の脳組織から日本脳炎ウイルス（中山株）が初めて分離され、中山株は戦後の日本脳炎ワクチン製造用株となった。しかし、太平洋戦争によりその後の研究は中断されていた。終戦後の日本脳炎に関する研究は、

神奈川県座間市にあった米軍406研究所がリードし、主たる媒介蚊がコガタアカイエカであること、ブタとゴイサギの感染が大量の感染蚊の発生に関連があるらしいことまでをつきとめていた。昭和33年米国ロックフェラー研究所での留学を終え帰国した大谷明博士は、国立予防衛生研究所にウイルス学者、昆虫学者、獣医学者を含む日本脳炎研究チームを結成し、日本脳炎患者発生の多かった群馬県を選び、群馬県衛生研究所の協力を得て研究の拠点とした。昭和34年（1959年）の夏季の夕暮れ時に家畜小屋周辺で採取した蚊から39株の日本脳炎ウイルスが分離された。そのうち38株はコガタアカイエカから分離され、日本脳炎ウイルスの主媒介蚊がコガタアカイエカであることが明らかになり、その吸血嗜好性、環境における免疫のない動物の個体数などから飼育ブタが強く疑われ、白暮の頃に無作為に採集した吸血メス蚊の血液の抗原分析からもブタが増幅動物であると判断されるにいたった。この頃から全国の地方衛生研究所が、日本脳炎研究チームの仕事に興味を示し、積極的な協力が得られることになった。東京都衛生研究所で芝浦のと畜場のブタの日本脳炎抗体保有調査をしたところ、初夏には日本脳炎未感染の個体が9割以上を占めていたが、夏季のある時点から突如として高率の抗体陽性（感染）が認められ、その時点から3週間後に患者発生のピークがみられた。この現象は日本各地で確認され、ブタ→カーヒトの日本脳炎ウイルスの自然生態環が明らかになった¹⁾。この知見をもとに、日本脳炎ウイルスの活動状況をモニターするために、感染症流行予測事業における日本脳炎感染源調査が1965年に開始され、現在まで毎年実施されている。その内容は夏季を中心に、各都道府県において、日本脳炎ウイルスの活動の指標として飼育ブタの赤血球凝集抑制（Hemagglutination Inhibition : HI）抗体保有率と2-Mercaptoethanol 感受性抗体（2-ME 感受性抗体；IgM抗体）の出現を追跡するものである。その調査によると、夏季には日本脳炎ウイルスに感染しウイルスを保有した蚊が発生し、多くのブタが感染しており、日本脳炎ウイルスは依然として関東以西の日本国内の自然界で活発に活動している。小西らは、2007年から2008年度に採血された熊本県住民の年間自然感染率を調査した結果、約2.6%という感染率を報告している²⁾。また、この50年以上にわたる膨大な調査結果は、地球温暖化の解析にも利用され、気温や降水量との相関に関して報告されている³⁾。

日本脳炎ワクチン開発

日本脳炎ワクチンが開発されたのは1954年である。1955年に実用化された当時のワクチンは、中山株をマ

ウス脳内に接種し、ウイルスが増殖しマウスに脳炎の症状が出現した時期に脳を採取し、5%脳乳剤の遠心上清を調製後、ホルマリンを加えて不活化したもので、接種により熱発や発赤腫脹が頻発した。その後改良を重ね1971年には総蛋白窒素量0.01mg/mL以下と精製度を高め、1976年には日本薬局方に収載された。1989年には日本脳炎野生株に対してより幅広く中和抗体を誘導する北京株（Beijing-1株）に変更された。マウス脳由来日本脳炎不活化ワクチンの製造技術は国際協力事業団（JICA）の協力によりタイ、インドへ、WHO西太平洋地域事務局によりベトナムに技術移転が行われ、その他台湾、韓国などにも技術移転され、これらの国々の日本脳炎の流行制御に大きく寄与した。

1990年代になってマウスを用いたワクチン製造は、動物愛護のためとマウスの確保の不安定性からの脱却のためにVero細胞を用いた製造法への変更が検討され始めた。Vero細胞が使用された理由は、1980年代にフランスで、Vero細胞を用いて不活化ポリオワクチンと狂犬病ワクチンが製造されていたこと、WHOのワクチン製造用細胞としてガイドラインで承認されていた⁴⁾ことによる。細胞培養日本脳炎ワクチンの実用化が成功したのは、日本脳炎ウイルスを増殖させやすいVero細胞を、マイクロキャリア（Cytodex）に付着させてタンク培養する技術が開発されたことである。Vero細胞は、1962年に安村美博博士により樹立された細胞で、インターフェロンを産生せず腫瘍原性も有しない株化細胞である^{5,6)}。その後、この細胞培養不活化日本脳炎ワクチンは2009年6月に使用が開始された。

日本脳炎ウイルスの流行遺伝子型の変遷

日本脳炎ウイルスは単一血清型であるが、遺伝子型ではⅠからⅤ型に分類される。現在東アジア、東南アジアでの主流株はⅠ型である。日本においても1990年以前の主流株はⅢ型であったが1990年代前半にⅠ型に置き換わった。この現象は遺伝子型シフト（genotype shift）と呼ばれ、時期に多少のずれはあったがアジアの主流株は遺伝子Ⅲ型からⅠ型にシフトした。しかし近年、遺伝子Ⅴ型ウイルスの検出がしばしば報告されている。Ⅴ型ウイルスは1952年にマレーシアで流行した⁷⁾後、検出されてこなかったが、2009年に中国⁸⁾で、2010年韓国で確認され⁹⁾、その後も韓国や中国でたびたび検出、分離されている。今後、Ⅴ型ウイルスによる遺伝子型シフトが発生しないかモニターする必要がある。

デング熱流行の歴史

デング熱は、18世紀から20世紀前半まで中東、東南

アジアや台湾においてしばしば流行が発生したが、世界的規模の流行はなかった。しかし、1980年代には南米、1990年代はブータン、ネパール、北米（ハワイ、フロリダ州）、ギリシャ、フランス、スペインおよび中国においても国内発生が報告された。現在では、世界各地の100ヶ国以上がデング熱の流行地域である。2000年以降、アフリカ大陸においても報告数が増加傾向にあり、渡航者の症例報告を含めて、大陸の13カ国以外、すべてのアフリカ諸国はデング熱の症例が確認された。日本においては、1942～1945年にかけて約20万人規模の国内流行が西日本で発生した太平洋戦争中は、南方戦線からの帰還兵や軍関係者などの輸入症例によって長崎、佐世保、福岡、広島、呉、神戸、大阪で流行が発生した¹⁰⁾。この流行のなかで1943年、長崎のデング熱患者からデングウイルスⅠ型（望月株）が堀田進博士らによって分離された¹¹⁾。これが世界で最初に分離されたデングウイルスである。1945年以降、約70年間は、デング熱の国内発生は報告されなかったが、2014年に東京を中心にデング熱の小流行が発生し、蚊媒介ウイルス感染症に対する関心が高まった。

デングワクチン開発

デングウイルスが単一血清型のウイルスであれば、デングウイルス望月株を製造用株として日本脳炎同様不活化ワクチンが作られたであろうが、デングウイルスは4種の血清型（DENV-1～DENV-4）があること、デング熱の流行地の経済状況を考えるとより安価な生ワクチンが望まれることから、デングワクチンの開発は弱毒生ワクチンの開発に向かった。デング熱の流行地は、複数の血清型が同時に流行することもあり、疫学的にデングウイルス再感染患者は、重症型デング熱の発症リスクが初感染者より比較的に高い。このことから、ワクチン接種によりすべての4種血液型ウイルスに対して感染防御免疫を誘導しなければならぬがDENVの4種血清型間の交差防御力は弱く、また、単価ワクチンでは感染増強の可能性が懸念されることが、デングワクチン開発にとって大きな困難をもたらしてきた。特にワクチンの有効性を評価するための正しい免疫学的指標を何にするかという問題と理想的なデングウイルス感染動物モデルがなかったことは大きな障害となった。

日本脳炎ワクチンの有効性評価の免疫学的指標として中和試験による中和抗体価10倍以上を指標¹⁰⁾として、予防接種政策を推進してきて現在のコントロール下にあるのであるが、4種の血清型があるデングウイルスに関しては、中和試験において交差反応が存在し、交差性中和抗体の感染防御能が弱いいため中和抗体価10倍を指標に

はできない。さらに、中和能のない抗体であっても血清型の異なる血清型のデングウイルスと抗原抗体複合物を形成するが、その抗原抗体複合物が感染性を有したまま抗体のレセプターであるFc γ レセプターを介して細胞に取り込まれ増殖するという抗体依存性感染増強(ADE)をきたす。この現象は一般に中和試験によく使われるFc γ レセプターを持たないVero細胞やBHK細胞による中和試験で反映することはできない。そこで我々の研究グループは、BHK細胞にFc γ II A遺伝子を組み込んだ細胞を作製した¹²⁾。この細胞を用いて中和試験を実施すると交差中和反応を除外できる¹³⁾こと、患者血液中の感染性のあるウイルス抗体複合体も検出できることにより、本来生体内に存在すると考えられるより多くの感染性ウイルス粒子を検出できることが明らかになった¹⁴⁾。また、抗体が出現する時期になると血液からのウイルス分離効率が下がることが多いが、Fc γ II A遺伝子搭載BHK細胞を用いることで分離率が向上し、ADE活性をもつ単クローン抗体を添加することで低ウイルス血症の血液からも分離できる場合がある¹⁵⁾。

デングウイルス感染動物モデル開発は、わが国でもウイルスが分離される以前の大正時代に、患者の血液をさまざまな動物に接種して同様の症状が発生しないかといった研究がなされていた¹⁶⁾。その後も、マウス、ラット、モルモット、ウサギ、イヌ、ヤギなどの哺乳類をはじめハトやトカゲにいたるまで試されたがいずれも明確な症状を呈することはなかった¹⁷⁾。デングウイルスに対して感受性のある動物は、インターフェロンノックアウトマウスやヒトIL-2R γ などを発現させた特殊なマウスを除けばサルのみである。遺伝子改変マウスは、自然な免疫を持っていない点でワクチンの有効性評価には適さない。サルのなかでもアカゲザル(rhesus macaque)やカニクイザル(cynomolgus macaque)などの旧世界ザルは、デングウイルス感染は成立するが発病することではなく、ウイルス血症も短期間で低い^{18,19)}。したがって、ワクチンや抗ウイルス剤の評価モデルとしては理想的であるとはいえない。我々の研究グループは、デングウイルス感染霊長類モデルとして、南米に生息する新世界ザルであるマーモセットを見出した。デングウイルス感染マーモセットはアカゲザルやカニクイザルと比べてはるかに高いウイルス血症が確認され、接種後2~7日以上持続した²⁰⁾。マーモセットは体重が300グラム程度と旧世界ザルと比べて小さく扱いやすいという利点もある。しかし、新世界ザルであるマーモセットの免疫学的背景は旧世界ザルと比較して不明な部分が多いため、Real-time PCRによるサイトカイン等の発現解析系、コモンマーモセットMHC解析系、コモンマーモセットTCRレパトア

解析系、個体識別系を確立した²¹⁾。また、以前に弱毒生ワクチン候補として臨床試験第Ⅱ相まで進んだ弱毒生ワクチン株を用いて、デングウイルスを感染させたマーモセットのウイルス学的、免疫学的動態を解析して、臨床試験のヒトにおけるデータと近似することも確認した²²⁾。デングワクチンとしては、黄熱ウイルスワクチン株とデングウイルスのキメラワクチンが世界20ヶ国で承認されているが、臨床試験の継続調査の結果、ワクチン接種者がデングウイルスに感染した場合の入院率が、被接種者群より高いという結果が出て、接種対象者が過去にデング熱に罹患した人を対象とすることになっている。デングワクチン開発はより安全で有効なものを求めて今後も継続しなければならない。Fc γ II A遺伝子搭載BHK細胞とマーモセットが候補ワクチンの有効性、安全性評価に活用されることを期待している。

おわりに

蚊が媒介するウイルスは、ヒトだけに感染する天然痘ウイルス、ポリオウイルス、麻疹ウイルスと違い地球上から排除することはまず不可能である。蚊媒介ウイルスは蚊においても増殖するし、日本脳炎ウイルスではブタが増殖動物であり、デングウイルスにもある種の霊長類との間の感染環が存在する。したがってウイルスそのものを地球上から駆逐することはできない。日本脳炎に関してはワクチン接種プログラムの継続、デングウイルスに関しては有効なワクチンの実用化と効果的な媒介蚊対策の継続の両方が必要である。

謝辞

文中の「我々の研究グループ」とは、国立感染症研究所ウイルス第一部第2室を中心とした研究チームである。マーモセットの感染実験や免疫機構の解析にご協力いただいた皆様、Fc γ II A cDNAを提供していただいたロックフェラー大学Dr. Jeffrey V. に深謝します。本稿の内容の一部には厚生労働科学研究H23-shinkou-ippan-010、AMED感染症実用化研究事業 新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業(JP16fk0108307)によって実施された成果が含まれる。

文献

- 1) 大谷明. ウイルス学エピソード. 第一メディカル株式会社 p44-51 (株) 誠文堂 (2007)
- 2) Konishi E, Kitai Y, Tabei Y, Nishimura K, Harada S.: Natural Japanese encephalitis virus infection among humans in west and east Japan shows the need to continue a vaccination

- program. Vaccine, 28, 2664-2670 (2010)
- 3) Ichiro Kurane, Ken-ichi Shibasaki, Akira Kotaki, Yasuaki Hijioka, Tomohiko Takasaki.: The Effect of Precipitation on the Transmission of Japanese Encephalitis (JE) Virus in Nature: A Complex Effect on Antibody-Positive Rate to JE Virus in Sentinel Pigs. Int. J. Environ. Res. Public Health, 10, 1831-1844 (2013)
 - 4) WHO.: WHO Requirements for continuous cell lines used for biological's production, WHO Technical Report Series (TRS) no. 745, http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_745.pdf (1987)
 - 5) Desmyter J, Melnick JL, Rawls WE.: Defectiveness of Interferon Production and of Rubella Virus Interference in a Line of African Green Monkey Kidney Cells (Vero). J of Virology, 2, 955-961 (1968)
 - 6) Levenbook IS, Petricciani JC, Elisberg BL.: Tumorigenicity of Vero cells. J of Biol. Stand., 12:391-398 (1984)
 - 7) Mohammed MA, Galbraith SE, Radford AD, Dove W, Takasaki T, Kurane I et al.: Molecular phylogenetic and evolutionary analyses of Muar strain of Japanese encephalitis virus reveal it is the missing fifth genotype. Infect Genet Evol., 11(5),855-862 (2011)
 - 8) Li, M. H., Fu, S. H., Chen, W. X., Wang, H. Y., Guo, Y. H., Liu, Q. Y. et al.: Genotype v Japanese encephalitis virus is emerging. PLoS Negl Trop Dis, 5, e1231 (2011)
 - 9) Kim, H., Cha, G. W., Jeong, Y. E., Lee, W. G., Chang, K. S., Roh, J. Y., et al.: Detection of Japanese encephalitis virus genotype V in *Culex orientalis* and *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) in Korea. PLoS One 10, e0116547. (2015)
 - 10) Susumu Hotta.: Dengue epidemics in Japan, 1942-1945. J. Trop. Med. Hygiene, 56,83 (1953)
 - 11) 堀田進：デングウイルス研究60年の回顧. ウィルス 51,105-107 (2001)
 - 12) Meng Ling Moi, Lim CK, Takasaki T, Kurane I.: Involvement of the Fc γ receptor IIA cytoplasmic domain in antibody enhancement of dengue virus infection. J Gen Virol. 91, 103-111 (2010)
 - 13) Moi ML, Lim CK, Kotaki A, Takasaki T, Kurane I.: Discrepancy in Neutralizing Antibody Titers between Plaque Reduction Neutralizing Tests Using Fc[gamma]R-negative and Fc[gamma]R-expressing BHK-21 cells. Clin Vaccine Immunol. 17, 402-407 (2010)
 - 14) Meng Ling Moi, Chang-Kweng Lim, Akira Kotaki, Tomohiko Takasaki, Ichiro Kurane: Detection of Higher Levels of Dengue Viremia Using Fc γ R - expressing BHK-21 Cells than Fc γ R - negative Cells in Secondary Infection but Not in Primary Infection. The Journal of Infectious Diseases. 203, 1405-1414 (2011)
 - 15) Moi ML, Lim CK, Tajima S, Kotaki A, Takasaki T, Kurane I.: Dengue virus isolation relying on antibody-dependent enhancement mechanism using Fc γ R-expressing BHK cells and a monoclonal antibody with infection-enhancing capacity. J Clin Virol. 52(3):225-230.2011
 - 16) 小泉 丹, 山口謹爾, 殿村京造. 「デング」熱ノ研究. 學説及實驗. 大正五年巻 432-463 (1916)
 - 17) Tenji Taniguchi, Tunesaburo Fujino, Yoshimori Okuno, et al.: Studies on the experimental inoculation of dengue fever. Medical Journal of Osaka Univ. 2,1-36 (1951)
 - 18) Marchette, N. J., Halstead, S. B., Jr. Falkler W. A., Stenhouse A. & Nash D. (1973). Studies on the pathogenesis of dengue infection in monkeys. III. Sequential distribution of virus in primary and heterologous infections. J Infect Dis 128, 23-30.
 - 19) Ito, M., Mukai, R. Z., Takasaki T., Kotaki A. & Kurane I: Antibody-dependent enhancement of dengue virus infection in vitro by undiluted sera from monkeys infected with heterotypic dengue virus. Arch Virol. 155, 1617-1624 (2010)
 - 20) Omatsu T, Moi ML, Hirayama T, Takasaki T, Nakamura S, Tajima S, et al.: Common marmoset (*Callithrix jacchus*) as a primate model of dengue virus infection: development of high levels of viraemia and demonstration of protective immunity. J Gen Virology. 92, 2272-2280 (2011)
 - 21) Kitaura K, Fujii Y, Matsutani T, Shirai K, Suzuki S, Takasaki T, et al.: A new method for quantitative analysis of the T cell receptor V

region repertoires in healthy common marmosets by microplate hybridization assay. J Immunol Methods. 352, 287-300 (2012)

- 22) Moi ML, Ami Y, Muhammad Azami NA, Shirai K, Yoksan S, Takasaki T, et al.: Marmosets (*Callithrix jacchus*) as a non-human primate model for evaluation of candidate dengue vaccines: induction and maintenance of specific protective immunity against challenges with clinical isolates. J Gen Virol., 98, 2955-2967 (2017)

Mosquito-borne viral diseases —Japanese encephalitis and dengue fever—

Tomohiko TAKASAKI

Japanese encephalitis virus (JEV) and dengue virus (DENV) were isolated firstly in Japan. Japanese scientists have contributed to the study and vaccine development for both viruses. The history and research on JE were summarized, and our research results on dengue were introduced in the summary. The life cycle of JEV between pigs and mosquitoes (*Culex tritaeniorhynchus*) was elucidated in 1960 by Japanese research team. The team consisted of Japanese national institute of health and some prefectural public health institutes. On dengue the general understanding on the biological properties of antibody in protection against DENV infection is based on neutralizing antibody levels determined by Fc γ R-negative cells using conventional plaque reduction neutralizing test (PRNT). In the absence of Fc γ R, conventional PRNT do not consider infection-enhancement activity, and the potential of these infection-enhancement activity that may hamper neutralizing activity. For examples the conventional PRNT could not detect infective DENV-antibody complexes, meanwhile PRNT using Fc γ R-expressing BHK cells which can detect infective DENV-antibody complexes exclude the heterologous neutralizing antibodies. On the other hand, one of the major obstacles to dengue vaccine development is the animal model to evaluate efficacies and safeties. We found that marmosets are good non-human primate (NPH) models. The marmosets infected with dengue viruses showed enough viremia to evaluate the efficacy of dengue vaccines.

