

## 第3章 調査研究・報告

### 第1節 原 著

## 4'-ヒドロキシアルキルフェノンを用いたHPLCリテンションインデックスの構築とその応用

北岡洋平・陰地義樹・山下浩一・岡山明子

Modeling of HPLC Retention Index using 4'-Hydroxy Alkyl Phenone and Application for Mycotoxin and Pesticide Analysis

Yohei KITAOKA · Yoshiki ONJI · Hirokazu YAMASHITA and Akiko OKAYAMA

4'-ヒドロキシアルキルフェノンをリテンションインデックスに使用して、高速液体クロマトグラフィーにおける実用性を検証した。4'-ヒドロキシアルキルフェノンは移動相の影響を受けないこと、装置内部で吸着等がなく安定な物質であること、LC/MS (特にESI) で十分な感度があること、親水性から疎水性まで広範囲がカバーできることを確認した。本法をもとにマイコトキシンと農薬のHPLCリテンションインデックスを作成した。

### 緒言

健康危機管理の対応としては原因物質の究明と対策のために化学物質の迅速な測定と同定が求められ、今日では分離分析技術として確立したGC/MSとLC/MSが多用されている。

GC/MSでは直鎖パラフィンをインデックス物質としており、アメリカ国立標準技術研究所 (NIST) データベースに42,888の化合物について292,924のリテンションインデックスのデータが収録されている<sup>1)</sup>。これらのデータは実際にトウガラシの香気成分の同定やゴルフ場の農薬分析、サリン事件の捜査、そして農作物農薬一斉分析の通知法などに活用されている<sup>2,5)</sup>。

HPLCについては、1990年代に盛んに研究されたが<sup>6,8)</sup>、標準化されたリテンションインデックスデータベースが作成されることはなかった。

マイコトキシンについてこれまでに約200物質を網羅したFrisvadリテンションインデックス<sup>9)</sup>があるが、アルキルフェノンがESIでイオン化が困難なことから親水性側をカバーしきれないことから普及が進んでいない。

本研究では新たに4'-ヒドロキシアルキルフェノンをリテンションインデックス物質に使用してマイコトキシン及び農薬のリテンションインデックスを作成し、その実用性を検証することとした。

### 方法

#### 1. 試薬

インデックス標準物質 (C8~C13) には東京化成工業製の4'-ヒドロキシアルキルフェノンの6物質を使用した (C8: 4'-ヒドロキシアセトフェノン, C9: 4'-ヒド

ロキシプロピオフェノン, C10: 4'-ヒドロキシブチロフェノン, C11: 4'-ヒドロキシバレロフェノン, C12: 4'-ヒドロキシn-ヘキサフェノン, C13: 4'-ヒドロキシn-ヘプタノフェノン)。これらをアセトニトリルに溶解したのうち、それぞれの濃度が10 $\mu$ Mとなるよう20%アセトニトリルで希釈混合した。

測定物質としてはマイコトキシン17物質 (表2)、農薬98物質 (表3) を、それぞれアセトニトリルあるいは水系の溶媒に溶かして測定した。

#### 2. 装置

HPLCカラムはInertsil ODS-3 (2.1mm I.D., 15cm, 3 $\mu$ m, GLサイエンス), TSK gel ODS 100V (2.1mm I.D., 15cm, 3 $\mu$ m, 東ソー), Cadenza CD-C18 (2.0mm I.D., 15cm, 3 $\mu$ m, Imtakt) を使用した。

HPLC装置は, HP-1090 DAD (HP), Alliance 2695 HPLC (Waters)-API3000 (AB SCIEX), G6430 Triple Quad LC/MS (Agilent Technologies) を前出のHPLCカラムとの組み合わせで使用した。いずれも、中性から酸性側のアセトニトリル-水系のグラジエント溶出で操作した。

#### 3. リテンションインデックスの計算方法

インデックス標準物質 (C8~C13) の指標を800~1300としてリテンションタイムの差を比例配分する次式を用い計算した。

$$RI = (T_m - T_n) / (T_{n+1} - T_n) \times 100 + n \times 100 \quad (1)$$

$T_m$ : 目的物質のリテンションタイム (min)

$T_n$ : インデックス標準物質の炭素数n (8~13) のリテンションタイム (min)

## 結果及び考察

### 1. インデックス標準物質の選定

インデックス標準物質はMSに十分な感度を有し、相互の分離や溶出順序は移動相のpHや緩衝塩類組成の影響を受けない中性物質であることが求められる。そこで、Frisvadリテンションインデックスで使用されるアルキルフェノンの類似物質として4'-ヒドロキシアルキルフェノンを使用することとした。