総説

未治療HIV感染者における薬剤耐性株の動向

近藤真規子

Surveillance of Drug-resistant HIV in patients newly diagnosed with HIV/AIDS in Japan

Makiko KONDO

Key Words : HIV, drug-resistance, mutation,
combination antiretroviral therapy,
Transmitted drug resistance HIV

はじめに

HIV感染者の治療は多剤併用療法 (combination antiretroviral therapy: cART) の普及により飛躍的に進歩し、HIV感染者の病態の進行をコントロールすることが可能となった。その一方で、薬剤の長期投与に伴い薬剤耐性HIV株を保有する感染者が増加し、新規感染者が薬剤耐性株に感染している症例も見つかってきている。新規HIV診断症例における薬剤耐性ウイルスの疫学的調査研究は欧米各国で行われているが、その頻度は地域や集団により異なり、数%から24%と広い分布を示している¹⁾。日本では「HIV薬剤耐性研究班」が2003年に立ち上がり、新規診断症例における薬剤耐性症例の全国調査が実施されている。検出される薬剤耐性変異には年ごとに増減はあるものの徐々に増加し、現在では新規感染症例の10%前後に何らかの耐性変異が観察されている^{2,3,4)}。神奈川県衛生研究所では2004年より本調査に参加し、首都圏を中心とする未治療のHIV感染者について薬剤耐性検査を実施し、国内におけるHIV耐性変異株の実態把握に貢献している。本稿では薬剤耐性検査の変遷とともに当所でこれまで実施してきた調査結果を合わせて紹介する。

薬剤耐性検査の必要性

HIVは感染者体内で活発に増殖し、その産生量は1日当たり $10^9 \sim 10^{10}$ に達するが⁵⁾、逆転写の精度が低いため、複製エラーが高い頻度 ($10^{-4} \sim 10^{-5}$) で起こる⁶⁾。そのため、未治療下においても何らかの変異を有するウイルスが日々生まれ、この中には薬剤耐性変異を持つクローンも潜在しており、ARTsを行うことにより耐性クローンが選択されて顕在化すると考えられている。

HIVの治療には、次の4つの作用機序に働く抗HIV薬が実用化されている (図1, 表1)。

①HIV粒子と宿主細胞表面に発現しているケモカインレセプターCCR5との結合を阻害する。

②ウイルスRNAからDNAに逆転写する逆転写酵素を阻害する。

③HIV・DNAを宿主細胞DNAに組み込むインテグラーゼを阻害する。

④プロテアーゼによるウイルス蛋白の切断・成形を阻害する。

薬剤耐性検査は主に血液中に存在するHIVの薬剤感受性を推測する検査であり、genotype (遺伝子型) 検査と phenotype (表現型) 検査の2つの方法がある。現状では genotype 検査が主流であり、本法は患者血液中のHIV粒子から直接HIV・RNAを抽出し、ウイルス遺伝子のターゲット領域をRT-PCR法で増幅後、ダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定し、各種データベースや評価アルゴリズムを用いて、アミノ酸の変異パターンから各種薬剤に対する耐性の度合いを評価する方法である。抗HIV薬剤に関連する薬剤耐性変異リストが International Society USA⁷⁾より報告されており、ほぼ毎年更新されている。また、耐性レベルの評価については、いくつかのアルゴリズムがインターネット上で一般に公開¹⁾されており、当所ではスタンフォード大学HIV薬剤耐性データベース⁸⁾を用いて評価を行っている。

phenotype 検査は感染者から分離されたHIVを薬剤存在下で培養し、増殖能力を解析する方法である。本法はHIV分離株を用いるためバイオセーフティレベル3 (BSL3) としての取り扱いが必要であり、かつ操作法が煩雑、検査に時間がかかる、コストが高い等の理由から、限られた研究機関で行われているに過ぎない。

薬剤耐性変異の有無が治療効果に影響及ぼすことから、薬剤耐性検査は治療開始時^{9,10,11)}、薬剤耐性HIVの出現が疑われる時、十分な治療効果が得られない時等に実施が推奨されている¹⁾。その一方で、新規HIV感染者から薬剤耐性変異株も見つかってきており、新規感染者における耐性株の蔓延状況を調査し、実態を把握することが重要となっている。

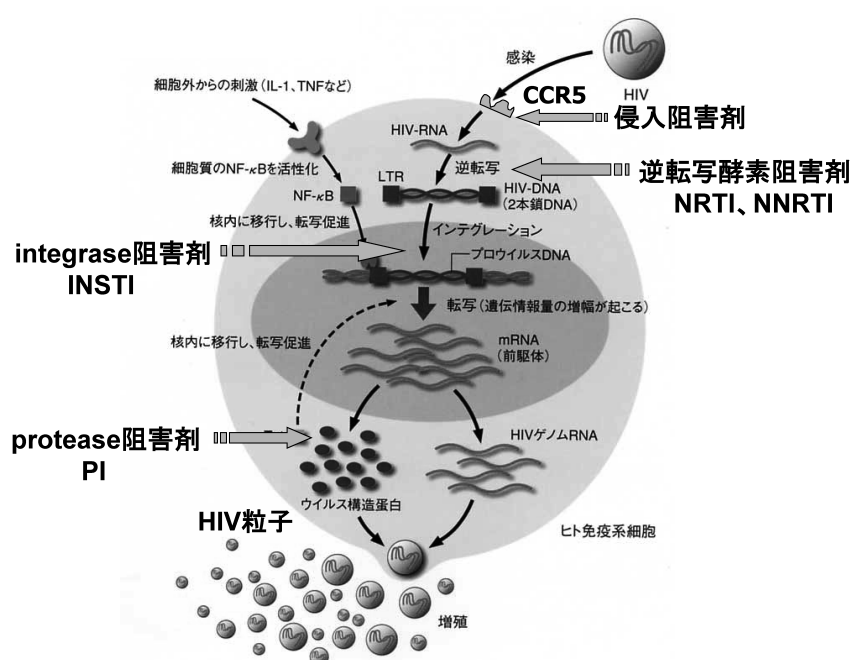


図1 HIVのライフサイクルと薬剤作用機序

表1 日本で承認されている抗HIV薬（2018年3月現在）

	薬剤名	承認時期
核酸系 逆転写酵素阻害剤 (NRTI)	AZT	1987年
	ddI	1992年
	3TC	1997年
	d4T	1997年
	AZT/3TC合剤	1999年
	ABC	1999年
	TDF	2004年
	ABC/3TC合剤	2005年
	FTC	2005年
非核酸系 逆転写酵素阻害剤 (NNRTI)	TDF/FTC合剤	2005年
	TAF/FTC合剤	2016年
	NVP	1998年
	EFV	1999年
	ETR	2009年
プロテアーゼ 阻害剤 (PI)	RPV	2012年
	RPV/TDF/FTC合剤	2014年
	IDV	1997年
	SQV	1997年
	NFV	1998年
	RTV	1999年
	LPV	2000年
	ATV	2004年
インテグラーゼ 阻害剤 (INSTI)	FPV	2005年
	DRV	2013年
	DRVc合剤	2016年
	RAL	2008年
	EVG/TDF/FTC合剤	2013年
侵入阻止剤	DTG	2014年
	DTG/ABC/3TC合剤	2015年
	EVG/TAF/FTC合剤	2016年
	MVC	2009年

抗HIV治療ガイドライン2018年3月版より改変

薬剤開発と薬剤耐性との闘い

HIV/AIDSの治療薬として1986年に始めて核酸系逆転写酵素阻害剤 (nucleoside reverse transcriptase inhibitor: NRTI) として azidothymidine (AZT) が開発された¹²⁾。それまでHIV/AIDSが致死的病であった時代にAZTの開発は、感染者や医療関係者に希望を与えた。しかし、AZT治療中の症例から耐性ウイルスが検出され、耐性には逆転写酵素の215番アミノ酸がスレオニン (T) からチロシン (Y)、あるいはフェニールアラニン (F) への変異 (T215Y/F) が関与していることが報告された¹³⁾。続いて同じNRTIに属する薬剤ddI, ddC, 3TC, ABC等が開発されたが、AZT耐性を獲得した症例においては交差耐性が見られた。その後NVP, EFV等の非核酸系逆転写阻害剤 (non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor: NNRTI) も複数開発されたが、薬剤効果は限定的であった。

1995年にはRTIとは作用機序が異なるプロテアーゼ阻害剤 (protease inhibitor: PI) が登場した。PIも単剤使用ではRTIと同様に比較的早期に薬剤耐性を獲得¹⁴⁾したが、PI, NRTI及びNNRTIのcART導入により効果的な治療を行うことが可能となった¹⁵⁾。しかし、過去の治療失敗例については効果が十分ではなく、新しい薬剤の開発が待ち望まれていた。

2007年にはインテグラーゼ阻害剤 (integrase strand transfer inhibitor: INSTI) の raltegravir (RAL) が実用化された¹⁶⁾。RALを含むcARTの導入により病態の進

表2 新規HIV感染者における伝播性薬剤耐性変異 (Transmitted drug resistance : TDR) の動向

診断年	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017
症例数	32	31	56	47	69	74	80	87	97	92	98	40	65	57
耐性変異	2	1	3	3	4	4	6	5	6	10	9	4	8	9
検出率(%)	6.3	3.2	5.4	6.4	5.8	5.4	7.5	5.7	6.2	10.9	9.2	10.0	12.3	15.8
NRTI	6.3	3.2	3.6	4.2	1.5	1.4	2.5	2.3	4.1	5.4	8.2	7.5	7.7	7.0
T215X	3.1	3.2	3.6	2.1	1.5	1.4	2.5	2.3	3.1	3.3	7.1	5.0	7.7	7.0
other	3.1		(1.8)	2.1			1.3	1.1	1		1.1			
NNRTI	0	0	0	0	1.5	1.4	2.5	2.3	0	4.3	1.1	0	(3.0)	5.3
K103N					1.5	1.4	1.3	0		3.3	1.1		(1.5)	3.5
other							1.3	2.3		1			1.5	1.8
PI	0	0	1.8	2.1	3.0	2.7	1.3	0	2.1	1.1	0	2.5	(3.0)	3.5
M46I/L			1.8	2.1	0	2.7	1.3		2.1	1.1		2.5	(1.5)	3.5
D30N					3.0								1.5	
INSTI	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

()内は重複検出

行を抑えることが可能となり、特に過去に治療経験が無い症例については劇的な治療効果を示し、治癒の可能性も期待されたが、残念ながら導入から20年以上経過した今日もcARTによって体内からHIVを完全に排除した症例は報告されていない。

RAL耐性にはY143R/H/C, Q148H/K/R, N155Hの3つの異なる薬剤耐性獲得経路⁷⁾が知られているが、RALを含むcARTにおいて耐性獲得頻度は著しく少ないことが報告されている¹⁷⁾。その後 INSTIとして EVG, DTG, BIC 等が開発されている。

薬剤の開発が進み、効果的なcARTが積極的に進められてきた日本では、治療に失敗する症例は減少し、病態の進行をコントロールできるようになってきた。日本の2014年の調査ではINSTIを含むcARTを受けている患者での薬剤耐性獲得率は1.1%と報告されている^{18,19)}。また、欧米での大規模コホート研究によれば、2008年から2010年にcARTを開始した群での平均寿命は一般と変わらないまでになっている²⁰⁾。

薬剤開発の進歩は目覚ましく、新しい薬剤の他にも複数の薬剤を組み合わせた配合剤も承認されてきており、治療の選択肢が増えてきた。治療に用いる抗HIV薬の選択、組み合わせについては「抗HIV治療ガイドライン」²¹⁾が発行されており、毎年更新されている。

このようにcARTが成功し薬剤耐性が収束する一方、未治療の新規感染者から検出される薬剤耐性HIV (伝播性薬剤耐性ウイルス, Transmitted drug resistance: TDR) が減少していないことが、HIV薬剤耐性研究班の調査において明らかになってきた。

Transmitted drug resistance (TDR) の動向

当所では2004年から2017年の14年間に主として神奈川県および東京都内の医療機関を受診した未治療の新規

HIV感染者925症例の調査を実施し、74例 (8.0%) からTDRを検出した。TDR検出率の推移を図2に、耐性変異種類別検出率を表2に示した。TDRは調査開始時の2004年には6.3%で、2009年までは多少の増減はあるもののほぼ横ばい状況であった。しかし、2010年 (7.5%) から上昇傾向を示し、2013年には10%を超え、2016年には12.3%、2017年には15.8%まで増加した。全国調査²²⁾においても2003年の5.8%から徐々に増加し2008年から2015年までは9%前後で推移し、2016年には10.2%、2017年13.2%と上昇し、当所の結果に比べ若干低いもののほぼ同様の傾向を示している。

TDRの種類ではNRTI, NNRTI, PIの耐性変異がそれぞれ44例、16例、15例から検出された (内1例はNNRTIとPIの耐性変異同時検出)。個別の耐性変異で最も多かったのは、NRTIのAZT耐性変異である逆転写酵素の215番アミノ酸変異Y/Fのリバースタント変異 (T215X: D/E/S/C/L等) であり、35例 (47.3%) に検出された。215Y/FはAZT投与を中止するとさらに変異が生じ、D/E/S/C/L等のアミノ酸に変異しAZTに対する感受性を回復することが報告されている²³⁾。T215Xの検出率の推移を見てみると、2013年までは3%程度で比較的低かったが、2014年以降7%を超えている。全国調査においてT215Xの検出率は2015年までは4~5%程度で推移していたが、2016年以降増加傾向が見られている。

PIであるNFVの耐性変異M46I/Lが12例 (16.2%)、NNRTIであるEFV, NVPの耐性変異K103Nが10例 (13.5%) に検出された。これらの変異は全国調査でも毎年のように検出されている。AZT, NVPやNFVは1990年代から2000年代初期によく使用されていたが、現在ではほとんど使用されていない。にもかかわらず、毎年のように検出されているということはつまり、これら

変異を持つHIVが流行株として定着し伝播していることを裏付けている。特に2016年からTDRが増加傾向にあることは注目に値し、引き続き調査する必要があると考えられる。

この他、NRTIの3TC、FTCの耐性変異M184Vが2例確認された。3TCはB型肝炎の治療薬としても使用されており、M184Vが検出された際には、HIVとHBV両方の治療を考慮して薬剤を選択する必要がある。INSTIについては2008年6月に国内での使用が承認され、2012年以降耐性動向調査が開始された。当所においてINSTIに対する耐性変異は検出されず、全国調査でも3例検出されているに過ぎない²⁴⁾。

また、TDRの検出された新規感染者の属性のほとんどが日本人男性、MSM（男性同性愛）で、遺伝子型はサブタイプBであった。

おわりに

我が国において未治療の新規HIV感染者に対する薬剤耐性HIVの動向調査する研究が始まってから14年が経過した。この間、抗HIV薬の進歩は著しく、適切なcARTが行われれば失敗することはほとんどなくなった。新規感染者から検出されるTDRのほとんどが過去に使用されていた薬剤に対する耐性変異であり、しかもTDRの検出率は2016年以降上昇傾向にある。このことはTDRの供給源はcARTを受けている感染者ではなく、他のリスク集団に定着している流行株であることを示唆している。

また、HIV薬剤耐性研究班では新規感染者から得られたpol領域の塩基配列について系統樹解析を行っているが、TDRの変異ごとにクラスターが形成され、これらクラスターには地域特異性があることが見いだされている²²⁾。特定のリスク集団が地域ごとに薬剤耐性HIVを維持し、流行の一端を担っているとも考えられ、今後も引き続きTDRの動向を調査・分析するとともに感染者への教育と啓蒙を粘り強く行う必要がある。

日本のTDRの動向は、高所得諸国に共通しているが、低・中所得国では耐性を獲得しやすい抗HIV薬が第一選択薬剤として使用され、薬剤耐性ウイルスが高頻度で検出されている。海外からのTDRの持ち込みにも注意を払い、耐性ウイルスの蔓延を防ぐ必要がある。

また、薬剤耐性の変異リストや評価アルゴリズムのほとんどは欧米や日本での主流流行株であるサブタイプBを主に作成されており、サブタイプの違いが評価の結果に影響することが指摘されている²⁵⁾。日本ではサブタイプBに次いでCRF01_AEが多いこと、低・中所得国ではサブタイプB以外が主流流行株であることが多く、特に日本

周辺諸国のアジア地域においてはCRF01_AEが多いことから、CRF01_AEの評価方法について取り組んでいく必要がある。

謝辞

本研究（HIV薬剤耐性に関する研究）は、厚生労働省科学研究エイズ対策事業として2003年から始まり、2015年からは日本医療研究開発機構により引き継がれ、現在は「国内流行HIV及びその薬剤耐性株の長期的動向把握に関する研究」として実施されています。この間研究代表者を務められました杉浦互先生、吉村和久先生及び研究分担（協力）者の先生方に深謝いたします。また、当所での研究にご協力いただきました横浜市立市民病院感染症科の立川夏夫先生、吉村幸浩先生、しらかば診療所の井戸田一朗先生に深謝いたします。

参考文献

- 1) 吉村和久. HIV薬剤耐性検査ガイドライン ver.10 (2017年2月)
<https://www.hiv-resistance.jp/resistance04.htm>
- 2) Gatanaga H, Ibe S, Matsuda M, Yoshida S, Asagi T, Kondo M, et al. Drug-resistant HIV Prevalence in patients newly diagnosed with HIV/AIDS in Japan. *Antiviral Res.* 75,75-82(2007)
- 3) Hattori J, Shiino T, Gatanaga H, Watanabe D, Minami R, Kondo M, et al. Trends in transmitted drug-resistant HIV and demographic characteristics of newly diagnosed patients: nationwide surveillance from 2003 to 2008 in Japan. *Antiviral Res.* 88,72-79(2010)
- 4) Hattori J, Shiino T, Gatanaga H, Mori H, Uchida K, Kondo M, et al. Characteristics of transmitted Drug-resistant HIV in recently infected treatment-naïve patients in Japan. *J. Acquir Immune Defic Syndr.* 71,367-373(2016)
- 5) Perlson AS, Neumann AU, Marcowitz M, Leonald JM, and Ho DD. HIV dynamics *in vivo*: virion clearance rate, infected cell line-span, and viral generation time. *Science.* 271,1582-1586(1996)
- 6) Mansky LM. Retroviral mutation rates and their role in genetic variation. *J Gen Virol.* 79,1337-1345(1998)
- 7) International antiviral society USA,
<https://www.iasusa.org/content/drug-resistance->

- mutations-in-HIV
- 8) Stanford university HIV drug resistance data base, <https://hivdb.stanford.edu/>
 - 9) Kuritzkes DR, Lalama CM, Ribaudo HJ, Marcial M, Meyer WA 3rd, Shikuma C, et al. Preexisting resistance to nonnucleoside reverse-transcriptase inhibitors predicts virologic failure of an efavirenz-based regimen in treatment-naive HIV-infected subjects. *J Infect Dis.* 197;867-870 (2008)
 - 10) Pillay D, Bhaskaran K, Jurriaans S, Prins M, Masquelier B, Dabis F, et al. The impact of transmitted drug resistance on the natural history of HIV infection and response to first-line therapy. *AIDS.* 20, 21-28 (2006)
 - 11) Sax PE, Islam R, Walensky RP, Losina E, Weinstein MC, Goldie SJ, et al. Should resistance testing be performed for treatment-naive HIV-infected patients? A cost-effectiveness analysis. *Clin Infect Dis.* 41,1316-23 (2005)
 - 12) Mitsuya H, Weinhold KJ, Furman PA, St Clair MH, Lehrman SN, Gallo RC, et al. 3'-Azido-3'-deoxythymidine (BW A509U): an antiviral agent that inhibits the infectivity and cytopathic effect of human T-lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA.* 82,7096-7100(1985)
 - 13) Larder BA, Kemp SD. Multiple mutations in HIV reverse transcriptase confer high-level resistance to zidovudine (AZT). *Science.* 246(4934),1155-1158(1989)
 - 14) Condra JH1, Schleif WA, Blahy OM, Gabryelski LJ, Graham DJ, Quintero JC, et al. In vivo emergence of HIV-1 variants resistant to multiple protease inhibitors. *Nature.* 74(6522),569-571 (1995)
 - 15) Perelson AS, Essunger P, Cao Y, Vesanen M, Hurley A, Saksela K, et al. Decay characteristics of HIV-infected compartments during combination therapy. *Nature.* 387(6629),188-91(1997)
 - 16) Markowitz M1, Morales-Ramirez JO, Nguyen BY, Kovacs CM, Steigbigel RT, Cooper DA, et al. Antiretroviral activity, pharmacokinetics, and tolerability of MK-0518, a novel inhibitor of HIV integrase, dosed as monotherapy for 10 days in treatment-naive HIV-infected individuals. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 43, 509-515(2006)
 - 17) 杉浦 互, 横幕能行, 我が国におけるインテグラーゼ阻害剤耐性の動向, *IASR,* 35, 211-212 (2014)
 - 18) 宮崎菜穂子, 松下修三, 藤井毅, 岩本愛吉, 杉浦 互. 多剤耐性症例治療を目的とした新規抗HIV薬使用症例に対する緊急調査. 第23回日本エイズ学会・総会2009
 - 19) 宮崎菜穂子, 杉浦 互. 我が国における抗HIV治療と多剤耐性症例の現状. *IASR,* 31,233-234 (2010)
 - 20) Antiretroviral Therapy Cohort Collaboration. Survival of HIV-positive patients starting antiretroviral therapy between 1996 and 2013: a collaborative analysis of cohort studies. *Lancet HIV,*4. e349-e356 (2017)
 - 21) 鯉淵智彦, 白坂琢磨. 抗HIV治療ガイドライン2018年3月 (2018)
<https://www.haart-support.jp/guideline.htm>
 - 22) 杉浦 互, 日本における薬剤耐性HIVの動向Update. *IASR.* 36,171-173 (2015)
 - 23) Violin M, Cozzi-Lepri A, Velleca R, Vincenti A, D'Elia S, Chiodo F, et al. Risk of failure in patients with 215 HIV revertants starting their first thymidine analog- containing highly active antiretroviral therapy. *AIDS.*18,227-35(2004)
 - 24) 蜂谷敦子, 日本における薬剤耐性HIVの動向Update. *IASR.* 38,181-182 (2017)
 - 25) Snoeck J, Kantor R, Shafer RW, Van Laethem K, Deforche K, Carvalho AP, et al. Discordances between interpretation algorithms for genotypic resistance to protease and reverse transcriptase inhibitors of human immunodeficiency virus are subtype dependent. *Antimicrob Agents Chemother.* 50, 694-701(2006)

Surveillance of Drug-resistant HIV in
patients newly diagnosed with
HIV/AIDS in Japan

Makiko KONDO

A survey of transmitted drug resistance mutations in newly HIV-infected patient was conducted between 2003 and 2017 in Japan. In this review, we introduce the results and findings obtained on the resistance mutations against reverse transcriptase inhibitor, protease inhibitor and integrase strand transfer inhibitor in this 14-year study.

短報

肺炎マイコプラズマの検出状況および 薬剤耐性菌出現状況の解析 (2013～2016年度)

大屋日登美, 古川一郎, 中嶋直樹,
三谷詠里子, 鈴木美雪, 黒木俊郎*

The epidemiological characteristics and drug resistance of *Mycoplasma pneumoniae* (April 2013- March 2016)

Hitomi OHYA, Ichiro FURUKAWA,
Naoki NAKAJIMA, Eriko MITANI,
Miyuki SUZUKI, and Toshiro KUROKI

はじめに

肺炎マイコプラズマ (*Mycoplasma pneumoniae*) 感染症は非定型肺炎などの呼吸器感染症で, 小児の感染症においては重要な位置を占めている. かつてこの感染症の流行は4年周期で繰り返され, オリンピック開催年と重なっていたために五輪病とも呼ばれていたが, 1990年代からこの周期が崩れてきた. 本症は小児に多く, 軽症例が多いことからウォーキングニューモニアともよばれているが, 成人や高齢者の感染事例や脳炎や脊髄炎などの重症例も報告されるようになってきた^{1,2)}. 本疾病は, 感染症法において五類感染症に指定されており, 厚生労働省がとりまとめる感染症発生動向調査の定点把握疾患として全国の定点医療機関からの報告により患者の発生状況が把握されている.

病原菌である肺炎マイコプラズマの検査は, 遺伝子検査も可能であるが, 培養に2週間程度を要するなど菌分離が困難であり, 国内外における病原体検出状況の報告は少ないのが現状である. 神奈川県では, 1976年から肺炎マイコプラズマの分離培養による検査を継続して実施している.

マイコプラズマ肺炎治療に用いられる抗菌薬は, マク

ロライド系 (MLs), テトラサイクリン系 (TCs) 及びニューキノロン系 (FQs) 薬剤がある. 第一選択薬剤としては一般的にMLsが用いられる. しかし, 国内の患者でMLs耐性肺炎マイコプラズマ (*macrolide-resistant Mycoplasma pneumoniae*, 以下, MRMPとする) が増加してきたことに伴い^{3,4)}, 成人においては, FQs薬剤が治療に使用されるようになってきた⁵⁾. 一方, 小児領域においては使用可能なFQsの種類は限られていることから, FQs耐性肺炎マイコプラズマが出現した場合, 小児領域への影響が懸念される.

そこで, 薬剤耐性菌の蔓延状況を調べるため, 肺炎マイコプラズマ検出状況に加え, 耐性菌出現状況の解析を行ったので報告する.

対象と方法

2013～2016年度に神奈川県内定点等の医療機関で採取した咽頭ぬぐい液200検体について遺伝子検査 (PCR)⁶⁾ と分離培養によって肺炎マイコプラズマの検出を試みた.

分離された肺炎マイコプラズマの薬剤耐性菌出現状況を調べるために, 薬剤感受性試験を実施した. 使用薬剤は, 12薬剤で内訳はMLs 5薬剤で14員環2薬剤: エリスロマイシン (EM), クロリスロマイシン (CAM), 15員環1薬剤: アジスロマイシン (AZM), 16員環2薬剤: ジョサマイシン (JM), ロキタマシリン (RKM), TCs 2薬剤: テトラサイクリン (TC), ミノサイクリン (MINO), FQs 5薬剤: レボフロキサシン (LVFX), シプロフロキサシン (CPFX), トスフロキサシン (TFLX), スパルフロキサシン (SPFX), ガチフロキサシン (GFLX) とした. 薬剤感受性試験には, 微量液体希釈法を用い, 最少発育阻止濃度 (MIC: Minimum inhibitory concentration) を調べた. 各薬剤の供試菌株は, 2013～2016年度の臨床分離株115株のうちMLsとTCsで106株, FQsで91株とした. また, 薬剤感受性試験のコントロールとして今回供試した薬剤に感受性がある標準株3株 (M129, FH, Mac) を用いた.

MRMPは, 23S rRNA遺伝子ドメインV領域の点変異により発現し⁷⁾, その中でも2063番目のアデニン (A) がグアニン (G) に変異した株 (A2063G) が臨床から最も多く分離されている. 他には, Aがチミン (T), シトシン (C) に変異したA2063T/Cや2064番目に変異したA2064G, 2617番目に変異したC2617Gも報告されている^{3,4)}. 今回, Matsuoka ら³⁾ の方法によるPCR-RFLP法を用いて遺伝子変異の解析を行った. 確認できなかったMRMPについては, ダイレクトシーケンスで塩基配列を確認した.

さらに, 今回得られた2013～2016年度のデータを

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 岡山理科大学 獣医学部

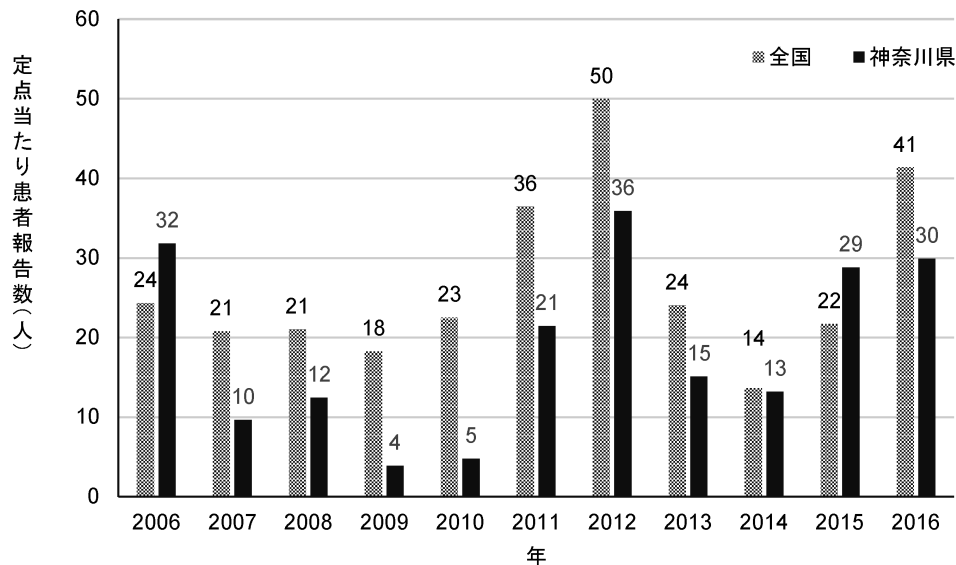


図1 マイコプラズマ肺炎患者の累積定点当たり報告数

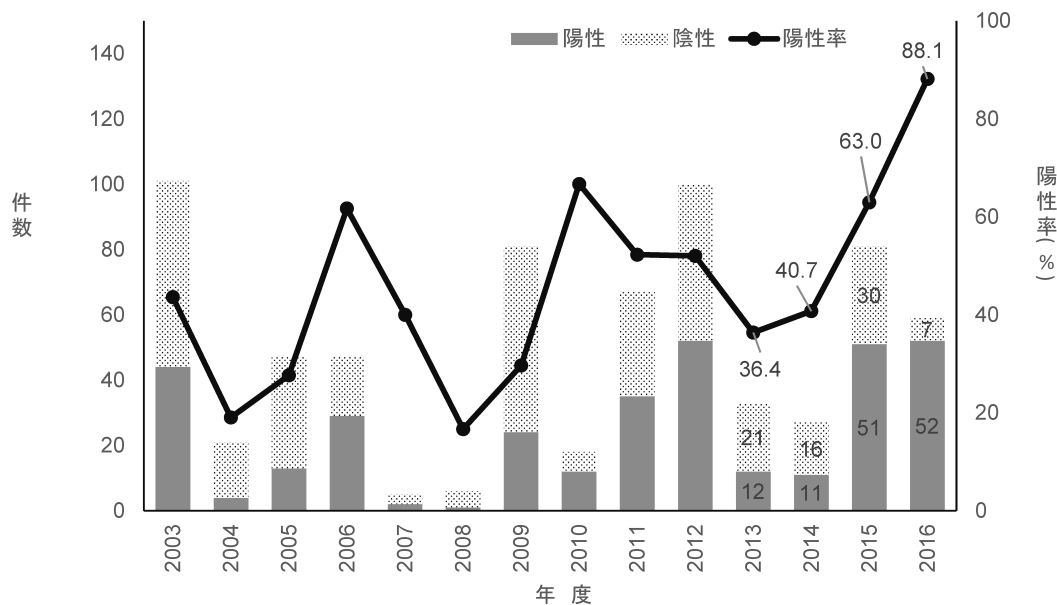


図2 肺炎マイコプラズマの検出状況（2003～2016年度）

2003～2012年度の当所検出データ⁸⁾と比較した。

結果及び考察

1. 肺炎マイコプラズマの検出状況

神奈川県感染症情報センターのマイコプラズマ肺炎患者の累積定点当たりの報告によると、2006年、2011～2012年、2015～2016年に患者数が増加しており、全国の状況と同様の傾向であった（図1）。

肺炎マイコプラズマの検出状況を図2に示した。2013～2016年度には、200検体中126検体（陽性率63.0%）から肺炎マイコプラズマが検出された。2003～2012年度の検出状況⁸⁾と比較すると2013～2014年度は、

検査件数、陽性率ともに減少したが、2015年度以降は再び増加し、特に2016年の陽性率が高く88.1%であった。

2. 薬剤耐性菌出現状況

薬剤感受性試験によるMRMPの検出状況を図3に示す。2013～2014年度は検体数、分離株数ともに少なく流行規模も小さかったが耐性率は52.6%と高く、流行期の2015～2016年度の耐性率とほとんど変わらなかった。神奈川県域におけるMRMPは、調査を始めた2003年度ごろから増加傾向にあり、2011～2012年度の検出率は83.9%まで増加したが⁹⁾、2013年度以降は50%程度で推移していることが明らかとなった。

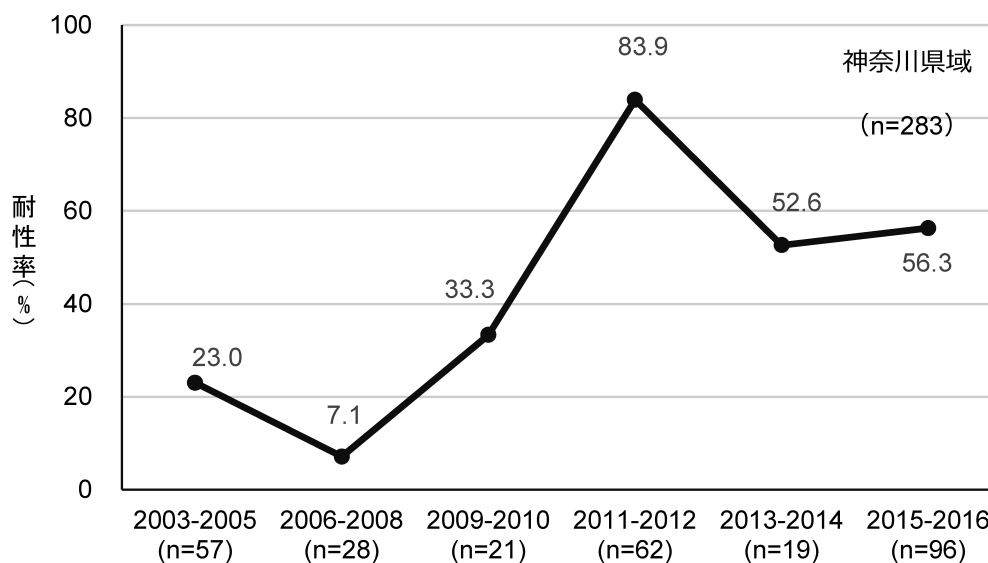


図3 MRMPの検出状況 (2003~2016年度)

表1 臨床分離株のMLs薬剤に対するMIC

(μg/mL)

菌株	株数	14員環		15員環	16員環	
		E M	CAM	AZM	J M	RKM
耐性株	55					
A2063G	54	≥256	16 - ≥256	4 - 64	4 - 16	0.063 - 1
不明	1	64	16	4	4	0.25
感受性株	51	0.004 - 0.016	0.004 - 0.016	<0.00024 - 0.00098	0.016 - 0.063	0.004 - 0.063
標準株	3					
M129	1	0.004	0.004	0.00098	0.063	0.016
FH	1	0.016	0.016	0.00098	0.063	0.063
Mac	1	0.004	0.004	<0.00024	0.063	0.063

臨床分離株のMLs薬剤に対するMICを表1に示した。薬剤感受性試験を実施した106株中MLs耐性株が55株(51.9%)で感受性株が51株(48.1%)であった。MLs耐性株は、14員環MLsのEMとCAMで高度耐性を示したが、16員環MLsのRKMは感受性株と同程度の低いMICを示した。このことは、これまで検出されたMLs耐性株と同様の傾向であった^{3,4)}。MLsは、構造の違いにより14員環、15員環、16員環に分けられるが、1990年代以降抗菌力の強いニューマクロライドの15員環AZMが使用されたことにより、MRMPが増加したと考えられた^{10~12)}。薬剤使用状況が耐性菌の出現に影響することから、使用薬剤と耐性菌の動向を合わせて監視する必要があると思われる。

MLs耐性55株についてPCR-RFLP法による遺伝子変異の解析を行ったところ、今回検出された変異は、55株中54株(98.2%)がA2063Gで1株(1.8%)が不明であった。不明株についてはダイレクトシーケンスで変異を確認したが、報告されているA2063G以外の変異株^{3,4)}で

はなかった。ドメインVの変異箇所によってMRMPに対する各抗菌薬の効果に特徴があり、A2063G/T/C、A2064G変異株は、14員環、15員環および16員環MLsのJMには高度耐性を示すが、RKMでは感受性を示している。またC2617G変異株では、すべてのMLsに低度の耐性を示す^{3,4)}。我々はMRMPのMICにおける特徴について、既に報告しているが^{10~12)}、実験的に作製されたMRMPでは臨床から検出されていない変異株も出現しているため、MRMPの動向については継続して監視する必要があると思われる。

患者から分離されたMLs耐性株(48株)および感受性株(43株)と標準株(3株)のFQs薬剤に対するMICを表2に示した。これらの株は、FQs薬剤に全て感受性であった。また、今回、薬剤感受性試験を実施した菌株はTCs薬剤に対して全て感受性であった。MRMP以外の薬剤耐性について調べたところ、臨床分離株では、まだFQs耐性株やTCs耐性株は出現していないことが示された。しかし、FQs耐性株については、フランスで実験由

表2 臨床分離株のFQs薬剤に対するMIC

(μg/mL)

菌株	株数	LVFX	CPFX	TFLX	SPFX	GFLX
耐性株	48					
A2063G	47	0.25 - 1	0.5 - 1	0.25 - 1	0.0625 - 0.125	0.0625 - 0.125
不明	1	1	1	0.25	0.0625	0.0625
感受性株	43	0.25 - 1	0.25 - 2	0.25 - 1	0.0625 - 0.25	0.0625 - 0.125
標準株	3					
M129	1	0.5	1	0.5	0.125	0.125
FH	1	0.5	1	0.25	0.125	0.125
Mac	1	0.5	1	0.25	0.0625	0.0625

来株の報告¹³⁾があるため、継続した観察が必要と思われる。

まとめ

2013～2016年度の肺炎マイコプラズマの病原体検出状況は、患者報告数の流行による増減と同様の傾向を示した。また、2013～2016年度のMRMP出現状況は、2011～2012年度の流行期に比べ減少してきているが50%以上を維持していること、A2063G変異を持つ耐性株が多かったことが示された。さらに、現在のところ臨床分離株にFQs耐性肺炎マイコプラズマの出現がないことも確認された。

今後も肺炎マイコプラズマの病原体検出を継続して実施し、新しい耐性菌出現に備えるため薬剤感受性試験によって薬剤耐性化の動向を把握する必要がある。一方で、菌株の遺伝子解析を行い、出現している薬剤耐性菌の遺伝子変異を長期的に捉えていく必要があると思われる。

謝辞

本研究は平成28年度大同生命助成研究、平成26～27年度神奈川県地域資源活用研究事業の一部として実施した。

本研究にご指導・ご協力いただきました先生方、施設、機関に深謝いたします（敬称略）。

堀野敦子、見理剛（国立感染症研究所）、大石智洋（川崎医科大学病院）、小田洋一郎（茅ヶ崎市立病院）、成田光男（札幌徳洲会病院）、茅ヶ崎市立病院小児科、神奈川県感染症発生動向調査定点医療機関、神奈川県保健福祉局（現健康医療局）

参考文献

- 1) 上原すゞ子，砂川慶介監修：小児科呼吸器感染症診断ガイドライン2007,16-17,135-136(2007)
- 2) 吉田眞一，柳雄介編集：戸田細菌学，南山堂，693-702(2002)
- 3) Matsuoka M, Narita M, Okazaki N, Ohya H, Yamazaki T and Ouchi K *et al.*, Characterization and molecular analysis of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* clinical isolates obtained in Japan. Antimicrob Agents Chemother. 48:4624-4630(2004)
- 4) Morozumi M, Iwata S, Hasegawa K, Chiba N, Takayanagi R and Matsubara K, *et al.*, Increased macrolide resistance of *Mycoplasma pneumoniae* in pediatric patients with community-acquired pneumonia. Antimicrob Agents Chemother. 52:348-350(2008)
- 5) Principi N, Esposito S. Macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae*: its role in respiratory infection. J. Antimicrob Chemother, 68:506-11 (2013)
- 6) Ieven M, Ursi D, Van Bever H, Quint W, Niesters HG and Goossens H : Detection of *Mycoplasma pneumoniae* by Two Polymerase Chain Reactions and Role of *M. pneumoniae* in acute respiratory tract infections in pediatric patients, J. Infect. Dis., 173,1445-1452(1996)
- 7) Okazaki N, Narita M, Yamada S, Izumikawa K, Umetsu M and Kenri T *et al.* : Characteristics of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* strains isolated from patients and induced with erythromycin in vitro. Microbiol. Immunol. 45,617-620(2001)
- 8) 大屋日登美，岡崎則男，日本マイコプラズマ学会編集，技術編 *Mycoplasma pneumoniae* の培地，分離培養，保存法：最新マイコプラズマ学，近代出版，166-175（2016）
- 9) 大屋日登美，古川一郎，相川勝弘，大石智洋，堀野敦子，小田洋一郎ほか：薬剤耐性肺炎マイコプラズマの検出状況と遺伝子型別，日本マイコプラズマ学会雑誌，43,42-45（2016）
- 10) 大屋日登美，成田光生，鈴木五三男，渡辺祐子，黒

- 木俊郎, 岡崎則男: 試験管内でセクションされたマクロライド耐性 *Mycoplasma pneumoniae* について－エリスロマシシンとクラリスロマシンにおける耐性菌セクションの比較－, 日本マイコプラズマ学会雑誌, 36,58-61 (2009)
- 11) 大屋日登美, 成田光生, 小田洋一郎, 古川一郎, 渡辺祐子, 黒木俊郎ほか: 試験管内でセクションされたマクロライド耐性 *Mycoplasma pneumoniae* について－アジスロマシシンとロキタマシシンにおける耐性菌セクションの比較－, 日本マイコプラズマ学会雑誌, 37,55-58 (2010)
- 12) 大屋日登美, 小田洋一郎, 古川一郎, 相川勝弘, 渡辺祐子, 相川勝弘ほか: 試験管内でセクションされたマクロライド耐性 *Mycoplasma pneumoniae* について－ジョサマイシンにおける耐性菌セクション－, 日本マイコプラズマ学会雑誌, 40,45-49 (2013)
- 13) Gruson D, Pereyre S, Renaudin H, Charron A, Bébéar C, Bébéar C.M. In vitro development of resistance to six and four fluoroquinolones in *Mycoplasma pneumoniae* and *Mycoplasma hominis*, respectively. Antimicrob Agents Chemother. 49,1190-1193 (2005)

短報

神奈川県におけるインフルエンザの 流行状況 (2017/2018シーズン)

渡邊寿美, 嘉手苅将, 佐野貴子,
近藤真規子, 黒木俊郎*

Epidemic of influenza in Kanagawa Prefecture (2017/2018 season)

Sumi WATANABE, Sho KADEKARU,
Takako SANO, Makiko KONDO
and Toshiro KUROKI

はじめに

インフルエンザは、インフルエンザウイルスを病原体とする急性呼吸器感染症である。インフルエンザは毎年流行し、社会生活に影響を及ぼす疾患であるため、感染症発生動向調査事業¹⁾により年間を通じて患者発生が監視されるとともに、全国の衛生研究所等でウイルス検出を行い、流行ウイルスの監視が行われている。本所では、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）の調査を行っている。

神奈川県感染症発生情報²⁾によれば、県域の2017/2018シーズン（以下本シーズン）の患者報告数は、2017年47週（11/20～26）に流行開始の目安となる定点あたり患者報告数1.0人を超えた後、緩やかに増加していき、52週（12/25～31）に注意報レベルの10.0人を、2018年3週（1/15～21）に警報レベルの30.0人を超え、5週（1/29～2/4）にピーク（66.36人）を迎えた。その後患者報告数は減少に転じ、10週（3/5～11）には9.18人となって注意報レベルを下回り、14週（4/2～8）に1.0人を下回って流行は終息した。本シーズンの流行期間は、19週間（2017年47週～2018年13週（3/26～4/1））であり、昨シーズンの25週間³⁾よりも短かったが、期間中の患者報告数は44,687人と2011/2012シーズン以降では最も多くなり、大流行となった。本シーズンのインフルエンザウイルスの流行状況につい

て解析を行ったので報告する。

方法

1. 検体

2017年36週～2018年13週の間ウイルスサーベイランス（県域の病原体定点調査）360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）27例、集団かぜ調査（県域保健所管内の初発事例）10集団45例、一般依頼検査（藤沢市と茅ヶ崎市からの検査依頼）90例、計522例の患者検体（鼻腔ぬぐい液、咽頭ぬぐい液、うがい液）を検査対象とした。

2. ウイルス分離

ウイルスサーベイランス360例、入院サーベイランス27例、集団かぜ45例、計432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（CPE）が確認できなかったものをインフルエンザウイルス分離陰性検体とし、後述する遺伝子検査による検出を行った。ウイルス分離株は、国立感染症研究所から配付された標準抗血清とモルモット血球を用いた血球凝集抑制試験（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。

3. 遺伝子検出

一般依頼検体90例とウイルス分離陰性検体166例、計256例について、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を行った。検出対象はインフルエンザウイルスのHA遺伝子とし、AH1pdm09, AH3, Bビクトリア系統, B山形系統の型別を行った。患者検体からのRNA抽出には、QIAamp Viral RNA mini kit(QIAGEN)を用いた。リアルタイムRT-PCRには、インフルエンザ検出マニュアル（第3版）⁴⁾記載のHA遺伝子検出用プライマーおよびプローブとQuantiTect Probe RT-PCR kit(QIAGEN)を使用した。機器は、StepOnePlus リアルタイムRT-PCRシステム（ABI）を使用し、反応条件はインフルエンザ検出マニュアル（第3版）⁴⁾記載のとおりとした。

結果と考察

1. ウイルス検出状況

インフルエンザウイルスの検出状況を図1に示した。2017年36週に入院例からAH1pdm09、一般依頼検体からAH3が各1例ずつ検出され、37週（9/11～17）にも一般依頼検体からAH1pdm09とAH3が検出された。10月に入ると41週（10/9～15）と44週（10/30～11/5）に発生した集団かぜ事例からAH3が、41週にウイルスサーベイランス検体からB山形系統も検出された。

1 神奈川県衛生研究所 微生物部
〒253-0087 茅ヶ崎市下町屋1-3-1
※ 現 岡山理科大学 獣医学部

47週から51週（12/18～24）にかけてはAH1pdm09の検出が多かった．ところが、52週（12/25～31）から2018年9週（2/26～3/4）にかけてはAH3とB山形系統の検出が多くなり、特にB山形系統の検出が増加した．また、7週（2/12～18）と9週には、AH3とB山形系統がともに陽性となった症例が1例ずつあった．10週（3/5～11）以降は、B山形系統の検出数が減り、再びAH3の検出割合が増えた．