まず、移動相のpHに依存しないことを確認するため、4'-ヒドロキシエチルフェノンを用い、①0.1%ギ酸-アセトニトリル、②水-アセトニトリル、③10 mM酢酸アンモニウム-アセトニトリルでグラジエント溶出した。その結果、図1に示したようにいずれの移動相でもシャープなピークが観測されてリテンションタイムにも変化がなかった。同時に紫外吸収スペクトルも測定した。極大吸収 $\lambda_{max}$ に変化がなく4'-ヒドロキシエチルフェノンの共役系が安定しており、中性から酸性側ではpHの影響を受けないことが示唆された。

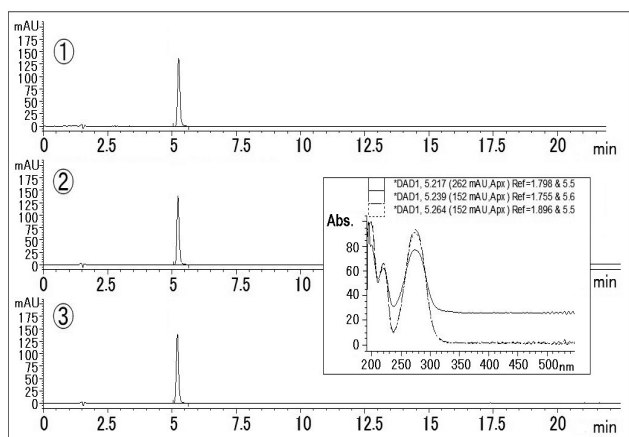


図1. 4'-ヒドロキシエチルフェノンのHPLCクロマトグラムとUVスペクトル

- ① 0.1%ギ酸-アセトニトリル
- ② 水-アセトニトリル
- ③ 10mM酢酸アンモニウム-アセトニトリル

4'-ヒドロキシアルキルフェノンとFrisvadのアルキルフェノンのHPLC (UV 275 nm) クロマトグラムを図2に示した。4'-ヒドロキシアルキルフェノンは同炭素数のアルキルフェノンよりも約4分早く溶出して親水性側を十分にカバーできることが明らかになった。

インデックス標準物質としてはアルキルパラベン<sup>10)</sup>、1-ニトロアルカン<sup>11-13)</sup>などの報告もあるが、広範な物質をカバーできることとFrisvadのアルキルフェノンインデックスとの統合の可能性があることが本法の優位性と考える。C14以上の4'-ヒドロキシアルキルフェノンの物質の調達と4'-ヒドロキシアルキルフェノンと

アルキルフェノンのインデックス数値の互換性については今後の検討課題としたい。

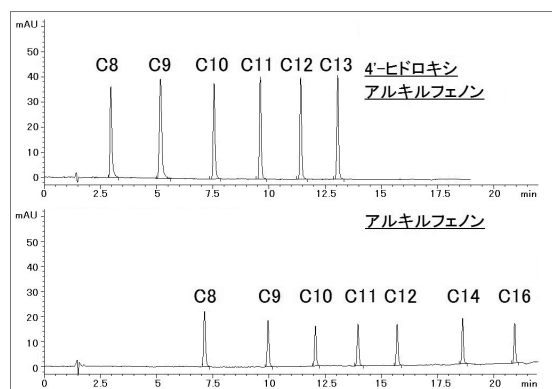


図2. 4'-ヒドロキシアルキルフェノンとアルキルフェノンのHPLCクロマトグラム

カラム：Inertsil ODS-3

移動相：A 0.1%ギ酸水溶液

B アセトニトリル

30%-98%/18分でのリニアグラジエント溶出

### 2. 4'-ヒドロキシアルキルフェノンのイオン化 (ESI) とLC/MS/MS

4'-ヒドロキシエチルフェノンをインフュージョン測定するとネガティブイオンモードでプリカーサーイオンとして $m/z$  149、プロダクトイオンとして $m/z$  120と $m/z$  92が得られた。

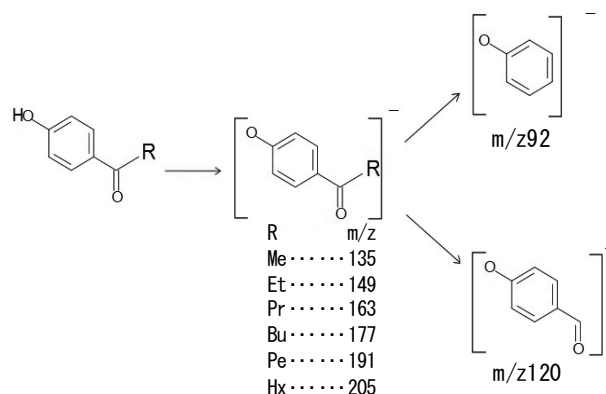


図3. 4'-ヒドロキシアルキルフェノンの開裂パターン

このことから、図3に示すような4'-ヒドロキシアルキルフェノンの開裂パターンが推定された。これをもとに4'-ヒドロキシアルキルフェノン混合標準液を用い、0.1%ギ酸酸性下でプリカーサーイオンとして、プロトン脱離分子イオンを指定し、プロダクトイオンをモニターするLC/MS/MS測定を行った。測定条件を表1に、クロマトグラムを図4に示した。十分な感度が得られることから4'-ヒドロキシアルキルフェノンをリテンションインデックスとするLC/MS/MS測定へ