集団かぜ調査においては、前述の2集団の後、46週（11/13～19）にAH3、47週に2集団からAH1pdm09、48週（11/27～12/3）にB山形系統、49週（12/4～10）と50週（12/11～17）にAH1pdm09、2018年3週に2集団からB山形系統がそれぞれ検出された．本シーズンの流行開始前の10月にはAH3による集団かぜが発生したが、その後はAH1pdm09が、さらに年が明けてからはB山形系統による集団かぜが発生し、図1に示す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27例からは、B山形系統が10例、AH1pdm09とAH3が7例ずつ検出され、3例はインフルエンザウイルス不検出であった．最初の2例は、非流行期の2017年36週と45週に発生したが、3例目以降は流行期（定点あたり患者報告数が1.0人以上）の2017年47週～2018年11週であった．27例中21例（77.8%）が定点あたり患者報告数10.0人を超えた1週～9週に発生しており、患者報告数の増加と入院症例数には関連があると思われた．また、入院症例の検出型別は、特定の型によるものではなく、ウイルスサーベイランスにおける検出型別の推移を反映していた．過去のシーズンにおいても、入院という事象が発生した時期に流行していた型

が検出されており、特定の型と入院症例数とを関連付けるデータは得られていない^{3,5-9)}．本シーズンは、患者報告数4万人を超える大きな流行であったために入院患者が増え、結果として入院患者が多かった時期に流行していたB型の検出数も増えたと考えられる．

検出されたインフルエンザウイルスは481例で、その内訳は、B山形系統が220例（45.7%）で最も多く、AH3が142例（29.5%）、AH1pdm09が114例（23.7%）、Bビクトリア系統が3例（0.6%）、AH3とB山形系統の同時検出が2例（0.4%）であった（図2）．本シーズンは、AH1pdm09、AH3、B山形系統の3種類の混合流行となり、その中でB山形系統が45.7%を占めて主流行株となった．B山形系統が主流行株となったのは、2013/2014シーズン以来のことである⁵⁾．

近年の流行では、1月から2月にかけての流行ピーク時にはA型の検出数が多く、ピークを過ぎた2月中旬以降はB型の検出数がA型を上回る傾向にあった^{5,8)}．本シーズンと過去の代表的なシーズンを比較すると、B型主流であった2013/2014シーズンとA型主流であった2015/2016シーズンはともに、流行ピーク時の1～2月にはA型の検出数が多く、B型の検出数がA型を上回ったのは2月中旬以降であった^{5,8)}．しかし、本シーズンは、流行開始（2017年47週）から51週（12/18～24）まではA型の検出が多かったが、52週以降のピーク時にはB型の検出数がA型を上回り、B型優位の状況が2018年9週まで続いた．本シーズンは、流行ピーク時にはB型が多く検出され、流行後期の3月に再びA型の検出が増えるという、例年とは異なる検出状況となった（図3）．

感染症の流行には、病原体の抗原性変異や集団中の感

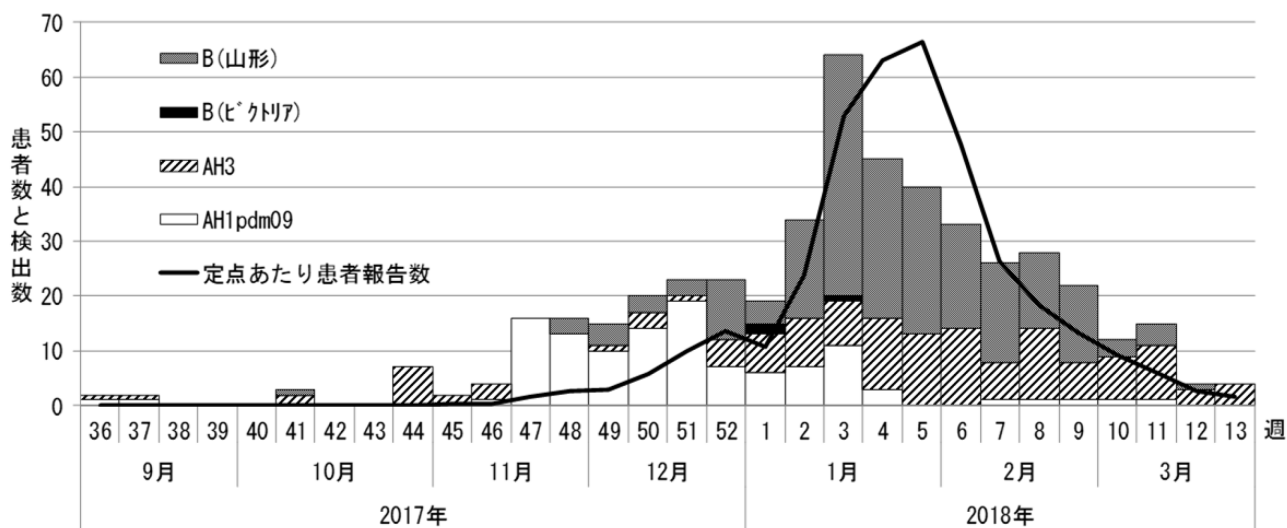


図1 インフルエンザウイルス検出数と定点あたり患者報告数の推移

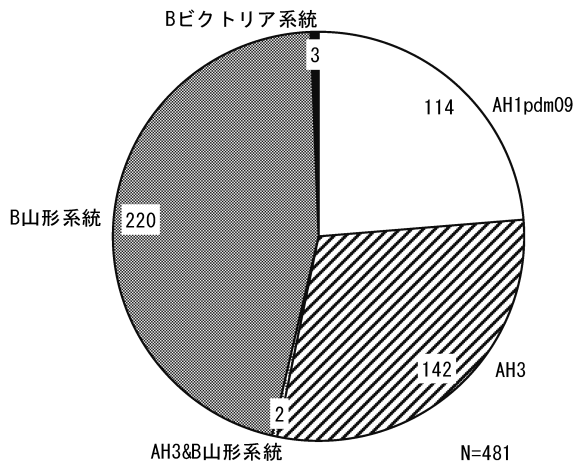


図2 インフルエンザウイルス検出割合

受性者の割合など様々な要因が考えられる。本シーズンのB山形系統分離株のHI価は80～320HIであり、ワクチン株のHI価（160HI）と比較して2倍差以内に収まっており、B山形系統分離株の抗原性がワクチン株と大きく異なっていたとは考えにくい。一方、本シーズン流行前の2017年7～8月に行った感受性調査（血清HI抗体価調査、対象数304名）では、感染リスクを50%に抑える目安と考えられる40HI以上の抗体保有率が、AH1pdm09では27.3%、AH3では48.7%であったのに対し、B山形系統では16.4%であった。B山形系統に対する抗体保有率はA型の2つの亜型に比べて低値であり、B型に対する感受性者が多く存在したと考えられた。したがって、感受性者が多い状況に加え、流行の早い時期にB山形系統が入ってきた結果、患者数が増加し、例年

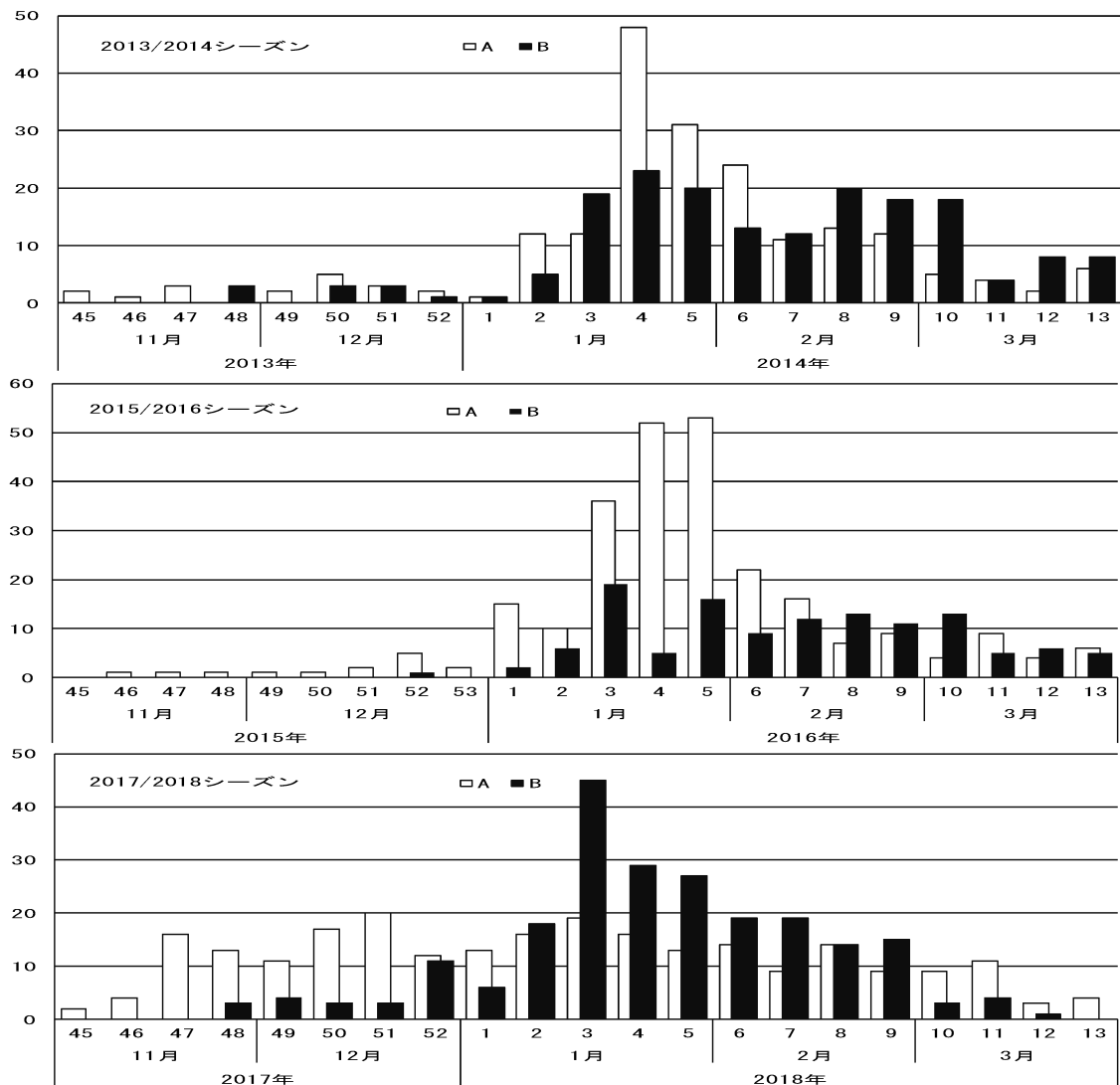


図3 インフルエンザウイルス型別検出状況

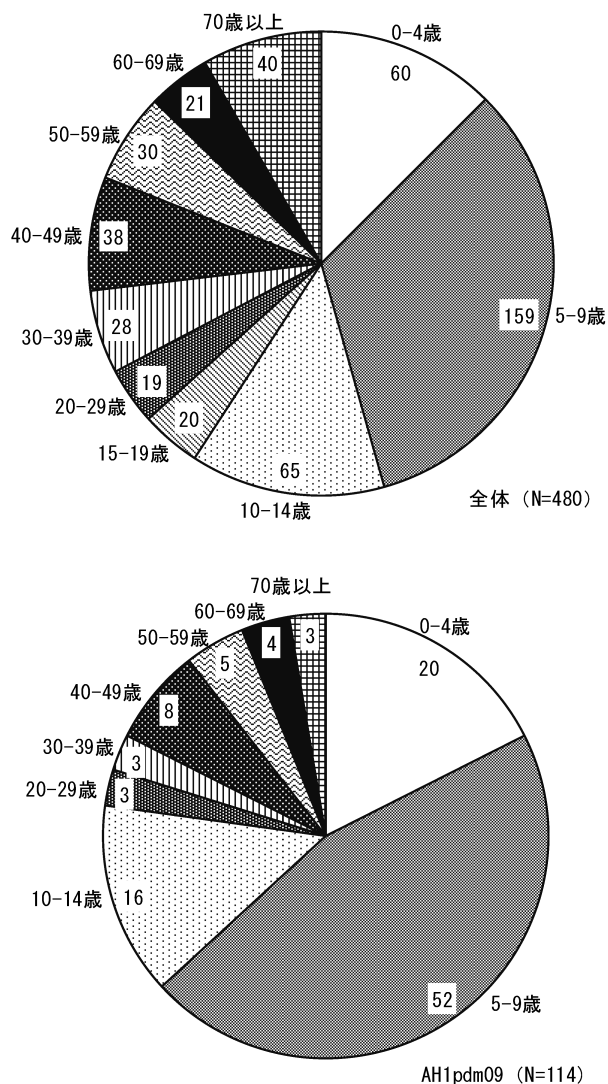


図4 インフルエンザウイルス検出者の年齢構成

よりも早い時期に B山形系統の流行が起きたと考えられる。

2. インフルエンザ検出者の年齢構成

インフルエンザウイルス検出者（480例）の年齢構成は、5～9歳が最も多く159例（33.1%）、10～14歳が65例（13.5%）、0～4歳が60例（12.5%）となっており、14歳以下が59.1%を占めた（図4）。本シーズンは、学校等で集団生活をする事が多い年齢層を中心に感染が広がったと考えられる。一方、入院症例は、11例が小児（0～9歳）、16例が成人（41～91歳）で、内 70歳以上が14例（51.9%）で半数を占めた。入院症例は小児も高齢者もほぼ等しく存在したが、インフルエンザウイルス検出者全体に占める70歳以上の割合が8.3%であることを考えると、他の年齢層に比べて高齢者は重症化しやすく、入院症例が多かったと考えられる。

検出型別に年齢構成を比べてみると、AH3とB山形系

統は全体の状況とほぼ同様であったが、AH1pdm09（114例）は5～9歳が52例（45.6%）、0～4歳が20例（17.5%）、10～14歳が16例（14.0%）となっており、14歳以下が77.1%を占め、AH1pdm09は特に小児で流行していたことがわかった（図4）。入院症例における検出型別と年齢とを比較してみると、AH1pdm09は0～14歳の小児が多く、AH3とB山形系統は70歳以上の高齢者が多かった。小児の入院症例でAH1pdm09の検出が多かった理由は、AH1pdm09が主として小児の間で流行していたためと考えられる。一方、AH3とB山形系統は、全体としては小児の検出者が多かったものの、高齢者でも一定数が存在したため入院症例からも検出されたと考えられる。

以上のように、本シーズンのインフルエンザの流行は、B山形系統が主流でAH3とAH1pdm09との混合流行であり、流行の中心は14歳以下の小児であった。また、近年の流行時にはA型の検出が多い時期であった1月にB型が多く検出されたことが特徴であった。

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県域保健所職員の皆様に深謝いたします。

文献

- 1) 厚生労働省健康局結核感染症課：感染症発生動向調査事業実施要綱，平成11年4月1日施行
- 2) 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29年36週報～平成30年13週報）
- 3) 渡邊寿美，嘉手苅将，佐野貴子，近藤真規子，黒木俊郎：ウイルス検査状況（発生動向調査） インフルエンザ 神奈川県（横浜市・川崎市・相模原市及び横須賀市を除く），神奈川県の感染症（平成28年），48-49（2017）
- 4) 国立感染症研究所：インフルエンザ診断マニュアル（第3版），24-28（2015）
- 5) 渡邊寿美，佐野貴子，伊達佳美，近藤真規子，黒木俊郎：神奈川県域におけるインフルエンザの流行状況（2013/2014シーズン），神奈川衛研研究報告，44，32-34（2014）
- 6) 渡邊寿美，佐野貴子，近藤真規子，斎藤隆行：神奈川県域におけるインフルエンザの流行状況（2011/2012シーズン），神奈川衛研研究報告，42，42-44（2012）
- 7) 渡邊寿美，佐野貴子，佐多辰，近藤真規子，丹羽佳代子：神奈川県域におけるインフルエンザの流行状況（2012/2013シーズン），神奈川衛研研究報告，43，

- 30-32 (2013)
- 8) 渡邊寿美, 嘉手苅将, 佐野貴子, 近藤真規子, 黒木俊郎: 神奈川県域におけるインフルエンザの流行状況 (2015/2016シーズン), 神奈川衛研研究報, **46**, 41-42 (2016)
- 9) 渡邊寿美, 佐野貴子, 伊達佳美, 近藤真規子, 黒木俊郎: 神奈川県域におけるインフルエンザの流行状況 (2014/2015シーズン), 神奈川衛研研究報, **45**, 48-50 (2015)

短報

合成樹脂製の器具・容器包装 におけるカドミウム及び鉛材質試験 に関する検討

関戸晴子, 清水 碧*, 垣田雅史,
田中由紀子, 飯島育代, 岸 弘子**

Study on Material Test for Cadmium and Lead from Food Contacting Product

Haruko SEKIDO, Midori SHIMIZU,
Masashi KAKITA, Yukiko TANAKA,
Ikuyo IJIMA, Hiroko KISHI

はじめに

合成樹脂製品には、安定剤や着色剤等の添加剤として重金属化合物が使用されることがあるが、カドミウム(Cd)や鉛(Pb)は毒性が強いことから、食品や器具・容器包装、子どもが口に入れる恐れのあるおもちゃ等には食品衛生法による規制があり、「食品、添加物等の規格基準」¹⁾(規格基準)により規格及び試験方法(公定法)が定められている。しかしながら、過去には外国製の土鍋からPbが溶出して輸入業者が自主回収するといった事例も発生しており、輸入時の検査で違反となる事例が後を絶たない。

公定法として示されている器具・容器包装の試験法については、これまで性能評価が実施されていないことから、国立医薬品食品衛生研究所が中心となり、現在、地方衛生研究所や登録検査機関とともに検証を実施しているところである。規格基準において、合成樹脂製の器具・容器包装の材質試験におけるCd及びPbの含有量は、それぞれ100 μ g/g以下と定められている。合成樹脂製器具・容器包装の材質試験の性能評価(試験室間共同試験²⁾)に参加した際、当所では、公定法に準じ、試料を炭化し、電気炉で灰化する開放系の前処理の後、原子吸

光光度(AAS)法及び誘導結合プラズマ発光強度測定(ICP-OES)法により測定した。その結果、基準値より高濃度に含有する検体ではPbの回収率が6割程度と著しく低かった。一方、マイクロ波試料前処理装置を用いて密閉系の前処理を行った場合(マイクロウェーブ法)は高濃度でも良好な回収率が得られた。この結果から、開放系の前処理過程でPbが損失した可能性が考えられた。そこで、前処理過程での揮散や他の化合物の影響など、Pbの減少原因を解明することとした。

公定法にはAAS法の基本的な測定条件は規定されているが、ICP-OES法における測定条件は示されていない。また、試料の前処理についても、使用する器具の記載はあるが、炭化時の温度や加熱時間、炭化や灰化の終点等の詳細な試験方法が示されていない。検査担当者の判断により実施しなければならない部分が多いことから、ICP-OES法を用いて、灰化容器の選択、炭化操作、電気炉での灰化条件等について詳細に検討することとした。その結果、分析値の担当者間における偏差を狭め、Pbの回収率の向上につながる知見が得られたので報告する。

方法

1. 試料

市販の合成樹脂製容器7試料(ポリエチレン製(PE)1試料, ポリプロピレン製(PP)2試料, ポリスチレン製(PS)1試料, ポリエチレンテレフタレート製(PET)3試料), 試験室間共同試験で配付されたポリ塩化ビニル製ペレット(PVC)3試料, 及び認証標準物質2試料(NMIJ CREM8123-a(PVC):PVC-H193, NMIJ CREM8133-a(PP):PP-H171)を用いた。

2. 試薬及び試液等

Cd標準原液は和光純薬工業(株)原子吸光分析用1000 μ g/ml, Pb標準原液は和光純薬工業(株)原子吸光分析用1000 μ g/ml, イットリウム(Y)標準原液は和光純薬工業(株)原子吸光分析用1000 μ g/mlを用いた。

硫酸、塩酸、硝酸は和光純薬工業(株)精密分析用または有害金属測定用を用いた。

Cd及びPb標準溶液は、各標準原液を0.1mol/l硝酸溶液を用いて適宜希釈して添加回収試験及び検量線用標準溶液に使用した。

内部標準として0.1mol/l硝酸溶液を用いて100 μ g/mlとしたY溶液を使用した。

3. 装置及び測定条件

ホットプレート(HP)はAS ONE製CHP-250DN, 電気炉はADVANTEC社製FUL232A, ICP-OES装置はAgilent社製720を使用した。ICP-OESの測定条件を表1に示す。

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

* 現 神奈川県健康医療局生活衛生部業務課

**前 理化学部

表 1 ICP-OES測定条件

装置	Agilent 720
測定波長	Cd : 214.439, 226.502, 228.802 Pb : 217.000, 220.353, 283.305 Y (IS) : 360.074, 371.029, 378.869
パワー	1.20Kw
ネブライザーフロー	0.75ml/min
試料取り込み遅延時間	15sec
繰り返し測定時間	15sec

4. 試験溶液の調製方法

細切した試料約1.0gを耐熱ガラス製の容器（トールピーカー）に採り硫酸2mlを加え一晩室温放置した後、HP上で90℃から450℃まで徐々に加熱した。まずHPの温度を90℃に設定し、10℃上昇後4分保持を繰り返し、200℃になったところで30分保持した。それから10℃上昇後6分保持を繰り返し、260℃になったところで15分保持した後、10℃上昇後6分保持を繰り返し、300℃になったところで1時間保持した。更に10℃上昇後4分保持を繰り返し、450℃になったところで3時間保持した。硫酸の白煙がほとんど出なくなり、大部分が炭化したのを確認してHP上での加熱を終了とした。これを約450℃の電気炉で12時間加熱して灰化した。この残留物に塩酸（1→2）5mlを加えてかき混ぜ、水浴上で乾固直前まで塩酸を蒸発させ、水浴から降ろして余熱で乾固させた。冷後0.1mol/l硝酸溶液20mlを加えてろ紙（5C）を用いてろ過し、試験溶液とした。

5. 定量

試験溶液及び検量線用標準溶液について、内部標準にY溶液を用いて測定を実施した。定量に使用する波長はCd：228.802nm、Pb：283.305nm、Y：371.029nmとした。検量線はCd0.005～2μg/ml、Pb0.05～20μg/mlで作成し、定量下限値はCd、Pbともに0.5μg/ml（基準値の1/10（10μg/g））とした。

結果及び考察

1. ICP-OES測定条件

Cd、Pbの測定波長についてはピーク形状及び強度を考慮して3波長ずつ選択し測定を実施した。定量には3波長の中で最も強度の強い波長であるCd：226.502nm、Pb：220.353nmを選択しようと考えた。しかし、標準溶液では問題がなかったが、検討試料測定時、近傍に妨害ピークが認められた。そこで、測定した3波長のうち近傍に妨害ピークが認められなかったCd：228.802nm、Pb：283.305nmを定量に選択した。残りの2波長についてはピーク形状、妨害ピークの確認に使用した。Yに

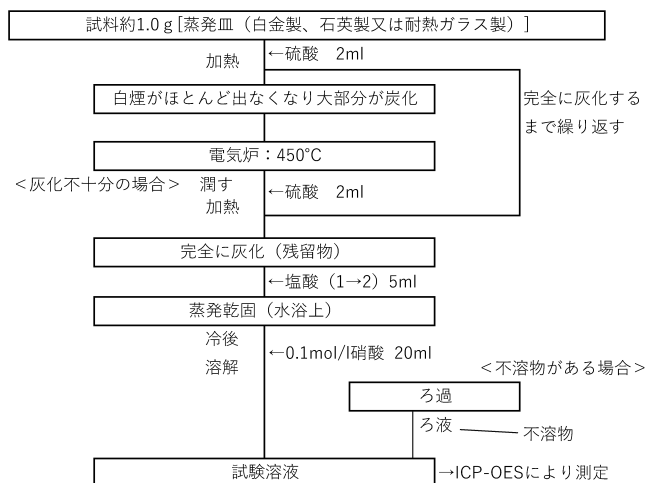


図 1 試験溶液の調製方法（公定法）

ついては一般的に使用されている371.029nmを選択した。

2. 検量線

Cd0.005～2μg/ml、Pb0.05～20μg/mlで作成した。Cd、Pbともに0.9999以上の相関係数が得られた。

3. 試験溶液調製方法の検証

公定法の調製方法を図1に示す。公定法では、詳細な方法が記載されていないため、検査機関や検査担当者によって差異が生じる可能性が考えられる。そこで使用する容器、硫酸を加えた後の炭化条件、電気炉での灰化条件と灰化の終点について検証した。

（1）灰化容器の選択

使用する灰化容器について、白金製の蒸発皿（白金皿）と耐熱ガラス製のピーカー（ピーカー）を比較した。試料には、PET、PP、PSの3材質を細切し、約1.0gにCd及びPb標準液を100μg/gずつを添加したものを用いた。炭化にはHPを使用し、加熱温度と炭化の状態を詳細に確認できるようにした。HP上での加熱は、まず100℃から300℃まで10分ごとに20℃ずつ温度を上げる条件とした。電気炉での加熱は450℃6時間、完全に灰化するまで内容物を硫酸で潤して再び加熱する操作を繰り返した。完全灰化の終点は、食品衛生検査指針理化学編20053)を参考とし、ほとんど白色の灰分となった点とした。

灰化容器の違いによる回収率を表2に示す。PETにおけるPbの回収率が白金皿を使用した場合に80.0%となった以外は、ピーカー、白金皿ともに90%以上の回収率が得られた。灰化のために、加熱した回数、加えた硫酸の量は異なるが、回収率に大きな差は認められなかった。

ピーカーは炭化状態が明白に観察できたことから、これを灰化容器とした。また、HP上での炭化操作による

表2 灰化容器の違いによる回収率 (%) (n=1)

測定 元素	測定波長 (nm)	PET		PP		PS	
		白金皿	ピーカー	白金皿	ピーカー	白金皿	ピーカー
		加熱3回	加熱2回	加熱2回	加熱2回	加熱4回	加熱4回
Cd	228.802	91.4	101	103	102	103	102
Pb	283.305	80.0	99.8	93.7	95.1	95.6	96.6

試料の飛散を防ぐため、時計皿で蓋をして加熱したところ、蓋に試料の一部が付着してしまうことがあった。コンタミネーションは防止できるが、試料量の減少につながる恐れもある。そこで、容器外への飛散が少ないトルビーカーの使用が有効であると考えられた。

(2) HP上での炭化条件と電気炉灰化条件

灰化容器の選択で3試料の添加回収率がCd, Pbともに80%以上の良好な結果が得られたため、加熱条件は変えずに、HP炭化-電気炉灰化の加熱回数を1～3回と設定し、炭化及び灰化の状態について検証を実施した。容器は試験室間共同試験時に使用していた白金皿とした。材質はPPを選択し、細切した試料約1.0gにCd及びPb標準液を1000 μ g/g (基準値の10倍) ずつ添加したものをを用いた。結果を表3に示す。回収率はCd, Pbいずれも80～110%の範囲であり、加熱回数、硫酸の添加量は異なるが、結果に大きな差は認められなかった。

さらに、試験室間共同試験で使用したPbの回収率が低かった検体PVC (高濃度) を試料として、同様に検証した。結果を表3に示す。加熱回数が増えるにつれて、Cd, Pbともに回収率の低下が認められ、加熱回数3回では回収率が40%を下回った。Cdは2回目までは回収率90%以上であったが、Pbは2回で約70%となり、元素により回収率の低下に差があった。灰化の終了をほとんど白色の灰分となった点と設定していたが、今回加熱回数1～2回では残留物は黒色～茶褐色の顆粒物であった。白色でなくても良好な回収率が得られていることから、白色になるまで灰化を繰り返す必要はなかった可能性がある。試験室間共同試験時には、HP炭化-電気炉灰化の加熱を2～3回実施していたこと、灰化の終点を白色としていたことから、Pbが減少した原因は加熱回数過多であったと判断した。

Cd及びPb標準液を添加したPPを用いた検証結果ではPb回収率低下の現象を再現できなかったこと、あらかじめ試料にCd, Pbを添加済のPVC (高濃度) を用いた検証結果ではPb回収率低下の現象を再現できたことから、合成樹脂の種類や標準試料の添加方法によっても、HP炭化-電気炉灰化の加熱回数における回収率に差異が生じていることが予想された。そのため、前処理法を検討するには、Cd, Pb添加済の認証標準物質を用いる必要があると思われた。

表3 加熱回数の違いによる回収率 (%) (n=1)

測定 元素	測定波長 (nm)	PP			PVC(高濃度)		
		白金皿			白金皿		
		加熱1回	加熱2回	加熱3回	加熱1回	加熱2回	加熱3回
Cd	228.802	104	109	114	91.5	93.6	36.7
Pb	283.305	104	83.0	105	93.8	73.4	33.0

表4 電気炉灰化時間による回収率 (%) (n=3)

測定元素	測定波長	電気炉 灰化時間	PVC-H193	PP-H171
Cd	228.802nm	12 h	84.2 $\pm$ 2.8	81.3 $\pm$ 3.6
		24 h	89.6 $\pm$ 0.3	80.6 $\pm$ 6.3
		48 h	86.7 $\pm$ 3.8	84.1 $\pm$ 3.1
		60 h	84.4 $\pm$ 2.3	83.1 $\pm$ 2.7
Pb	283.305nm	12 h	85.3 $\pm$ 1.4	82.0 $\pm$ 4.2
		24 h	70.3 $\pm$ 13.6	80.3 $\pm$ 6.1
		48 h	66.9 $\pm$ 6.8	85.0 $\pm$ 2.4
		60 h	86.3 $\pm$ 1.7	84.1 $\pm$ 1.8

トルビーカー使用、加熱回数1回

(3) 試験溶液の調製方法

再現性の良い安定した試験方法の整備を目指して、再度HP炭化-電気炉灰化の加熱温度や保持時間等の条件を検討することとした。容器は(1)の検討結果からトルビーカーを使用することとした。加熱回数は、表3に示す検証結果において90%以上の回収率が得られたことから、1回とした。検討試料は認証標準物質2試料(PVC-H193及びPP-H171)とした。

条件検討の結果、硫酸で浸潤させ、HPの温度を90℃に設定し、10℃上昇後4分保持を200℃になるまで繰り返し、200℃になったところで30分保持、それから10℃上昇後6分保持を260℃になるまで繰り返し、260℃になったところで15分保持、その後、10℃上昇後6分保持を300℃になるまで繰り返し、300℃になったところで1時間保持、更に10℃上昇後4分保持を繰り返し、450℃になったところで3時間保持、硫酸の白煙がほとんど出なくなり、大部分が炭化したことを確認してHP上での加熱終了とした。これを約450℃の電気炉で12～60時間加熱して灰化した。結果を表4に示す。12時間と60時間ではPVC-H193及びPP-H171のどちらの試料もCd, Pbともに80%以上の回収率が得られた。しかし、PVC-H193では24時間と48時間でPbの回収率が約70%となってしまった。12時間でも十分な回収率が得られていたことから、電気炉での灰化時間は12時間とし、HPでの炭化条件は90℃から10℃ずつ徐々に加熱していく方法を前処理法として採用することにした。

4. 市販品における実態調査

3. の検討結果を踏まえ、公定法に記載のない炭化時の温度や加熱時間等詳細な条件を設定した本前処理法を

表5 測定結果 ($\mu\text{g/g}$) (n=1)

No.	試料	Cd, Pb含有量	Cd	Pb
			228.802nm	283.305nm
1	市	PE (弁当箱フタ)	—	ND
2	販	PP (弁当箱本体)	—	ND
3	の	PS (トレイ)	—	ND
4	合	PET (炭酸飲料)	—	ND
5	成	PET (清涼飲料A)	—	ND
6	樹	PET (清涼飲料B)	—	ND
7	脂	PP (保存用コンテナ)	—	ND
8	共同試験 試料	PVC (無添加)	Cd:<5 Pb:<5	ND
9		PVC (低濃度)	Cd:9.46 Pb:193	ND
10		PVC (高濃度)	Cd:93.3 Pb:946	69.8(73.7%) 871.0(92.1%)
11	認証標準物質	PVC-H193	Cd:95.62 Pb:965.5	71.5(74.8%) 872.1(90.2%)
12	物質	PP-H171	Cd:94.26 Pb:949.2	77.0(81.7%) 759.0(80.0%)

定量下限値未満はND、No.9~12は括弧内に回収率を併記

用いて、市販の合成樹脂製容器7試料(PE 1試料, PP 2試料, PS 1試料, PET 3試料)ならびに試験室間共同試験で配付されたPVC 3試料の計10試料と検査における精度管理の真度試験用として認証標準物質2試料(PVC-H193及びPP-H171)の計12試料の測定(n=1)を実施した。その結果を表5に示す。

市販の合成樹脂製容器からのCd及びPbはすべて定量下限値未満であり、基準に適合していた。また、試験室間共同試験で配付されたPVC 2試料(低濃度及び高濃度)と認証標準物質2試料(PVC-H193及びPP-H171)から検出された値はCd: 69.8~77.0 $\mu\text{g/g}$, Pb:154.2~872.1 $\mu\text{g/g}$ であった。その回収率はCd: 74~82%, Pb: 79~92%となり、食品GLP^①で規定されている70~120%の範囲内であった。今回PVC(低濃度)試料から検出したCdは定量下限値未満であったため不検出とした。

認証標準物質(PVC-H193)のCd及びPb回収率は、PVC(高濃度)と相違ない結果であったことから、精度管理試料として認証標準物質を使用することは試験操作を担保するために有用であると考えられた。

まとめ

公定法における合成樹脂のCd及びPb材質試験について、ICP-OES法を用いて、記載のない炭化時の温度や加熱時間、炭化の終点や灰化の終点等の詳細な条件を検討した。使用する容器は耐熱性のトールビーカー、硫酸を加えた後の炭化操作は1回とし、90℃から450℃まで10℃ずつ徐々に上昇して炭化させた後、電気炉での灰化時

間を12時間とすることで70~120%の回収率が得られた。合成樹脂の種類や添加方法の違いにより、Cd、Pbの回収率は、HP炭化-電気炉灰化の加熱回数が増加することで、大きな影響を受けることが判明したことから、試験室間共同試験でPbの回収率が低くなってしまった原因を把握することができた。さらに、詳細な条件を設定したことで、検査担当者の判断による部分が少なくなり、個人による差異のない試験法としての実施が可能となった。また、標準溶液を添加した試料では材質試験の回収率低下を再現できなかったことや実態調査の結果から、検査の際に精度管理の真度試験用として認証標準物質2試料(PVC-H193 及びPP-H171)を用いることは、検査の信頼性確保の点で有効であると考えられた。本法における回収率が70~120%であったことから、行政検査に十分適用できると考える。しかし、検討した認証標準物質の材質や試行回数がやや不足していることから、今後も室内再現性試験を実施し、高精度で再現性の高い試験法となるよう検討する予定である。

謝時

本検討を実施するにあたり、検討試料として、試験室間共同試験にて分与された検体の使用の許可等、ご協力を頂きました国立医薬品食品衛生研究所の六鹿元雄先生に深謝いたします。

参考文献

- 1) 食品、添加物等の規格基準、厚生省告示第370号、昭和34年12月28日

- 2) 六鹿元雄：合成樹脂製器具・容器包装におけるカドミウムおよび鉛材質試験法の性能比較，食品衛生学雑誌, 55, 269-278 (2014)
- 3) 厚生労働省監修：食品衛生検査指針理化学編2005, 898-900, 2005, 日本食品衛生協会
- 4) 厚生労働省生活衛生局食品保健課長通知，食品衛生検査施設等における検査等の業務管理の実施について，衛食第117号，平成9年4月1日

短報

ミョウバンの識別分析について

外館史祥, 羽田千香子, 甲斐茂美, 熊坂謙一

Analytical Method for Discrimination of Alum

Fumiaki SOTODATE, Chikako HADA,
Shigemi KAI, Kenichi KUMASAKA

諸 言

ミョウバンは、 $M_2(SO_4)_3 \cdot M'SO_4 \cdot 24H_2O$ からなる組成をもつ複塩の総称である¹⁾。Mは3価の金属でAl, Cr, Fe及びCeなど、またM'は1価の金属等でK, Na及びNH₄などである。その物質名については、通常「ミョウバン」と呼ばれるものはカリウムミョウバン（硫酸アルミニウムカリウム）であり、他のミョウバンについてもアンモニウムミョウバン（硫酸アンモニウムアルミニウム）、ナトリウムミョウバン（硫酸ナトリウムアルミニウム）等と呼ばれることが多い¹⁾。

また、ミョウバンは、食品添加物の保存剤として用いられる焼きミョウバンの原料になるだけでなく、顔料、染料、製紙用、皮なめし、浄水剤、メッキ工業また医薬品として幅広い用途に用いられる。その一方で、大量の内服により嘔吐、下痢、更に消化管の炎症を起こす¹⁾。ミョウバン中のアルミニウムは暫定耐容週間摂取量として体重1 kg、一週間当たり、2 mgと国際機関（JECFA：FAO/WHO合同食品添加物専門家会議）により制限されている²⁾。ラットを用いた動物実験では、アルミニウムを多量に投与したときに腎臓や膀胱への影響や握力の低下などが認められている²⁾。

試験検査にて未知物質を分析する場合、先ずはその外観等を参考として有機化合物を念頭に置いた機器分析を実施するが、メタノール等の有機溶媒に不溶な場合は、無機化合物の可能性も考慮した分析を行う必要がある。その場合、一般的に汎用されるフォトダイオードアレイ（PDA）検出器付きの高速液体クロマトグラフィー、液体クロマトグラフ質量分析法及びガスクロマトグラフ質

量分析法などの分析手法では、測定原理と物質特性が一致しないことから、適切な分析データを得ることは困難である。

そこで、未知物質から無機化合物を同定するための分析手法を検討する目的で、赤外吸収スペクトル測定法（FT-IR法）、蛍光X線分析法及び炎色反応による分析を実施した。その結果、構成元素の組合わせが多岐に渡るミョウバンのうち、アルミニウムを含有し、1価の金属元素のみ異なるカリウムミョウバン、アンモニウムミョウバン及びナトリウムミョウバンの3種類の識別に関する知見を得たので報告する。

方法

1 試薬

試薬は、関東化学（株）製 硫酸カリウムアルミニウム・12水（カリウムミョウバン、特級）及び 硫酸ナトリウムアルミニウム・12水（ナトリウムミョウバン、鹿特級）並びに和光純薬工業（株）製 硫酸アンモニウムアルミニウム・12水（アンモニウムミョウバン、純度99.9%）及び塩酸（試薬特級）を用いた。

2 FT-IR法

赤外分光光度計は日本分光（株）製FT/IR-4700を用い、測定方法はダイヤモンドプリズムを用いたATR法として、分解能を4 cm⁻¹、測定範囲を4000–400 cm⁻¹とした。各種試薬を適量とり、メノウ乳鉢で粉末化して試料とした。

3 蛍光X線分析法

蛍光X線分析装置は（株）島津製作所製EDX-8000を用い、重元素を対象にした分析条件は管電圧を50 kV、解析範囲を0–40 keVとし、軽元素を対象にした分析条件は管電圧を15 kV、解析範囲を0.8–4.4 keVとし、それぞれ積分時間は60 秒、雰囲気は真空条件で分析した。また、各種試薬を適量とり、微量用試料容器と試料容器保持フィルム（マイラ）に入れ試料とした。

4 炎色反応

炎色反応試験法は、日本薬局方一般試験法の炎色反応試験法³⁾に従い、各種試薬に塩酸を少量加えてかゆ状にし、試料とした。

5 焼きミョウバンの調製方法

試薬より適量採取し、300 °Cで1 時間乾燥後、放冷したものを焼きミョウバンとした。各種焼きミョウバンは吸湿を避けるため放冷にはデシケーター（シリカゲル）を用い、24 時間以内に試験に用いた。

結果及び考察

1 FT-IR法

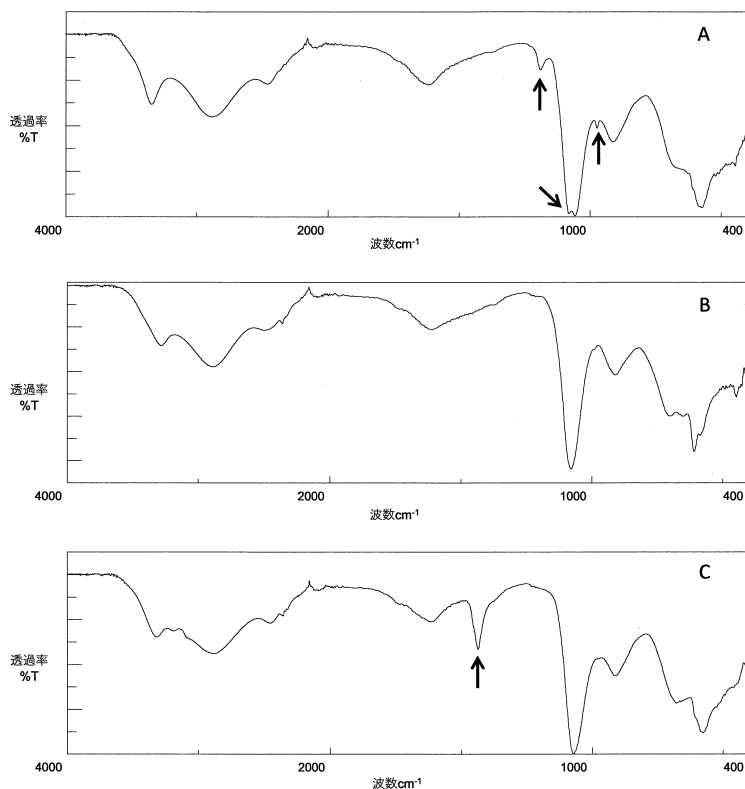


図1 各種ミョウパンの赤外吸収スペクトル

Aはカリウムミョウパンを、Bはナトリウムミョウパンを、Cはアンモニウムミョウパンについて示す。図内の矢印は各種ミョウパンに特徴的な吸収箇所を示す。なお、測定法はATR法とした。

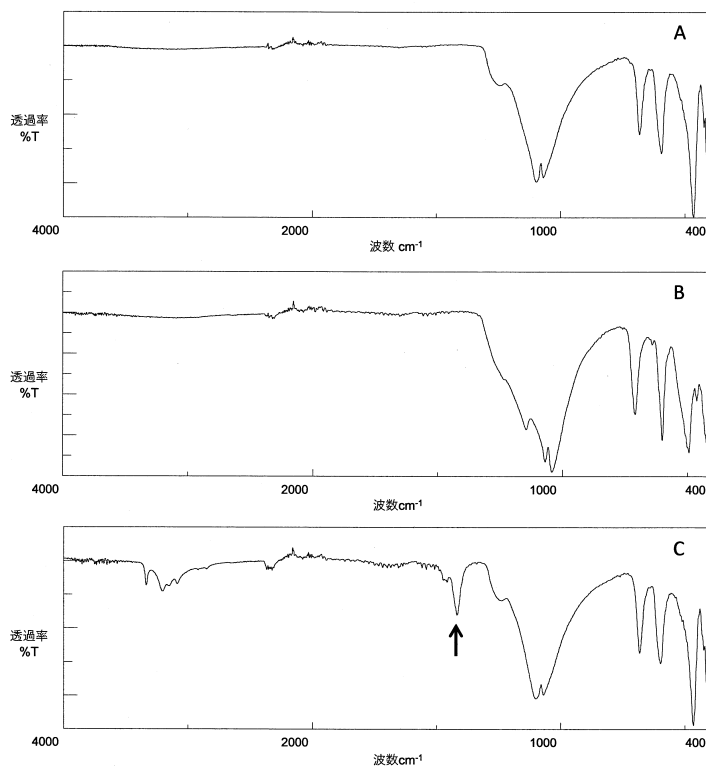


図2 各種焼きミョウパンの赤外吸収スペクトル

Aはカリウムミョウパンを、Bはナトリウムミョウパンを、Cはアンモニウムミョウパンについてそれぞれ焼成後のIRスペクトルを示す。

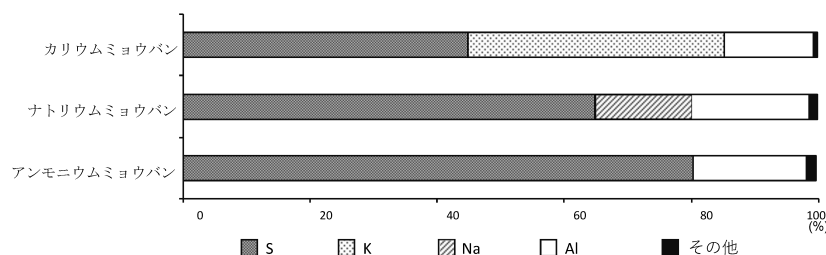


図3 各種ミョウバンの蛍光X線分析法による構成元素
分析結果は主要元素のみで、1.0%以下の微量構成元素は除いた。

表1 各種ミョウバンの蛍光X線分析法による各種元素の存在比

	存在比 (%)				
	SO ₄	K	Al	Na	その他
カリウムミョウバン	72.7 (74.4)	17.0 (15.1)	9.8 (10.5)	—	0.5
ナトリウムミョウバン	77.2 (79.4)	—	10.6 (11.1)	11.6 (9.5)	0.6
アンモニウムミョウバン	88.5 (87.7)	—	10.7 (12.3)	—	0.8