の応用が可能となった。

表1. 4'-ヒドロキシアシルフェノン測定条件

Compound	Precursor Ion (m/z)	Product Ion (m/z)	Collision Energy (Volts)
C8	135	92	-30
		120	-24
C9	149	92	-34
		120	-24
C10	163	92	-30
		120	-24
C11	177	92	-30
		120	-24
C12	191	92	-30
		120	-24
C13	205	92	-30
		120	-24

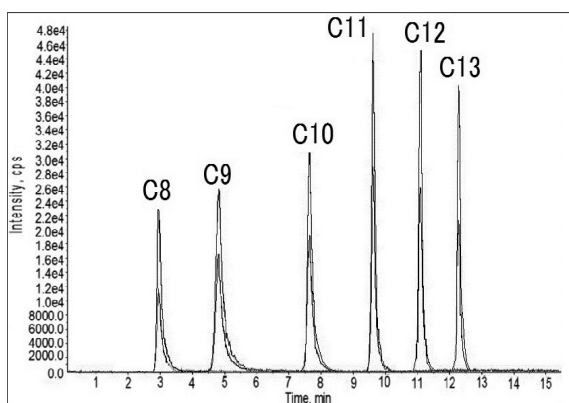


図4. 4'-ヒドロキシアシルフェノン混合標準液の

LC/MS/MSクロマトグラム

カラム：TSK gel ODS 100 V

移動相：A 0.1%ギ酸水溶液

B アセトニトリル

30%-98%/15分でのグラジエントカーブ4で溶出

### 3. HPLCリテンションインデックスの計算とその応用

図2, 図4ではC11以降のピーク間隔が狭くなる傾向がみられた。リテンションインデックスの計算にあたってはリテンションタイムの単純比例配分にふさわしいグラジエントカーブを採用する必要があることが課題として残った。

#### 1) マイコトキシン

17種類のマイコトキシンのリテンションインデックスの測定結果を表2に示した。

表2. マイコトキシンのリテンションインデックス

Mycotoxin	R.I.
Scirpentriol	731
Deoxynivalenol	731
Fusarenon-X	759
15-Monoacetoxyscirpenol	800
3-Acetyldeoxynivalenol	808
Fumonisin B1	899 *
Gliotoxin	933
Diacetoxyscirpenol	964
Fumonisin B2	988 *
HT-2 toxin	1013
Fumonisin B4	1040 **
$\beta$ -Zearalenol	1068
Ochratoxin B	1115
$\alpha$ -Zearalenol	1136
Ochratoxin A	1230
Zearalenone	1236
Verruculogen	1296

HPLC-DAD, Inertsil ODS-3, 0.1%ギ酸-アセトニトリルで30%-98%/18分でのリニアグラジエント溶出。

ただし, \*はLC/MS/MS, TSK gel ODS 100 V, 移動相は0.1%ギ酸-アセトニトリルで30%-98%/15分でのグラジエントカーブ4で溶出。

\*\*は半同定

#### 2) 農薬

98種類の農薬のリテンションインデックスの測定結果を表3に示した。

4'-ヒドロキシアシルフェノンは、移動相の影響を受けず、装置内部で吸着等がなくLC/MS (特にESI) で十分な感度があり、親水性から疎水性までの広範囲がカバーできることが分かった。これにより、リテンションインデックス標準物質に使用できることが明らかになった。今回、マイコトキシンと農薬のHPLCリテンションインデックスを作成したが、今後はインデックス標準物質として適したリテンションタイムが得られるようグラジエント条件の最適化を行うこと、C14以上の4'-ヒドロキシアシルフェノンを使用することで正確なインデックスを作成することを目指す。

また、今回は典型的な数種類のODSカラムで測定を行ったが、今後は他のODSカラム以外にもトリコセシン系マイコトキシンの分離に優れているペンタフルオロフェニルカラム (PFPカラム)<sup>14)</sup> や親水性相互作用カラム (HILIC)<sup>15)</sup>での測定も検討する予定である。

表3. 農薬のリテンションインデックス

Pesticide	R.I.	Pesticide	R.I.	Pesticide	R.I.
Aldoxycarb	715	Dimethomorph	1203	Phoxim	1377
Oxamyl	726	Ferimzone(E,Z)	1210	Cyprodinil	1384
Clothianidin	795	Methoxyfenozide	1214	Pencycuron	1388
Chloridazon	835	Pyrimethanil	1217	Indoxacarb	1390
Cymoxanil	859	Dymuron	1222	Pyrazophos	1396
Oxycarboxin	860	Flamprop methyl	1226	Hexaflumuron	1405
Thiacloprid	870	Cumyluron	1235	Novaluron	1405
Aldicarb	908	Chlorxuron	1243	Trifloxystrobin	1408
Carbetamide	946	Butafenacil	1243	Clofentezin	1417
Thiabendazole	950	Chromafenozide	1252	Triflumizole	1424
Azamethiophos	966	Iprovalicarb	1253	Cycloate	1434
Bromacil	985	Simeconazole	1257	Benzofenap	1443
Bendiocarb	989	Triticonazole	1262	Benfuracarb	1442
Tebuthiuron	1003	Flufenacet	1265	Oxadiclemefone	1445
Carbaryl	1027	Cyazofamide	1274	Fenoxaprop-ethyl	1450
Monolinuron	1048	Epoxyconazole	1276	Pentoxazone	1452
Thiodicarb	1052	Prometryn	1285	Furathiocarb	1457
Acibenzoral-S-methyl	1074	Indanofan	1290	Lufenuron	1461
Dimethirimol	1074	Mepanipirim	1292	Quizalofop-ethyl	1461
Pirimicarb	1072	Tebufenozide	1300	Propaquizafop	1474
Furametpyr	1080	Diflubenzuron	1301	Teflubenzuron	1479
Methabenzthiazuron	1091	Fenoxycarb	1310	Cloquintcet-mexyl	1481
Diuron	1105	Naproanilide	1311	Fenpyroxymate(E)	1490
Fluridon	1145	Tetrachlorvinphos	1316	Fenpyroxymate(Z)	1490
Azinphos methyl	1147	Clodinafop-propargyl	1322	Flufenoxuron	1500
Pyriflolid	1157	Cafentrazone-ethyl	1324	Hexythiazox	1508
Azoxystrobin	1157	Anilofos	1335	Etoazole	1527
Oxabetrinil	1174	Carpropamide	1345	Chlorfluazuron	1541
Linuron	1179	Benalaxyl	1352	Carbosulfan	1656
Fenamidone	1183	Triflumuron	1362	Spinosyn A	1710
Methiocarb	1185	Cyflufenamid	1364	Fenpropimorph	1745
Boscalid	1190	Mefenpyr-diethyl	1366	Spinosyn D	1779
Ametryn	1192	Pyraclostrobin	1370		

LC/MS/MS, Imtakt Cadenza CD-C18, (A) 0.05 M酢酸アンモニウム水溶液 - (B) 0.05 M酢酸アンモニウムメタノール溶液でグラジエント溶出. B%濃度:15%→40%(1分)→40%(3.5分)→50%(6分)→55%(8分)→95%(17.5分)→95%(30分)

## 文 献

- V. I. Babushok, P. J. Linstrom, et al. : *Journal of Chromatography A*, **1157**, 414-421 (2007)
- 阿久津智美, 前野優哉 : 栃木県産業技術センター 研究報告, **9**, 87-91 (2011)
- 劔持堅志, 小田淳子, 他 : 環境化学, **3**, 41-58 (1993)
- 角田紀子 : *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.* **53**, 157-163 (2005)
- 食品に残留する農薬, 飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法(別表) GC/MSによる農薬等の一斉試験法I(農産物)
- Dennis W. Hill, Albert J. Kind: *Journal of Analytical Toxicology*, **18**, 233-242 (1994)
- M. Bogusz, M. Erkens, J. P. Franke, et al. : *Journal of Liquid Chromatography*, **16**, 1341-1354 (1993)
- Linda Didaoui, A. Touabet, B. Y. Meklati, et al. : *Journal of High Resolution Chromatography*, **22**, 613-618 (1999)
- JENSC. Frisvad. ULF THRANE: *Journal of Chromatography*, **404**, 195-214 (1987)
- 安達美和, 高橋知行 : *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.* **52**, 39-44 (2004)
- Maciej Bogusz, Moutian Wu : *Journal of Analytical Toxicology*, **15**, 188-197 (1991)
- Roger M. Smith: *Journal of Chromatography A*, **19**, 313-320 (1982)
- Maciej Bogusz: *Journal of Analytical Toxicology*, **15**, 174-178 (1991)
- 田村昌義, 中川博之, 宇山敦生, 他 : 食衛誌, **55**, 19-24 (2013)
- 四ノ宮美保, 岩切良次: 環境化学, **21**, 293-301(2011)