各種元素は質量%で存在比を、括弧内は理論値を示した。硫黄はSO₄として質量%を算出した。

FT-IR法は一般的には有機化合物の同定、構造解析等に用いられる分析手法であるが、水酸化物や炭酸塩など、陰イオンが特徴的な一部無機化合物にも有効な分析手法である⁴⁾。分析対象とした3種類のミョウバンの赤外吸収スペクトルを図1に示した。いずれも異なるスペクトルを示しており、特にカリウムミョウバンでは1200及び1000 cm⁻¹付近に、アンモニウムミョウバンでは1500 cm⁻¹付近に特徴的な吸収が確認された。

次に各種焼きミョウバンのFT-IR法による識別について検証した。その赤外吸収スペクトルを図2に示した。なお、安野らの報告⁵⁾によると公定書¹⁾の条件である200℃、4時間の乾燥では結晶水の脱水が不十分であることから、安野らの方法に従い、300℃で1時間乾燥し脱水物(焼きミョウバン)を得た。焼成により各種ミョウバンの性状は、無色の結晶から白色の粉末に変化した焼成する前の全てのミョウバンでは3500-3300 cm⁻¹付近の水和物由来と思われる吸収が認められた。焼成後ではその吸収が認められなくなったことから、ミョウバンの内部の結晶水がなくなったものと考えられた。また、焼きアンモニウムミョウバンでは3500 cm⁻¹付近にN-Hと考えられる吸収が見られ、1500 cm⁻¹付近に焼成前のミョウバンと同様の特徴的な吸収が認められた。一方、カリウムミョウバンとナトリウムミョウバンでは焼成によって吸収スペクトルが変化し、カリウムミョウバンの特徴的な吸収が見られなくなったが、1200-1000 cm⁻¹付近の吸収が異なっていることから識別が可能であると考えられた。

以上のことからFT-IR法では、3種類のミョウバン及び

それらの焼きミョウバンについて異なる赤外吸収スペクトルが得られることを確認した。

2 蛍光X線分析法

蛍光X線分析法では、分析対象にX線を照射すると、元素特有の蛍光X線が放射される。この蛍光X線の波長(エネルギー)と強度を測定することで分析対象に含有される元素の種類と量を知ることができる⁶⁾。そのため、各種ミョウバンの構成元素の確認に有効な分析手法であると考えられた。その分析結果を図3に示す。各種ミョウバンに特徴的な元素としてカリウムミョウバンからはカリウムが、ナトリウムミョウバンからはナトリウムが検出された。アンモニウムミョウバンはカリウムやナトリウムが検出されなかったが、硫黄の全体に占める比率が他の2種類と比較して増加していた。

次に構成元素の存在比について検討した。マイラの影響により酸素及び窒素は検出されないため、酸素については硫黄をSO₄とし、窒素については除外し測定値を再計算した。その結果を表1に示す。今回の条件における各種ミョウバンの理論値と測定値はほぼ一致していた。以上の結果より蛍光X線分析法は、構成元素とその比率が異なる各種ミョウバンの確認には、有効な分析手段であると考えられた。

3 炎色反応

炎色反応では、熱によって原子中の電子が励起され、それが低エネルギー準位に遷移する際に元素に特徴的な波長の光が放出される性質を利用して、その元素の定性を行う方法である⁷⁾。そこで各種ミョウバンを構成してい

る元素の違いによる識別について検証を行った。

カリウムミョウバンでは、コバルトガラスを通じてカリウムの薄赤紫色の炎を確認した。また、ナトリウムミョウバンではナトリウムに特有な黄色の炎を確認したが、コバルトガラスを通じて特有な色は確認されなかった。一方、アンモニウムミョウバンでは特有な炎色を確認できなかった。以上の結果より、炎色反応では1価の金属元素等の違いに基づく異なる結果が得られ、ミョウバンの構成元素の確認の一助となると考えられた。

まとめ

本研究では3種類のミョウバンを識別する分析手法について検討を行った。その結果、分析対象としたFT-IR法、蛍光X線分析法及び炎色反応にていずれも構成元素の違いに基づく異なる分析結果が得られることを確認した。しかしながら、ミョウバンを構成する3価及び1価の金属元素等の種類が多岐に渡ることから、単一の分析手法での識別は困難と考えられ、複数の分析手法の組み合わせにより、確実な識別が可能になるものと考えられる。また、今回は未検討であるが、無機化合物の分析手法としてICP発光分光分析法、ICP質量分析法及びイオンクロマトグラフィーなどもあり、構成元素が多岐に渡るミョウバンの分析では有益な分析結果が得られると考えられる。よって今後も未知物質や異物等の分析対応を鑑み、無機化合物の分析について知見を蓄積したい。

参考文献

- 1) 食品添加物公定書解説書, 第8版, 谷村顕雄, 棚元憲一監修, pp. D-1738-D-1741, 廣川書店, 東京(2007)
- 2) 厚生労働省, 食品中のアルミニウムに関する情報, (平成25年7月4日) http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryoku/shokuhin/syokuten/aluminium/index.html (2018/5/7アクセス)
- 3) 厚生労働省告示第64号: 第十七改正日本薬局方(平成28年3月7日), 一般試験法1.04 炎色反応試験
- 4) 藤岡裕二, 金橋康二, 斎藤公児, 斎藤吉俊, 後藤潔: 赤外分光分析法による無機水酸化物の脱水挙動の解析と不定形耐火物評価技術への応用, 鉄と鋼, 93, 150 - 155(2007)
- 5) 安野哲子, 萩野周三, 小野綾子, 大島敏子, 遠藤英美: 焼きミョウバンの水不溶物に関する知見, 食品衛生学雑誌, 20, 471 - 476(1979)
- 6) Tetsuya Masuda.: Topics of Elemental Analysis, Journal of the society of Inorganic

Materials, Japan, 11, 57-62(2004)

- 7) 田中勝久: 無機物質の色, 化学と教育, 65, 194-197 (2017)

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29年度）

古川一郎，政岡智佳，中嶋直樹

Occurrence of enterohemorrhagic
Escherichia coli in Kanagawa Prefecture
(April,2017-March,2018)

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，EHEC感染症の患者と診断した医師は，保健所を経由して都道府県知事に直ちに届け出なければならない¹⁾。さらに，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。感染研は，全国から送付された菌株について遺伝子解析を実施し，全国レベルの大規模な集団発生や散発的集団発生を探知することにより感染の拡大防止に努めている。感染研では，2014年度から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）を用いた解析が実施され，その結果は各自治体へ還元されている。さらに，溶血性尿毒症症候群（以下，HUSと略す）発症者については，EHECが分離されなくても，便からのベロ毒素（以下，VTと略す）の検出，血清中のO抗原凝集抗体あるいはVT抗体の検出によって診断された場合も届出の対象となっており¹⁾，当所においても搬入された血清について，EHEC加熱死菌により抗体の確認を行っている。

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，VT型別，薬剤感受性試験およびPFGE解析を，またO157についてはスクリーニング法として用いられているIS-printing法（以下，IS法と略す）を併せて実施している。本報では，平成29年度に収集したヒトおよび集団食中毒事例の原因食品から分離されたEHEC 91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 91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)

表1 EHEC 91株の血清型およびVero毒素型（平成29年度）

施設	菌株数	O157		O26	O103	O121	O165	OUT
		VT1&2	VT2	VT1	VT1	VT2	VT1&2	VT2
平塚保健福祉事務所	16	4	12					
同上 秦野センター	31	6	2	23				
鎌倉保健福祉事務所	3		2					1
小田原保健福祉事務所	8	5	3					
同上 足柄上センター	7	4	3					
厚木保健福祉事務所	10	4	5		1			
同上 大和センター	3		1	1		1		
茅ヶ崎市保健所	1	1						
藤沢市保健所	12	5	4	2			1	
計（割合）	91	29 (31.9%)	32 (35.2%)	26 (28.6%)	1 (1.1%)	1 (1.1%)	1 (1.1%)	1 (1.1%)

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	13	8	21
6-10	3	3	6
11-20	4	1	5
21-30	5	11	16
31-40	6	8	14
41-50	3	2	5
51-60	2	7	9
61-70	4	3	7
>70	3	3	6
計	43	46	89

23株を含むヒト由来89株および食品由来2株であった。91株のうち59株は、県域の医療機関等で分離され、32株は当所地域調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。ヒト由来の89株の血清型およびVT型は、O157(VT1&2) 29株、O157(VT2) 30株、O26(VT1) 26株、O103(VT1) 1株、O121(VT2) 1株、O165(VT1&2) 1株、OUT(VT2) 1株、食品由来株はO157(VT2)が2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43名、年齢範囲3～80歳で平均29.1歳（中央値27.0歳）、女性が46名、年齢範囲1～81歳で平均32.8歳（中央値29.5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℃の条件下で19時間行った。泳

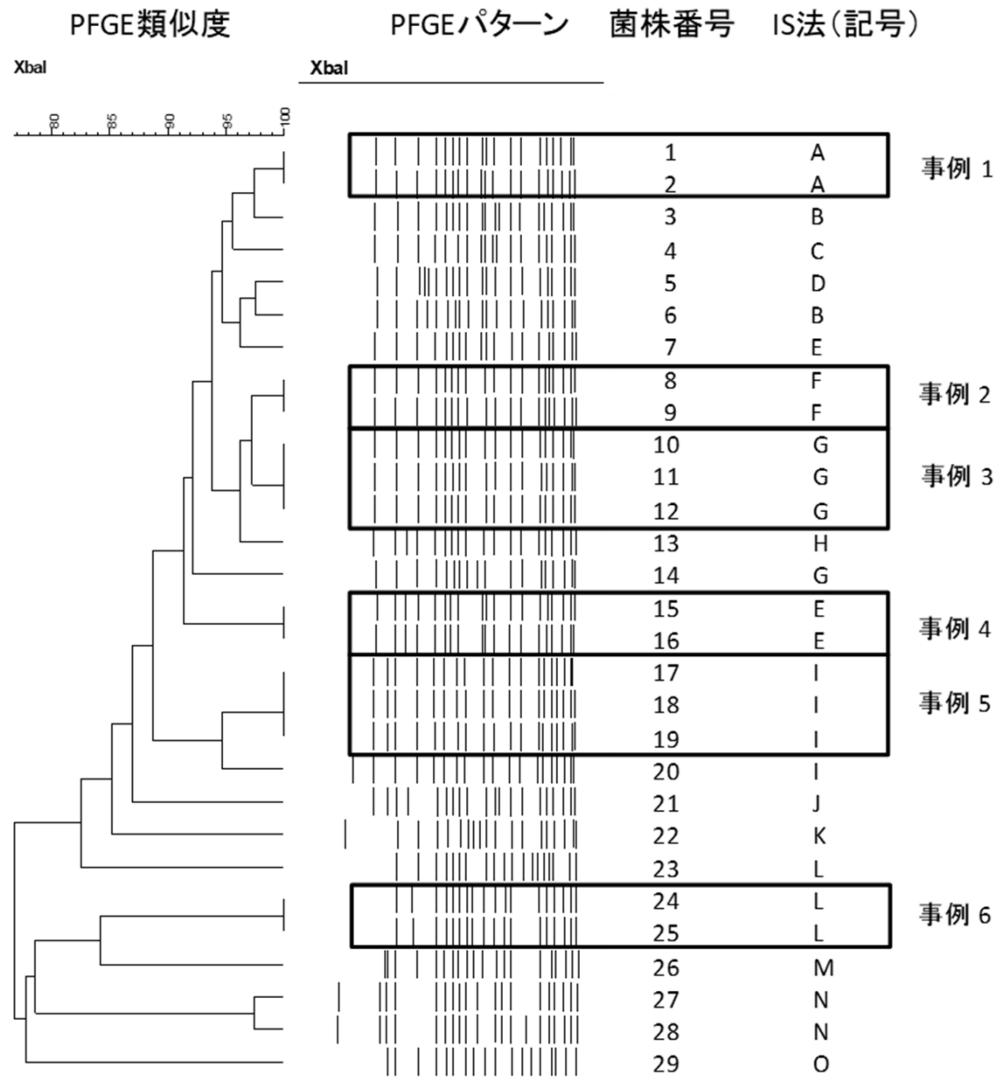


図 1 EHEC O157(VT1&2) 29株の遺伝子解析結果

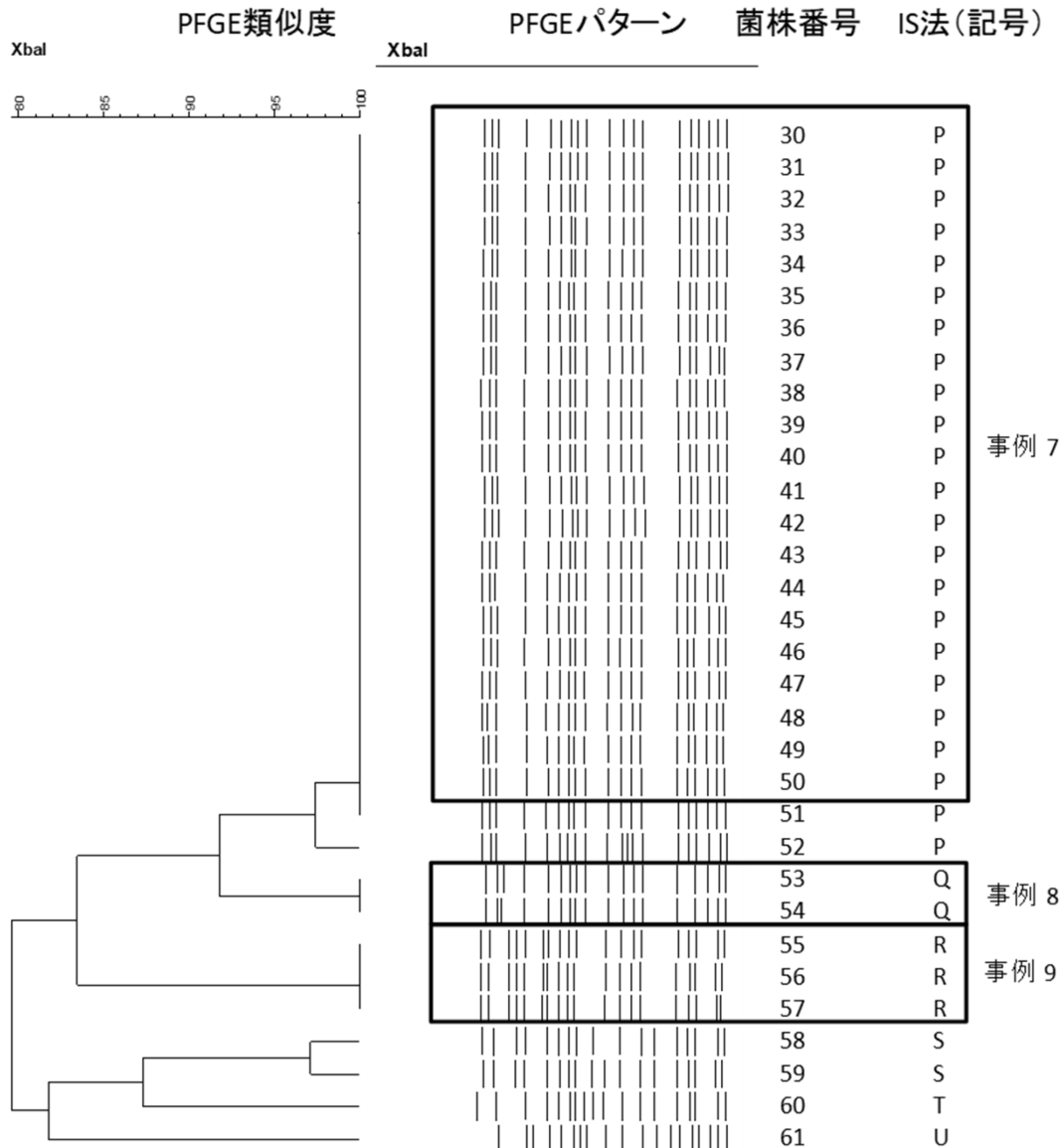


図2 EHEC O157(VT2) 32株の遺伝子解析結果

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については、IS-printing system (TOYOBO) を併せて行い、付属の説明書に従ってPCR法を実施した後、32箇所の遺伝子の有無により菌株の識別を試みた。菌株数の多いO157(VT1&2)、O157(VT2)およびO26(VT1)について、PFGEパターン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あるいは家族内感染等の疫学的関連が認められた場合は1つの事例として図中に示した(図1-3)。また、IS法の結果をパターンごとに記号で表記した。

O157(VT1&2) 29株の遺伝子解析の結果、事例1、3、5および6は家族内事例の分離株であり、PFGEおよびIS法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)。菌株No.20は事例5の同一家族から分離された株であり、IS法の遺伝子パターンは一致していたが、PFGEでは遺伝子パターンの類似度は高いものの、バンド2本分が異なっていた(類似度約95%)。事例2および4は、PFGEおよびIS法の遺伝子パターンは事例ごとにそれぞれ一致していたが、共通食品の喫食等、疫学的な関連は認められなかった。

O157(VT2) 32株については、事例7とした22株は関東地方を中心に広く分離された菌株と遺伝子解析の結果が一致する菌株であった(図2)。さらに、このうち食品由来の2株は、ある民間施設において昼食として提供された食品から分離され、施設利用者は喫食により感染した可能性が考えられたが、同一施設の利用者で当該食品を喫食していない患者も確認されたことから、菌分離され

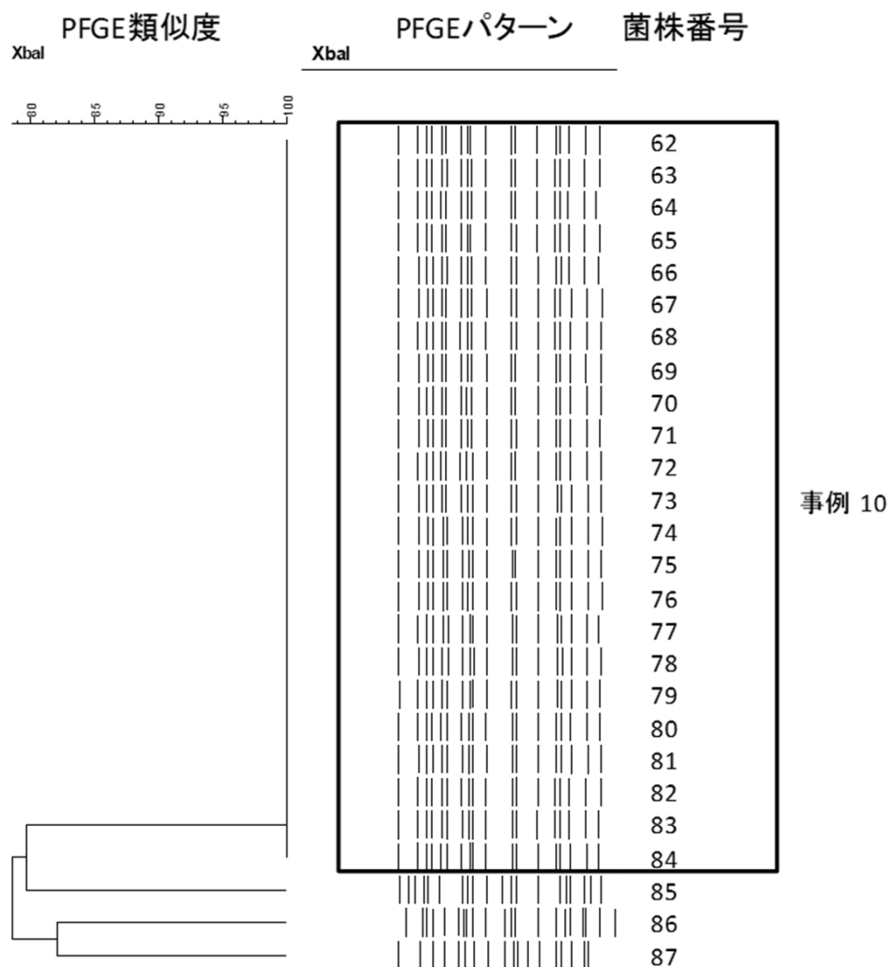


図3 EHEC O26(VT1) 26株の遺伝子解析結果

た食品が原因とは断定されなかった。そのほか菌株No.52, 53および54は、PFGEでは上記22株との類似性が95%以上を示し、菌株No.52はIS法の遺伝子パターンも一致していた。今回のような広範囲にわたる地域で遺伝子パターンが一致あるいは類似度が高い菌株が分離されたことについては、他の自治体においても患者の疫学的な調査が行われたが、感染源および感染経路の特定には至らなかった。事例8の菌株No.53およびNo.54が分離された患者あるいは事例9におけるNo.56およびNo.57が分離された患者らは、疫学情報から各家庭における感染が疑われたが、事例9のNo.55が分離された患者は、PFGEパターンが一致するNo.56およびNo.57が分離された患者とは互いに血縁関係や知人ではなく、共通食品の喫食等、疫学的な関連は認められなかった。

O26(VT1) 26株の遺伝子解析の結果、県域の保育施設における集団感染事例において患者および家族等の接触者から分離された23株のPFGEパターンはすべて一致していた(図3)。