# 第3章 調査研究・報告

## 第2節 報 告



## 超臨界流体抽出 (SFE) による加工食品中の残留農薬の一斉分析法の検討

山下浩一・西山隆之・北岡洋平・陰地義樹・岡山明子

Study on a Method for Simultaneous Analysis of Pesticides in Processed Foods  
with Supercritical Fluid Extraction

Hirokazu YAMASHITA・Takayuki NISHIYAMA・Yohei KITAOKA・Yoshiki ONJI and Akiko OKAYAMA

### 緒 言

食品中の残留農薬基準値違反あるいは意図的な農薬混入事件など、食の安全・安心を脅かす事例がたびたび発生している。そのような状況のもと、迅速・簡便な加工食品中の残留農薬分析法の開発を目的として、超臨界流体抽出 (SFE) を使用した一斉分析法の検討を行っている。既報<sup>1), 2)</sup>では野菜・果実類および穀類・豆類を対象に農薬334成分の一斉分析法の検討を行った。今回、対象食品の拡大を図るべく、加工食品を対象に、SFEによる抽出条件の改良を検討し、添加回収試験による妥当性評価を行ったので、その内容について報告する。

### 方 法

#### 1. 試料

当センターでの過去の検査実績等を参考にして、冷凍ギョウザ、レトルトカレー、冷凍とんかつ、冷凍お好み焼き、および冷凍フライドポテトの5種類を使用した。各試料をミキシングカッター等で均一化後、ポリエチレン製袋に小分けして冷凍保存した。使用直前に水浴中で解凍後、対象農薬を検出しないことを確認しブランク試料として用いた。

#### 2. 対象農薬

既報<sup>2)</sup>に準じて、林純薬工業(株)製GC/MS用農薬混合標準溶液(計354成分)のうちの334成分を対象とした。

#### 3. 試薬等

既報<sup>2)</sup>に準じた。

#### 4. 装 置

試料の秤量は、ザルトリウス製ED4202Sを使用した。その他に使用した装置は既報<sup>2)</sup>に準じた。

#### 5. SFE条件

SFE条件は抽出圧力のみ12MPaに変更したが、その他の条件は既報<sup>2)</sup>と同一とした。

#### 6. GC/MS/MS分析条件

既報<sup>2)</sup>に準じた。

#### 7. 試験溶液の調製

試料4.0gを秤量し、ケイ藻土(セライト)1gと吸水性ポリマー(アクアパール)1gを乳鉢で十分に混和した後、抽出管に充填した。その他の抽出管への充填方法、SFE装置内への設置方法、および抽出操作終了後のミニカラムによる精製方法は既報<sup>2)</sup>に準じた。

#### 8. 添加回収試験

各ブランク試料に対し、試料中濃度が $0.01 \mu\text{g/g}$ および $0.1 \mu\text{g/g}$ となるように各農薬を添加した。定量はマトリックス検量線を用いて行った。マトリックス検量線は、ブランク試料を操作して得られた試験溶液で希釈した $0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0 \mu\text{g/g}$ の各標準溶液の測定結果から作成した。1日2併行分析を5日間行い、得られた定量値について、厚生労働省から通知された「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドライン」<sup>3)</sup>(以下「妥当性ガイドライン」)に従って解析を行った。

### 結果及び考察

#### 1. SFE抽出管への充填方法の検討

加工食品は複数食材を加工、調理して製品化されているものが多く、穀類等に比べると水分含量が高い。したがって、抽出管への充填時に粘性が高くなって抽出操作が正常に行われなことが懸念された。そこで、試料と抽出助剤の配合割合について最適条件を検討した。その結果を表1に示すが、均一化した試料4gに

アクアパール1gとセライト1gを配合した時、試料採取量を減らすことなく、しかも配管の詰まりを起こすことなく正常に抽出操作を行うことができた。

表1 充填方法の検討

試料	アクアパール	セライト	エキストレルート	評価
4 g	—	0.5 g	—	×
1 g	1 g	2 g	—	○
2 g	1 g	1 g	—	○
4 g	1 g	1 g	—	◎
4 g	1 g	—	1 g	×
5 g	1 g	0.5 g	—	野菜・果実
4 g	—	0.5 g	—	穀類等

「アクアパール」は高吸水性樹脂の商品名。  
「セライト」と「エキストレルート」はいずれも商品名で、珪藻土を原料とした製品。

## 2. SFE抽出条件の検討

農薬を精度良く分析するためには、試料由来の夾雑成分をできるだけ測定検液から除去する必要がある。一方、超臨界流体の溶解力はその密度に強く依存することが知られており、密度を低くすることで試料からの夾雑物の抽出が抑えられるのではないかと考えられた。そこで、夾雑成分の溶出を減少させることを目的に、炭酸ガスの抽出圧力を検討した。その結果を表2に示すが、従来の15MPaから12MPaに圧力を下げることにより、残留物重量が減少することがわかった。また、ODSトラップカラムからの溶出溶媒は、アセトニトリルがアセトンに比べて夾雑成分の溶出を減少させることができた。一方、これらの条件の違いにより、農薬成分の抽出効率に大差は見られなかった。以上のことから、加工食品の場合は、抽出圧力を12MPaに設定し、アセトニトリルを溶出溶媒に使用することとした。

表2 SFE抽出条件の比較

溶出溶媒	炭酸ガス圧力 (MPa)	抽出物の残留物重量 (mg/g)		
		ギョウザ	レトルトカレー	とんかつ
アセトン	15	16.11	8.99	20.37
アセトニトリル	15	0.63	0.24	0.29
アセトニトリル	12	0.16	0.21	0.16

SFEによる抽出操作を行い、得られた抽出液を濃縮乾固して残留物の重量を測定した。炭酸ガス圧力を15MPaから12MPaに変更することにより、残留物の重量が減少した。

## 3. 添加回収試験結果

上記の条件で、5種類の加工食品について農薬334成分の添加回収試験を行った。求めた定量値について、妥当性ガイドラインに沿って妥当性評価を実施した。すなわち、平均値を求めるとともに、一元配置の分散分析を実施して併行精度と室内精度を求め、

ガイドラインの目標値を満足しているかどうかの判定を行った。判定は既報<sup>2)</sup>と同様、各試料において農薬別に算出した真度と精度からA判定(真度、精度ともに目標値を満たす)、B判定(A以外で真度が50~150%)、C判定(A以外で真度が30~50%)、D判定(真度30%未満もしくは、精度の目標値を満たさない)の4つのグループに分類した。その結果を表3に示した。妥当性ガイドラインの目標値を達成したA判定の農薬は、冷凍ギョウザ:242成分(72%)、レトルトカレー:254成分(76%)、冷凍とんかつ:209成分(63%)、冷凍お好み焼き:223成分(67%)、冷凍フライドポテト:258成分(77%)であった。5種類の検体すべてで目標値を達成した農薬は334成分中、166成分(50%)であった。B判定の農薬も50成分(15%)あったことから、あわせて216成分(65%)の農薬が真度50%~150%の範囲内で精度よく測定できることがわかった。このことから、本法は分析可能な農薬は限定されるものの、精度の良い加工食品の一斉分析法として利用可能であると考えられる。

一方、いずれかの検体でD判定であった農薬は113成分(34%)であった。目標値を満たさない原因として、前処理時の損失や妨害ピーク等が考えられる。各農薬について極性の指標であるオクタノール/水分分配係数(Log Pow)を調べたところ、Log Powが2.0未満あるいは6.0以上の農薬はD判定となる割合が高かったものの、Log Powが2.0から6.0の間の農薬にもD判定のもの多数存在したことから、極性と妥当性評価結果との間に明確な関連性を見いだすことはできなかった。

D判定113成分のうち、5種類すべての検体でD判定となったのは以下の38成分であった。DCIP, EPTC, TCMTB, アセタミプリド, アミトラス, アリドクロール, エスフェンバレレート, エトキサゾール代謝物, エトベンザニド, エトリジアゾール, オキサベトリニル, オメトエート, カルベタミド, キノメチオネート, クロルメホス, クロロネブ, ジクロフルアニド, ジクロベニル, ジクロロポス, ジタリムホス, シラフルオフェン, スピロキサミン, チアベンダゾール, チアメトキサム, チオシクラム, デスメディファム, トリクラミド, トリルフルアニド, ナレド, ネライストキシシン, ピフェニル, ピリミジフェン, フェンプロピモルフ, ブチレート, ホルベット, ホルモチオン, メトプレン, モノクロトホス。

また、D判定の農薬のうち、4種類の検体については目標値を達成しているにもかかわらず、1種類の検体でD判定となったのは28成分であり、いずれも精度が妥当性ガイドラインの目標値を満たさなかったこと



表3 添加回収試験による妥当性評価結果

判定	妥当性評価		検体					全検体
	真度(回収率)	精度	ギョウザ	レトルトカレー	とんかつ	お好み焼き	フライドポテト	
A	70~120%	○	242	254	209	223	258	166 (50%)
B	50~70, 120~150%	○	37	19	21	58	23	50 (15%)
C	30~50%	○	2	1	1	4	4	5 (1%)
D	30%未満	○, or ×	53	60	103	49	49	113 (34%)
		計	334	334	334	334	334	334