次に、EHEC 91株について、CLSI (米国臨床検査標

準化協会) 法²⁾ に準拠して薬剤感受性試験を実施した。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)、スルファメトキサゾール・トリメトプリム合剤(ST)およびテトラサイクリン(TC)]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、中間、感受性に分けて判定した(表3)。4剤および3剤に耐性を示したO157(VT1&2)の2株は、いずれも散発的な事例で分離された菌株であった。2剤耐性を示したO157(VT1&2)の2株は、図1の事例6とした家族内感染の分離株であった。保育施設における集団事例の分離株であるO26(VT1) 23株は、すべて遺伝子型は一致していたものの、1株がABPCに耐性、2株が3剤あるいはFOM, SMの2剤に対し中間を示し、さらに、5株がFOM単剤、3株がSM単剤に対し中間を示すなど、薬剤耐性パターンと遺伝子パターンは一致しなかった。図2の事例7とした22株では、CPに中間を示した2株お

表3 EHEC 91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, SM, ST TC	O157 VT1&2	1
	3剤 ABPC, SM, ST	O157 VT1&2	1
	2剤 SM, TC	O157 VT1&2	2
	単剤 ABPC	O26 VT1	1
中 間	3剤 CP, FOM, SM	O26 VT1	1
	2剤 FOM, SM	O26 VT1	2
		CP, FOM	1
	ABPC	O157 VT1&2	2
		O103 VT1	1
	CP	O157 VT2	2
		O157 VT1&2	1
	FOM	O26 VT1	5
		SM	11
	単剤	O26 VT1	4
		O157 VT1&2	3
		O121 VT2	1
		O8 VT1&2	1
感 性			51
計			91

よびSMに中間を示した11株中 5 株がこれに含まれ、その他の15株は今回試験した12薬剤に対してすべて感受性であった。

平成29年度は、上述したとおり関東地方を中心に遺伝子パターンが一致するO157(VT2)が分離され、県域では

患者由来20株、食品由来 2 株が確認された。これらの感染源および感染経路は特定されていないが、原因究明に向けて今後も遺伝子解析を実施し、同一あるいは類似する遺伝子型の菌株の分離状況を注視しなければならない。さらに、県域内の保育施設でO26(VT1)による集団感染事例が発生し、児童とその家族から菌が分離され、6 家族を含む23名まで感染が拡大したことが確認された。感染拡大の防止に向け、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必要と考える。

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）において実施した。

最後に、ご協力を頂きました各医療機関、医療検査機関、衛生研究所地域調査部および菌株搬入にご尽力いただきました各保健福祉事務所、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

感染性胃腸炎患者からの原因ウイルス
検出状況（平成29年度）

鈴木理恵子，高橋淳子，近藤真規子，黒木俊郎*

Surveillance of viral gastroenteritis
in Kanagawa Prefecture
(April, 2017－March, 2018)

Rieko SUZUKI, Junko TAKAHASI,
Makiko KONDO and Toshiro KUROKI

我々は、感染症予測監視事業の一環として、感染性胃腸炎の原因ウイルスを把握する目的で、神奈川県域（川崎市、横浜市、横須賀市、相模原市及び藤沢市を除く）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

に乳幼児にみられる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。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、C群ロタ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29年4月から平成30年3月に感染性胃腸炎と診断された患者便72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PCR1)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ス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。72検体中45検体から50株の原因ウイルスが検出され、その内訳は、ノロウイルス23株（46.0%）、アデノウイルス10株（20.0%）、アストロウイルス7株（14.0%）A群ロタウイルス7株（14.0%）、サポウイルス3株（6.0%）で、C群ロタウイルスは検出されなかった。ノロウイルスは6歳以下と23歳以上の年齢層、サポウイルスとアデノウイルスは

表1 年齢別ウイルス検出状況（平成29年4月～平成30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	
			GⅠ ¹⁾	GⅡ ²⁾						
6歳以下	53	37 ³⁻⁶⁾	0	17	3	6	10	6	0	42
7歳～12歳	4	2	0	0	0	1	0	1	0	2
13歳～22歳	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
23歳～64歳	7	1	0	1	0	0	0	0	0	1
65歳以上	8	5	0	5	0	0	0	0	0	5
合計	72	45	23 (46.0)		3 (6.0)	7 (14.0)	10 (20.0)	7 (14.0)	0	50 (100)

1：genogroup I
2：genogroup II
3：複数ウイルス検出 2例（ノロウイルスGⅡ，アデノウイルス）
4：複数ウイルス検出 1例（ノロウイルスGⅡ，アストロウイルス）
5：複数ウイルス検出 1例（ノロウイルスGⅡ，A群ロタウイルス）
6：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）

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 岡山理科大学 獣医学部

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	
	GⅠ ¹⁾	GⅡ ²⁾						
平成29年 4月	0	1 ³⁾	0	4 ³⁾	3	2	0	10
5月	0	0	0	3 ³⁾	3 ³⁾	0	0	6
6月	0	1	0	0	0	0	0	1
7月	0	3	1	0	1	0	0	5
8月	0	5	0	0	1	0	0	6
9月	0	2	0	0	0	0	0	2
10月	0	1	0	0	0	0	0	1
11月	0	5 ³⁾	0	0	1 ³⁾	1 ³⁾	0	7
12月	0	2 ³⁾	0	0	1 ³⁾	1	0	4
平成30年 1月	0	0	0	0	0	0	0	0
2月	0	2	1	0	0	1	0	4
3月	0	1 ³⁾	1	0	0	2 ³⁾	0	4
小計	0	23						
合計	23		3	7	10	7	0	50

1: genogroup I

2: genogroup II

3: 複数ウイルス検出例を含む

表3 ノロウイルス遺伝子型別状況

年 月	型別実施数	遺伝子型		
		G II. 2	G II. 4	G II. 5
平成29年 4月	1		1	
5月				
6月	1		1	
7月	3		3	
8月	5		5	
9月	2		2	
10月	1		1	
11月	5		5	
12月	2		2	
平成30年 1月				
2月	2	2		
3月	1			1
合計	23	2	20	1

6歳以下、アストロウイルスとA群ロタウイルスは6歳以下と7歳～12歳から検出された。また、複数ウイルスが検出された5検体はいずれも6歳以下からの検体で、検出ウイルスはノロウイルスG IIとアデノウイルスが2例、ノロウイルスG IIとアストロウイルス、ノロウイルスG IIとA群ロタウイルス、アストロウイルスとアデノウイルスが1例ずつであった。

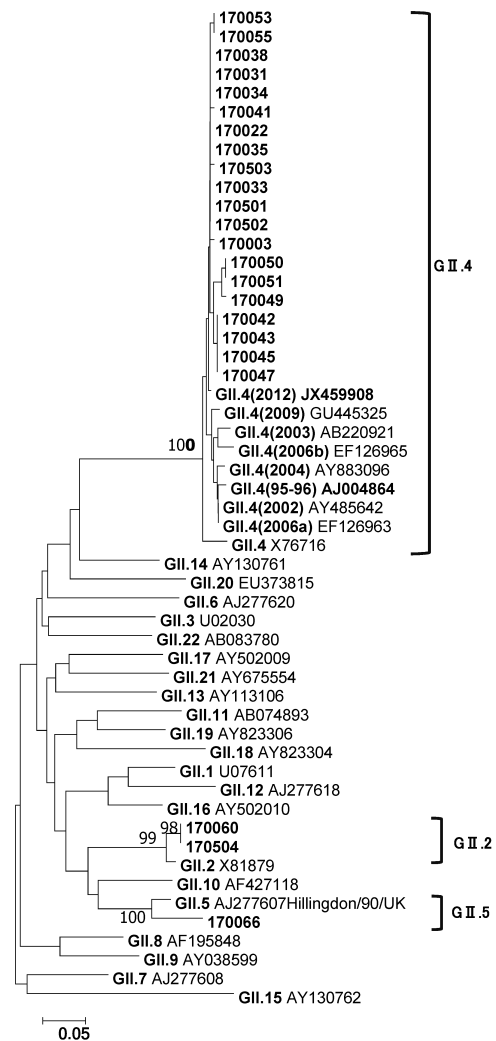


図1 ノロウイルスG II capsid領域の系統樹 (275bp)

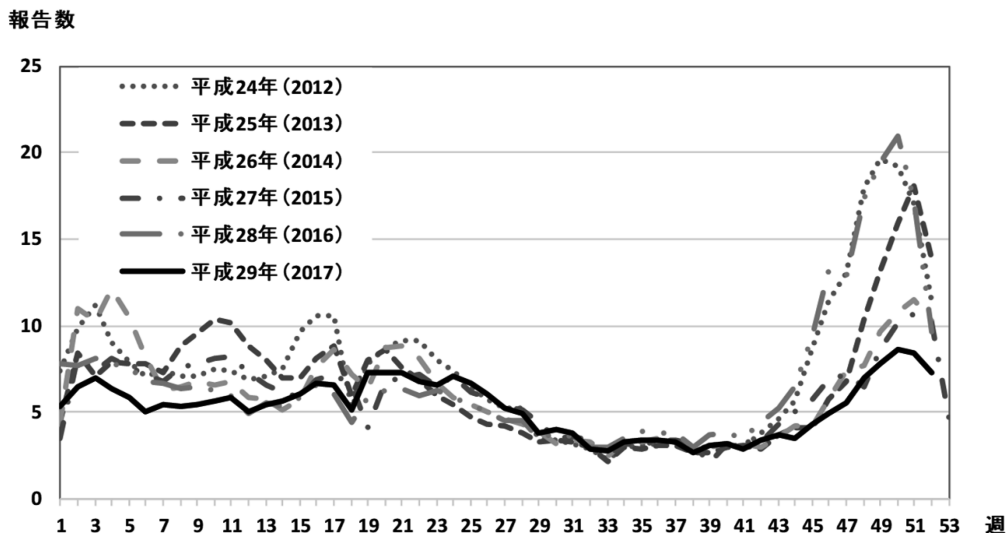


図2 感染性胃腸炎患者定点あたりの報告数（全国）

月別のウイルス検出状況を表2に示した。例年、ウイルスの検出は秋期から冬期に多い傾向であるが、平成29年度の検出状況は例年とは異なり、1月を除くすべての月でウイルスが検出された。ノロウイルスは通年、アストロウイルスは春期、アデノウイルスは春期から秋期、A群ロタウイルスは春期、秋期から冬期に検出された。

平成29年度に検出されたノロウイルス23株のgenogroupはすべてGⅡであり、これらのcapsid領域の遺伝子型別及び系統樹を表3及び図1に示した。ノロウイルスGⅡの遺伝子型はGⅡ.1からGⅡ.22の22種類に分類される。遺伝子型別の結果、23株中GⅡ.4が20株（87%）で最も多く、その他GⅡ.2が2株、GⅡ.5が1株であった。

GⅡ.4の20株は、平成24年に報告されたGⅡ.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GⅡ.4変異型であったが、平成27年度はGⅡ.17変異型、平成28年度はGⅡ.2変異型、平成29年には再びGⅡ.4変異型に入れ替った。GⅡ.4変異型は、本県でも平成24年から毎年検出され、平成29年度には4月、6月から12月に連続して検出され主要流行株となった。

平成29年の全国の感染性胃腸炎患者数は、例年より低く推移した（図2）。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が、平成29年度は、新たな変異型の出現は見られず、過去の流行株であるGⅡ.4変異型が主要流行株であったこと、さらに予防対策の周知などが患者数の減少の要因としてあげられる。ノロウイルスによる感染性胃腸炎の流行は、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することや、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、その流行規模を抑えることが可能になる。

その他の検出されたウイルスの遺伝子型は、アデノウイルス10株は、41型が6株、2型及び3型が2株ずつ、アストロウイルス7株は1型、A群ロタウイルス7株はG3P[8]型で、サポウイルスはGⅠ.2が2株、GⅠ.1が1株であった。

我々は、平成23年度以降、検出数の多かったウイルスについて系統樹解析（NJ法）により、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) 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)

資料

ヒスタミンが原因と疑われる
有症苦情事例

脇ますみ, 甲斐茂美, 福光徹, 林孝子, 関戸晴子

Cases of histamine food poisoning

Masumi WAKI, Shigemi KAI, Toru FUKUMITSU,
Takako HAYASHI and Haruko SEKIDO

化学物質を原因とした食中毒や有症苦情事例は、全国で毎年発生しており、その主な原因物質はヒスタミンである^{1,2)}。当所管内においても、ヒスタミンが原因と疑われる有症苦情事例は毎年数件発生しており、平成23年以降は、高速液体クロマトグラフ-タンデム型質量分析計(LC-MS/MS)を用いて検査を実施し、これらの事例に対応してきた。本資料では、今後の検査の参考とするため、平成23年以降に発生した有症苦情事例のうち3事例について、報告する。

事例1

「さばみりん干し（3枚入）を購入後、自宅冷蔵庫で1日保管し、翌日調理して2名で喫食したところ、うち1名は舌がピリピリして、その後腕が痒くなり、もう1名も舌への刺激を感じた。」との連絡が保健福祉事務所にあり、喫食残品及び加熱調理前残品の2検体が搬入され、ヒスタミンの検査を実施した。検体はそれぞれ細切均一化後、検査用試料とした。試料を0.1mol/l塩酸で抽出、陽イオン交換ミニカラムで精製後、試験溶液とし、LC-MS/MSで測定した（図1）。測定にはAgilent社製1100シリーズ及びApplied Biosystems社製API3000を用い、測定条件は、カラム：ZIC-HILIC（内径2.1mm×長さ150mm、粒子径3.5μm）、移動相：0.1% ぎ酸・アセトニトリル・メタノールのグラジエント、流速：0.2ml/min、カラム温度：40℃、注入量：5μl、イオン化法：ESI (positive)、測定イオン：m/z112→95（定量イオン）及びm/z112→68（確認イオン）とした。その結果、喫食残品から177mg/100g、加熱調理前残品から137mg/

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

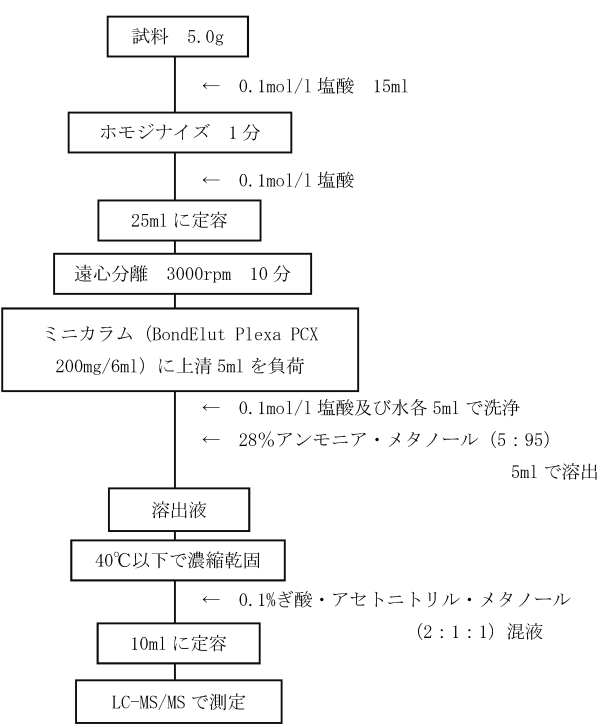


図1 ヒスタミン検査法

100gのヒスタミンが検出された。

ヒスタミンは、濃度5mg/100g以下は安全域であるが、5～10mg/100gでは感受性が高い場合には食中毒を生じる可能性、10～100mg/100gでは食中毒を生じる可能性があり、100mg/100g以上では食中毒を生じる可能性が高く、重篤な症状を呈する³⁾と言われている。本事例の喫食残品及び加熱調理前残品から検出されたヒスタミンは、食中毒を生じる可能性が高いとされる濃度を超えており、また喫食者が呈した症状からも、ヒスタミンが原因物質である可能性が高いと考えられた。

事例2

「かじき西京漬けを購入後、自宅冷蔵庫で1日保管し、翌日調理して2名で喫食したところ、飲み込んだ後に、のど、口内及び胃部に熱い刺激を感じ、うち1名については、その後も違和感が続いている。」との連絡が保健福祉事務所にあり、苦情品（喫食残品）及び苦情品と同日に納入された店舗在庫品の2検体が搬入された。事例1と同様の方法で検査を実施したところ、喫食残品からは326mg/100g、在庫品からは1mg/100gのヒスタミンが検出された。喫食残品から検出されたヒスタミンの濃度は、食中毒を生じる可能性が高いとされる100mg/100g³⁾の3倍以上と高濃度であり、喫食者が感じたのどの刺激なども、ヒスタミンによる症状に類似していたことから、原因物質はヒスタミンの可能性が高いと考えられた。し

かし、店舗在庫品からは食中毒を生じる可能性のある濃度のヒスタミンは検出されず、また保健福祉事務所によるその後の調査において、同様の健康被害の発生が確認されなかったことから、ヒスタミンの関連は疑われたものの、原因の特定には至らなかった。

事例3

「夜に子供2名の唇が腫れてきたが、翌日も1名の症状が改善されず、医療機関を受診したところ、アレルギーではないかと言われ、抗アレルギー剤の内服薬と塗り薬を処方された。本人は前日の給食を食べた際にひりひりしたと感じ、その旨を担任に申し出たと言っていた。」との連絡が保健福祉事務所にあった。給食を提供していた学校の教諭及び児童に対し、保健福祉事務所が調査を実施したところ、教諭では給食に異常を感じた者はいなかったが、児童145名が給食を食べた際にひりひりと感じたと回答し、うち15名には症状の継続が確認されたことから、給食で提供された食品のうち、原材料4品目（こんにゃく、ほうれんそう、ごぼう及びさといも）、調理品2品目（おひたし及びけんちん汁）、調理せずに提供された食品3品目（納豆、納豆のたれ及びカット済みバナナ）について、ヒスタミンを含む揮発性アミン類の検査を実施した。納豆のたれを除く検体はそれぞれ細切均一化後、納豆のたれはそのままを検査用試料とした。試料を0.2% ぎ酸で抽出、陽イオン交換ミニカラムで精製後、試験溶液とし、LC-MS/MSで測定した（図2）。測定にはWaters社製H-class及びXevo TQ MSを用い、測定条件は、移動相：0.1% ぎ酸及びアセトニトリルのグラジエント、その他は事例1と同様とした。その結果、ほうれんそうからは1mg/100g、おひたしからは2mg/100g、納豆のたれからは3mg/100gのヒスタミンが検出された。しかし、いずれも安全域である5mg/100g未満³⁾であり、児童が感じた症状の原因物質がヒスタミンである可能性は低いと考えられた。本検体については、ヒスタミンのほか、揮発性アミン類であるカダベリン、チラミン、トリプタミン、フェネチルアミン及びブトレシン、喫食時に口内の痛みの原因となるシュウ酸カルシウムについても併せて検査を実施したが、いずれも問題となる量は検出されず、また、洗浄剤や次亜塩素酸ナトリウムの取扱いも適正に行われており、これらの取り違いなどによる事故が発生する可能性も低いと考えられ、原因の究明には至らなかった。

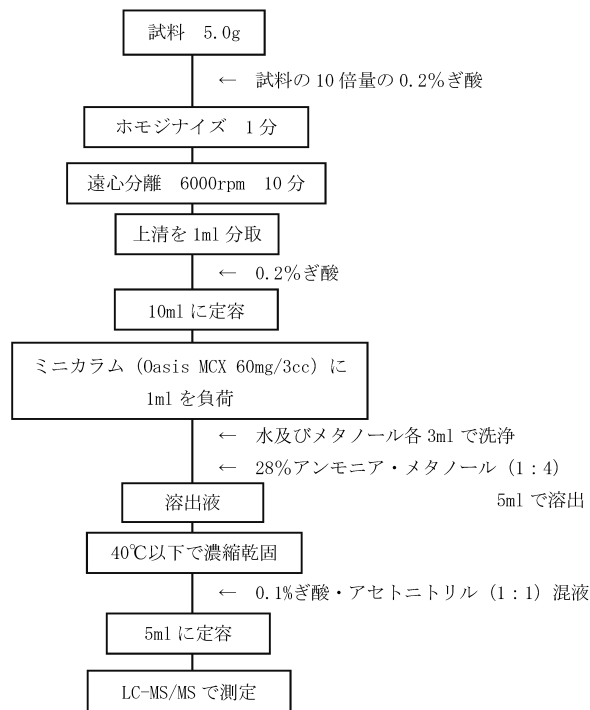


図2 揮発性アミン類検査法

今回の報告では、食中毒を生じる可能性が高い濃度のヒスタミンが検出されたが、原因の特定に至らなかった事例や、ヒスタミンによる症状に類似の症状を呈していたが、問題となる濃度のヒスタミンや化学物質は検出されず、原因不明となった事例があった。今後は、さらに検査体制を強化するとともに、保健福祉事務所と協力しながら有症状事例や食中毒に対応し、原因究明に努めていきたい。

文献

- 1) 厚生労働省：食中毒統計資料
 <http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryoku/shokuhin/syokuchu/04.html#j4-3>
- 2) 厚生労働省：ヒスタミンによる食中毒について
 <<http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000130677.html>>
- 3) 登田美桜, 山本都, 畝山智香子, 森川馨：国内外におけるヒスタミン食中毒, 国立医薬品食品衛生研究所報告, 127, 31-38 (2009)

他誌掲載論文抄録

(平成29年4月～平成30年3月)

Ribavirin inhibits Zika virus (ZIKV) replication in vitro and suppresses viremia in ZIKV-infected STAT1-deficient mice.

Naganori Kamiyama N, Ryusuke Soma, Shinya Hidano, Kei Watanabe, Hiroshi Umekita, Chiaki Fukuda, Kaori Noguchi, Yoshiko Gendo, Takashi Ozaki, Akira Sonoda, Nozomi Sachi, Lucky Ronald Runtuwene, Yumako Miura, Etsuro Matsubara, Shigeru Tajima, Tomohiko Takasaki, Yuki Eshita, Takashi Kobayashi, *Antiviral Research*. 146:1-11 (2017)

フランス領ポリネシアからのチクングニア熱輸入症例の患者は現地に居住していて帰国し、2015年1月に関節痛、発熱、筋肉痛をきたしチクングニア熱と診断された。詳しく聴取するとフランス領ポリネシアでジカウイルス病が流行していた1年前の1月にも比較的軽症のよく似た症状があったとのことで、血清学的に診断したところ、ジカウイルス特異的IgM抗体が判定保留（陰性領域）、ジカウイルス中和抗体陽性であり、ジカウイルスに感染していたことが確認された症例に関して報告した。

Detection of Virus-Antibody Immune Complexes in Secondary Dengue Virus Infection.