が原因である。また、28成分のうち26成分は冷凍とんかつのみでD判定となったものであるが、冷凍とんかつは5種類の中で最も脂質濃度が高いため、このことが精度を悪くする原因となっているのではないかと推測される。冷凍とんかつのみでD判定となった26成分は以下の通りである。BHC ( $\beta$ ), BHC ( $\delta$ ), アゾキシストロビン, インドキサカルブMP, エチクロゼート, キザロホップエチル, キノクラミン, クロフェンテジン, ジスルホトンスルホン, ジフェノコナゾール, シペルメトリン, ゴキサミド, ターバシル, トルフェンピラド, ノルフルラゾン, ビテルタノール, ファモキサドン, フェナリモル, フェンアミドン, フェンバレレート, フェンブコナゾール, フルシトリネート, フルミオキサジン, フルミクロラックベンチル, プロパニル, メプロニル。今後、本法で適用可能な農薬数を増加させるには、冷凍とんかつのように単一食品のみでD判定となった検体について、前処理条件を検討することが有効であると考えられる。

## 文 献

- 1) 浦西克維, 山下浩一, 山本圭吾: 食衛誌, **53**, 63-74 (2012)
- 2) 浦西克維, 山下浩一, 岡山明子, 他: 食衛誌, **53**, 278-290 (2012)
- 3) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知食安発1224第1号「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインの一部改正について」, 平成22年12月24日

## LC/MS/MSによる残留農薬一斉分析の妥当性評価（青果・果実）

西山隆之・山下浩一・岡山明子

Validation Study on a Simultaneous Analysis for Determination of Pesticide Residues  
by LC/MS/MS (Vegetables and Fruits)

Takayuki NISHIYAMA・Hirokazu YAMASHITA and Akiko OKAYAMA

## 緒言

平成18年5月「農薬ポジティブリスト制度」が施行され、約800種類の農薬に残留基準が定められ、検査対象農薬は激増し一斉分析法の開発が必要となった。また、食品中に残留する農薬の分析結果の信頼性を確保するため、試験法の妥当性を評価するためのガイドライン<sup>1)</sup>（以下、ガイドライン）が通知されている。

そこで、野菜・果実（りんご、ばれいしょ、トマト、ほうれんそう、キャベツ）についてLC/MS/MSによる残中農薬一斉分析を検討し、浦西らの報告<sup>2)</sup>を参考に妥当性評価を行ったので報告する。

## 方法

## 1. 試料

県内で流通している野菜及び果実で検査によって対象農薬が不検出と確認された作物を用いた。粉碎・均一化後袋に小分けし、冷凍保存した。使用時、水浴中にて解凍し、攪拌したものをブランク試料とした。

## 2. 分析対象農薬

和光純薬工業(株)製LC/MS用農薬混合標準溶液167成分（6グループ）を対象とした。

## 3. 試薬等

農薬混合標準溶液は各成分が2µg/mLとなるようにメタノールで希釈し、これを添加回収試験、検量線の作成に用いた。

その他の試薬：抽出、精製に使用したアセトニトリル、トルエン、アセトン、メタノール、無水硫酸ナトリウムは和光純薬工業(株)製残留農薬試験用を用いた。塩化ナトリウム、リン酸水素二カリウム及びリン酸二水素カリウムは和光純薬工業(株)製特級を用いた。LC/MS移動相用としては、超純水及びメタノールはLC/MS用、1 mol/L酢酸アンモニウムはHPLC用、和光純

薬工業(株)製を用いた。精製用ミニカラムには、グラファイトカーボン/アミノプロピルシリル化シリカゲル積層カラム（500mg/500mg）6 mL;SUPELCO製（以下、ミニカラム）を用いた。

## 4. 装置

Agilent 1200LC QQQ6430

## 5. LC条件

分析カラムには、Cadenza CD-C18、2 mm X 150 mm 3µmインタクト(株)製を用いた。移動相には、(A液) 0.5mM酢酸アンモニウム水溶液と(B液) 0.5mM酢酸アンモニウムメタノール溶液を使用した。流速は、0.2mL/分、表1に示した条件でグラジエント分析を行った。カラム温度40℃、注入量5µLとした。

表1 グラジエント条件

時間 (分)	A液 (%)	B液 (%)
0	85	15
1	60	40
3.5	60	40
6	50	50
8	45	55
17.5	5	95
30	5	95
30	85	15

## 6. 添加回収試験

ブランク試料20.0gをトールビーカーに量り、農薬混合標準溶液を試料中の濃度が0.01µg/g及び0.1µg/gとなるよう添加した後、20分以上放置した。試験は、ガイドラインに示された枝分かれ実験モデルに従い、1日2併行分析を5日間行った。得られた結果を統計