Moi ML, Takasaki T, Kurane I, *Methods Mol Biol*.1604:331-337(2018)

デング熱の重症化に関与する「抗体依存性感染増強効果（ADE）」を測定するための方法について詳述した成書である。BHK細胞にFcγレセプター遺伝子を組み込んだFcγ-BHK細胞とオリジナルなBHK細胞を用いてプラーク減少法により中和抗体価を測定し、その抗体価の差によりADEを引き起こす能力の検査方法を示した。

Development of a Japanese encephalitis virus-like particle vaccine in silkworms using codon-optimised prM and envelope genes.

Sayaka Matsuda, Reiko Nerome, Kenichi Maegawa, Akira Kotaki, Shigeo Sugita, Kazunori Kawasaki, Kazumichi Kuroda, Ryoji Yamaguchi, Tomohiko Takasaki, Kuniaki Nerome, *Heliyon*.

2017 Apr 11;3(4):e00286(2017)

日本脳炎ウイルスの構造遺伝子であるprMおよびE遺伝子をカイコの遺伝子に組み込み、カイコに自分の遺伝子であると誤認識させることで、そのカイコが産生したマユに含まれるウイルス遺伝子や内部構造を有しない非感染性の日本脳炎ウイルス様粒子を抽出・精製する方法を確立した。さらにマユから得られた日本脳炎ウイルス様粒子は、日本脳炎ウイルス同様の抗原性を有することを明らかにした。カイコは大量のマユを作ることから本法はワクチン製造に応用できることが期待される。

Utility of Japanese encephalitis virus subgenomic replicon-based single-round infectious particles as antigens in neutralization tests for Zika virus and three other flaviviruses.

Atsushi Yamanaka, Meng Ling Moi, Tomohiko Takasaki, Ichiro Kurane, Mami Matsuda, Ryosuke Suzuki, Eiji Konishi, *J Virol Methods*.243:164-171(2017)

日本脳炎ウイルスの構造遺伝子prM+E領域を組み込んだプラスミドと構造遺伝子Cおよび非構造遺伝子NS1-NS5を組み込んだプラスミドを297T細胞に導入することで、一回感染性の粒子が形成される発現系（SRIP: single-round infectious particles）を確立した。このprM+Eをジカウイルス、Sepik virus, Wesselsbron virus, and Usutu virusのprM+E遺伝子に変えることによってプラーク減少法による中和抗体測定が安全に実施でき、それぞれの生ウイルスを用いたものと同等に結果が得られることが確認された。

Neutralizing and enhancing antibody responses to five genotypes of dengue virus type 1 (DENV-1) in DENV-1 patients.

Yamanaka A, Moi ML, Takasaki T, Kurane I, Konishi, E. *J Gen Virol*. 98(2):166-172(2017)

デングウイルス（DENV）は、4つの異なる血清型を有し、各血清型はさらに4～6の遺伝子型に分類される。そこでヒトにおけるDENV-1に対する中和抗体応答に対する遺伝子型の影響を調べた。DENV-1の初感染患者の

回復期血清を、5つのDENV-1遺伝子型（GI-GV）に対する中和抗体価を測定した。遺伝子I型（GI）および遺伝子IV型（GIV）に感染した患者の両方において、5つの遺伝子型に対するそれらの中和抗体価は、同種異型反応と比較して4倍以内と有意な差はなかった。5つの遺伝子型に対する感染増強抗体価も同様に有意な差はなかった。したがって、DENV-1の遺伝子型株は、これらの患者において遺伝子型の異なる抗原に対して有意な差を認めずGIまたはGIV由来のワクチン抗原が、すべてのDENV-1遺伝子型に対して同等のレベルの中和抗体を誘導することを示唆している。

Characterization of large and small-plaque variants in the Zika virus clinical isolate

ZIKV/Hu/S36/Chiba/2016.

Kato F, Tajima S, Nakayama E, Kawai Y, Taniguchi S, Shibasaki K, Taira M, Maeki T, Lim CK, Takasaki T, Saijo M, Sci Rep. 7(1):16160 doi:10.1038/s41598-017-16475-2. 2017.

フィジーからの輸入症例から分離されたジカウイルス ZIKV (ZIKV/Hu/S36/ Chiba/2016) は大小2種類のプラークを形成した。プラーククロニングしたそれぞれのゲノム解析は、小さなプラークを形成するクローンが一般に位置796（アミノ酸配列において230Gln）にアデニンヌクレオチドであるが、大きなプラークを形成するクローンはグアニンヌクレオチド（230Arg）でこの相違がプラークの大きさの違いと関連することを示唆している。大きなプラーククローンの増殖速度は、Vero細胞の小さなプラーククローンの増殖速度よりも速かった。G796A変異ミセンスを有する組換えZIKV G796A / rZIKV-MR766は、ZIKV MR766株rZIKV-MR766 / pMW119-CMVPの感染性分子クローンにより作製した。G796AはVero細胞における増殖速度を低下させ、さらにIFNAR1ノックアウトマウスにおけるMR766株の病原性を弱めた。これらの結果は、Mタンパク質配列中に位置するウイルスポリタンパク質における位置230のアミノ酸変異が、ZIKVのマウスにおけるプラーク形態、成長特性およびビルレンスの分子決定因子であることを示している。

Marmosets (*Callithrix jacchus*) as a non-human primate model for evaluation of candidate dengue vaccines: induction and maintenance of specific protective immunity against challenges with clinical isolates.

Moi ML, Ami Y, Muhammad Azami NA, Shirai K, Yoksan S, Suzaki Y, Kitaura K, Lim CK, Saijo M,

Suzuki R, Takasaki T, Kurane I, J Gen Virol. 98(12):2955-2967(2017)

デングウイルス（DENV）に対するワクチン開発は急務である。我々はすでに初感染および再感染のデング熱研究のための動物モデルとしてのマーモセットの有用性を報告した。さらにDENV感染でヒトのデング熱類似のウイルス動態および抗体動態を示すマーモセットのワクチン効果評価のための有用性についてワクチン候補株を用いて検討した。マーモセットにワクチン候補弱毒ウイルスおよび親株を接種し、その後、臨床分離株を接種して評価した。マーモセットは弱毒ワクチン感染では、すべての個体でウイルス血症は低かった。臨床分離株接種後、ウイルス血症は検出されずIgM抗体応答は遅延したが、IgG抗体は急速に上昇し、再感染抗体応答パターンを示した。同型血清型に対してはより高い中和活性を示した。ウイルス血症検出および抗体応答は、ヒトのDENV感染およびワクチンの応答と一致したことから、ワクチン開発のための動物モデルとしてマーモセットの有用性明らかとなった。

Hirsutine, an Indole Alkaloid of *Uncaria rhynchophylla*, Inhibits Late step in Dengue Virus Lifecycle.

Takayuki Hishiki, Fumihiko Kato, Shigeru Tajima, Kazufumi Toume, Masahito Umezaki, Tomohiko Takasaki, Tomoyuki Miura, Front Microbiol. 30;8:1674.doi:10.3389/fmicb.2017.01674. eCollection (2017)

新規抗デングウイルス（DENV）剤を同定するために、生薬（漢方薬）由来の95化合物および120抽出物のライブラリーを分析した。一次スクリーニングでは、DENV-1を感染させたA549細胞を各化合物（最終濃度10 μ M化合物）および抽出物（最終濃度100 μ M）の存在下で培養し、DENVフォーカス形成の減少で評価した。次に、3-（4,5-ジメチルチアゾール-2-イル）-2,5-ジフェニルテトラゾリウムブロマイドアッセイを用いて細胞傷害性化合物および抽出物を除外した。その結果*Uncaria rhynchophylla*のインドールアルカロイドであるヒルスチンは、高い有効性と低い細胞傷害性を示す強力な抗DENV化合物であると同定された。薬物添加時間および薬物排泄時間アッセイでは、ヒルスチンがウイルス粒子の集合、出芽、または放出ステップを阻害するが、ウイルスの翻訳および複製段階は阻害しないことが示された。ヒルスチンは、新規なDENV阻害剤である。

A summary of the imported cases of Chikungunya

fever in Japan from 2006 to June 2016.

Eri Nakayama, Tajima S, Kotaki A, Shibasaki KI, Itokawa K, Kato K, Yamashita A, Sekizuka T, Kuroda M, Tomita T, Saijo M, Takasaki T, J Travel Med. 25(1). doi: 10.1093/jtm/tax072 (2018)

2006年から2016年に国立感染症研究所でチクングニア熱輸入症例から分離したチクングニアウイルス(CHIKV)分離株の系統発生解析により、インドネシア、アンゴラ、キューバにおけるチクングニア熱流行の状況を推定することができた。日本はまだCHIK熱の国内発生を経験していないが、特に媒介蚊活動期に、輸入症例に端を発して地域伝播によるCHIKVの将来の国内侵入の可能性を考慮すべきである。チクングニア熱輸入症例のモニタリングと報告は、世界的な流行の状況を把握し、チクングニア熱の認知を促進し、国内発生した場合のチクングニア熱を早期に探知するのに有用である。

Evaluation of *Macaca radiata* as a non-human primate model of Dengue virus infection.

Kato F, Ishida Y, Kawakami A, Takasaki T, Saijo M, Miura T, Hishiki T, Sci Rep. 8(1):3421 (2018)

ヒトに近い旧世界ザルのなかで有用なデングウイルス(DENV)感染モデルはまだない。旧世界ザルであるボンネットサル(*Macaca radiata*)のデングウイルス感染病態を検討した。この研究では、いくつかのDENV株の増幅量をボンネットサルの末梢血単核細胞を用いて評価した。その結果、2009年にインドから帰国した旅行者から隔離されたDENV-4/09-48株は、高度に複製可能なウイルスであった。そこでボンネットサル3個体に09-48株を感染させ、抗体反応を評価した。DENV非構造タンパク質NS1抗原が検出され、高いウイルス血症が観察された。これらの結果は、ボンネットサルおよび09-48株の組み合わせがデングウイルス霊長類モデルとして使用できることを示した。

Dengue Virus Infection in *Aedes albopictus* during the 2014 Autochthonous Dengue Outbreak in Tokyo Metropolis, Japan.

Kobayashi D, Murota K, Fujita R, Itokawa K, Kotaki A, Moi ML, Ejiri H, Maekawa Y, Ogawa K, Tsuda Y, Sasaki T, Kobayashi M, Takasaki T, Isawa H, Sawabe K, Am J Trop Med Hyg. 98(5):1460-1468 (2018)

2014年の国内デング熱流行に関連して、東京都で収集された蚊からデングウイルス(DENV)の分離株とエンペロープ遺伝子全体およびコード配列全体の両領域に基

づく患者由来分離株を比較解析し系統発生関係を検討した。2014年に8月から10月に東京都でDENV感染疑いが疑われた6ヵ所で、2,298頭の雌および956頭の雄の蚊を集め、ウイルスゲノムの検出およびDENV分離のためにそれぞれ124プールおよび35プールに分けた。DENV遺伝子は、49の雌プールからのPCRを用いて検出した。C6/36およびVero細胞を用いて16の分離株を得た。最低感染率(11.2~66.7)の高値は9月中旬まで持続した。すべてのDENV分離株は血清型1(DENV-1)の遺伝子型Iに属し、その配列は2014年に東京都近郊の患者から分離されたDENVの配列と99%以上の相同性を示した。ヒトスジシマカは主要なDENV媒介蚊であり、2014年一種類のDENV-1株が流行した。2015年4月には2014年の雄性蚊および野生の幼虫からデングウイルスは検出されなかった。したがって、DENVの垂直伝達と越冬の可能性は低いことが明らかになった。

Genotype-specific and cross-reactive neutralizing antibodies induced by dengue virus infection: detection of antibodies with different levels of neutralizing activities against homologous and heterologous genotypes of dengue virus type 2 in common marmosets (*Callithrix jacchus*).

Azami NAM, Moi ML, Ami Y, Suzaki Y, Lim CK, Taniguchi S, Saijo M, Takasaki T, Kurane I, Virology Journal 15(1):51. doi: 10.1186/s12985-018-0967-x (2018)

初感染でデングウイルス2型(DENV-2)コスモポリタン遺伝子型を接種されたマーモセットでは、中和抗体が3つの遺伝子型を中和し、アジアI遺伝子型に対する力価は同種のコスモポリタン遺伝子型より有意に高かった。DENV-2感染後の異種遺伝子型による再感染では、アジア/アメリカ遺伝子型に対する中和抗体力価は、コスモポリタン系およびアジア系の遺伝子型よりも有意に高かった。DENV-2アジアIおよびコスモポリタン遺伝子型に続くDENV-1による3次感染後、アジア/アメリカ遺伝子型に対する中和抗体力価も、コスモポリタンおよびアジアI遺伝子型に対する中和抗体力価よりも有意に高かった。初感染、二次および三次感染後に様々なレベルの中和抗体が可変DENV-2遺伝子型に対して誘導され、異種遺伝子型に対する中和抗体価は血清型内の相同遺伝子型よりも高かった。これらの結果は、感染遺伝子型の異種および同種であることによって、感染後に誘導される中和抗体価および交差反応性に影響することを示唆する。すなわちワクチン株選定において特定の遺伝子型がその有効性に関して有利であることを示唆した。

試験管内でセレクションされたニューキノロン耐性

Mycoplasma pneumoniae

大屋日登美, 古川一郎, 相川勝弘 (神奈川衛研), 大石智洋 (川崎医科大学), 堀野敦子, 見理剛 (国立感染症研究所), 小田洋一郎 (茅ヶ崎市立病院), 成田光生 (札幌徳洲会病院), 黒木俊郎 (神奈川衛研), 日本マイコプラズマ学会雑誌, 44, 45-48 (2017)

フルオロキノロン系 (FQs) 薬剤に対する *Mycoplasma pneumoniae* の耐性化を調べるため, FQsは3薬剤, 5濃度で, 標準株3株と臨床分離株100株を用いて耐性菌のセレクション試験を実施した. 検出された耐性菌は, FQ耐性に関与するジャイレースおよびトポイソメラーゼ領域のアミノ酸配列の変異を調べた.

その結果, 103株中60株由来67株のFQ耐性菌がセレクションされた. LVFXは103株中60株 (58.3%), SPFXでは103株中6株 (5.8%), GFLXでは103株中1株 (1%) と, LVFXでセレクションされた耐性株が最も多く, 次いでSPFX, GFLXであった. これらの耐性株は, いずれも感受性株に比較してMIC値が上昇していたが低濃度であった. また, 転培を繰り返すことによって, MIC値が高くなる傾向があった.

FQ耐性株について, *gyrA*, *parC* 領域のアミノ酸配列の変異を確認した. この結果, *gyrA* 変異株が3株, *parC* 変異株が5株, *gyrA*, *parC* 両方に変異がある株が2株確認できた. *gyrB* の変異株が1株確認でき, *gyrB* 変異株は *parC* にも変異がみられた. なお, *parE* の変異はみられなかった.

器具・容器包装における蒸発残留物試験の試験室間共同試験 (第1報)

大野浩之 (名古屋市衛研), 六鹿元雄 (国立衛研), 阿部智之 (日食衛協), 阿部裕 (国立衛研), 天野保希 (長野県環境研), 石原絹代 (日食分セ), 大坂郁恵 (埼玉衛研), 大野春香 (愛知衛研), 大野雄一郎 (千葉県薬検査セ), 尾崎麻子 (大阪健安基研), 柿原芳輝 (日穀検), 小林尚 (食分開セ), 櫻木大志 (名古屋市衛研), 柴田博 (顕微鏡院), 城野克広 (産技総研), 関戸晴子 (神奈川衛研), 高坂典子 (食薬安セ), 竹中佑 (日分安試), 但馬吉保 (食環検), 田中葵 (日海検), 田中秀幸 (産技総研), 外岡大幸 (さいたま市衛研), 中西徹 (日食分セ), 野村千枝 (大阪健安基研), 羽石菜穂子 (東京都健安研), 早川雅人 (化研評機), 三浦俊彦 (日食検), 山口未来 (国立衛研), 渡辺一成 (化研評機), 佐藤恭子 (国立衛研), 食品衛生学雑誌, 59, 55-63 (2018)

蒸発残留物は器具・容器包装からの食品疑似溶媒への

不揮発性物質の総溶出量を求める試験であり, 合成樹脂製器具・容器包装の個別規格, ゴム製器具・容器包装及び金属缶で規格が設定されている. これまでに試験室間共同試験は実施されておらず, 真度や精度などの性能評価は行われていない. そこで, 油性食品以外の代替として規定されている水, 4%酢酸及び20%エタノールの3種類の浸出用液について室間共同試験を行い公定法と公定法変法の結果を比較するとともに性能を評価した.

器具・容器包装における蒸発残留物試験の試験室間共同試験 (第2報)

大野浩之 (名古屋市衛研), 六鹿元雄 (国立衛研), 阿部智之 (日食衛協), 阿部裕 (国立衛研), 天野保希 (長野県環境研), 石原絹代 (日食分セ), 大坂郁恵 (埼玉衛研), 大野春香 (愛知衛研), 大野雄一郎 (千葉県薬検査セ), 尾崎麻子 (大阪健安基研), 柿原芳輝 (日穀検), 小林尚 (食分開セ), 櫻木大志 (名古屋市衛研), 柴田博 (顕微鏡院), 城野克広 (産技総研), 関戸晴子 (神奈川衛研), 高坂典子 (食薬安セ), 竹中佑 (日分安試), 但馬吉保 (食環検), 田中葵 (日海検), 田中秀幸 (産技総研), 外岡大幸 (さいたま市衛研), 中西徹 (日食分セ), 野村千枝 (大阪健安基研), 羽石菜穂子 (東京都健安研), 早川雅人 (化研評機), 三浦俊彦 (日食検), 山口未来 (国立衛研), 渡辺一成 (化研評機), 佐藤恭子 (国立衛研), 食品衛生学雑誌, 59, 64-71 (2018)

蒸発残留物は器具・容器包装からの食品疑似溶媒への不揮発性物質の総溶出量を求める試験であり, 合成樹脂製器具・容器包装の個別規格, ゴム製器具・容器包装及び金属缶で規格が設定されている. これまでに試験室間共同試験は実施されておらず, 真度や精度などの性能評価は行われていない. そこで, 油性食品の代替として規定されているヘプタンについて室間共同試験を行い公定法と公定法変法の結果を比較するとともにそれぞれの性能を評価した. さらに, 欧米で油性食品の疑似溶媒として用いられる95%エタノール及びイソオクタンを浸出用液とした場合の性能を確認し, 規格試験としての適用性を検証した.

Modern sediment records of stanol to sterol ratios in Lake Suigetsu, Japan: An indicator of variable lacustrine redox conditions.

Masatoshi Nakakuni, Junichi Kitano (創価大学), Hitoshi Uemura (神奈川衛研), Shuichi Yamamoto (創価大学), Organic Geochemistry, 119, 59-71 (2018)

海洋堆積物中における酸化還元イベントの復元に対する、TMAH-熱分解GC/MS法を用いて得られる 5α (H)-stanol/ $\Delta 5$ -sterol比の有用性を水月湖の堆積物コアを用いて検証した。

水月湖はかつては淡水湖であったが、17世紀の水路掘削により現在は汽水湖となっている。これまでの酸化還元指標の研究では、湖が強い嫌気環境となると24-nordehydrocholestanol/24-nordehydrocholesterol比やdiatomstanol/diatomsterol比、22-dehydrocholestanol/

22-dehydrocholesterol比が上がることを示されている。本研究では、TMAH法で測定した 5α (H)-stanol/ $\Delta 5$ -sterol比が湖沼環境の酸化還元指標となることを初めて示した。汽水・淡水いずれでも高濃度で検出されるdiatomsterol比は非常に有用な酸化還元指標である可能性がある。一方、cholestanol/cholesterol比やcampestanol/campesterol比、sitostanol/sitosterol比は増加傾向を示さず、陸起源物質の流入・分解の影響を示している。

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

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

Bulletin of Kanagawa Prefectural Institute of Public Health No.48 (October, 2018)

CONTENTS

Review

Surveillance study on monitoring and prevention of infectious disease

- Mosquito-borne viral diseases —Japanese encephalitis and dengue fever—
Tomohiko TAKASAKI 1
- Surveillance of Drug-resistant HIV in patients newly diagnosed with HIV/AIDS in Japan
Makiko KONDO 6

Short reports

Surveillance study on monitoring and prevention of infectious disease

- The epidemiological characteristics and drug resistance of *Mycoplasma pneumoniae* (April 2013- March 2016)
Hitomi OHYA, Ichiro FURUKAWA, Naoki NAKAJIMA, Eriko MITANI,
Miyuki SUZUKI, and Toshiro KUROKI 12
- Epidemic of influenza in Kanagawa Prefecture (2017/2018 season)
Sumi WATANABE, Sho KADEKARU, Takako SANO, Makiko KONDO and Toshiro KUROKI 17

Surveillance study to assure safety of food products and medicine

- Study on Material Test for Cadmium and Lead from Food Contacting Product
Haruko SEKIDO, Midori SHIMIZU, Masashi KAKITA, Yukiko TANAKA,
Ikuyo IJIMA, Hiroko KISHI 22
- Analytical Method for Discrimination of Alum
Fumiaki SOTODATE, Chikako HADA, Shigemi KAI, Kenichi KUMASAKA 27

Data

Surveillance study on monitoring and prevention of infectious disease

- Occurrence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in Kanagawa Prefecture (April, 2017 - March, 2018)
Ichiro FURUKAWA, Tomoka MASAOKA, Naoki NAKAJIMA 31
- Surveillance of viral gastroenteritis in Kanagawa Prefecture (April, 2017 - March, 2018)
Rieko SUZUKI, Junko TAKAHASI, Makiko KONDO and Toshiro KUROKI 36

Surveillance study to assure safety of food products and medicine

- Cases of histamine food poisoning
Masumi WAKI, Shigemi KAI, Toru FUKUMITSU, Takako HAYASHI and Haruko SEKIDO 39

-
- Abstracts of original papers by research staffs (April, 2017 - March, 2018) 41
-