処理し、真度、併行精度、室内精度を算出した。

## 7. 試験溶液の調製

LC/MSによる農薬等の一斉試験法 I (農作物)<sup>3)</sup>に従って行った。

### 1) 抽出

試料20.0gを量りアセトニトリル50mLを加えホモジナイズした後、吸引ろ過した。ろ紙上の残留物にアセトニトリル20mLを加え、ホモジナイズした後吸引ろ過した。得られたろ液を合わせ、アセトニトリルを加えて正確に100mLとした。

抽出液20mLを採り、塩化ナトリウム10g及び0.5mol/Lリン酸緩衝液(pH7.0)20mLを加え、10分間振とうした。静置した後、分離した水層を捨てた。アセトニトリル層に無水硫酸ナトリウムを加えて脱水し、無水硫酸ナトリウムをろ別した後、ろ液を40℃以下で濃縮し、溶媒を除去した。残留物にアセトニトリル及びトルエン(3:1)混液2mLを加え溶かし抽出液とした。

### 2) 精製

ミニカラムに、アセトニトリル及びトルエン(3:1)混液10mLを注入し、流出液は捨て、コンディショニングした。このカラムに抽出液を負荷し、アセトニトリル及びトルエン(3:1)混液20mLを注入し、全溶出液を40℃以下で1mL以下に濃縮した。これにアセトン10mLを加えて40℃以下で1mL以下に濃縮し、再度アセトン5mLを加えて濃縮し、溶媒を留去した。残留物をメタノールに溶かして、正確に4mLとしたものを試験溶液とした。

## 8. 検量線の作成

農薬混合標準溶液を、メタノールで適切な濃度範囲に希釈調製して、それぞれ5μLをLC/MS/MSに注入し、ピーク面積法で検量線を作成した。検量線は1ng/mL~200ng/mLの範囲で原点を通る直線を示した。

## 9. ミニカラムについての検討

精製に使用するミニカラムに農薬混合標準液を注入し、回収率を確認したところ、52農薬が70%~120%に入らなかった。

そこで、アセトニトリル及びトルエン(3:1)混液の量を30mLに増加したが、回収率の改善は認められなかったため、この52農薬は、今回の検討より除外した。

## 結果及び考察

### 1. LC/MS/MS条件の検討

メタノールで1μg/mLとなるように農薬混合標準溶液を希釈し、エレクトロスプレーイオン化法(ESI)、ポジティブモードを用い、化合物データベースの構築を行った。まず、プレカーサーイオン(Q1)を決定し、感度が最大となるFragmentor電圧(F)を検索し、Collision Energy(CE)を変えてデータ採取し最適なQ1, CE, プロダクトイオン(Q2)の組み合わせを決定した。96農薬について最適化したパラメータの条件を表2に示した。なお、Azinphos methyl及びTebufenozideは確認イオンの設定ができず、さらに17の農薬については感度不足等で、データベースの構築が出来なかった。

メソッドは、セグメントを切る必要のないダイナミックMRMとした。

### 2. 妥当性評価

各試料・農薬ごとに得られたデータを表3に示した通り4つのグループに分類した。併行精度、室内精度の判定は、添加濃度0.01μg/gでは併行精度25%未満、室内精度30%未満は○とし、0.1μg/gでは併行精度15%未満、室内精度20%未満は○とした。超過すると真度に関わらずDグループとした。

表3 妥当性評価のグループ分類

グループ	真度	併行精度	室内精度
A	70~120%	○	○
B	50~70%or120~150%	○	○
C	30~50%or150%<	○	○
D	<30%	○or×	○or×

各試料における農薬のグループ分類の結果を表4に示した。ただし、AからD表記は、0.01μg/gと0.1μg/g添加のいずれかで良くないほうの結果を記載した。

りんごでは、Aグループに分類された農薬が75あり、Bグループに分類された農薬が17であった。ばれいしょ、トマト、ほうれんそう、キャベツについても表4に示した通りである。Bグループの農薬は、真度は目標値を満たさないものの、併行精度、室内精度はガイドラインの目標値を満たしており、スクリーニングとしては使用可能であると考えられる。

全試料でガイドラインの目標値を満たしたAグループの農薬は48で、スクリーニングには使用可能と考えられるBグループの農薬は、22であった。

農薬は用途により殺菌剤、除草剤及び殺虫剤の3種類に大別される。農薬の用途ごとに妥当性評価の

表2 対象農薬及びイオン最適条件

農薬名	Q1 (m/z)	Q2 (m/z)	F (V)	CE (V)	農薬名	Q1 (m/z)	Q2 (m/z)	F (V)	CE (V)
Aldoxycarb	240.0	223.0	100	0	Fenamidone	312.0	92.0	120	24
	240.0	148.0	100	8		312.0	236.0	120	8
Oxamyl	237.1	72.0	80	8	Methiocarb	226.1	121.0	80	16
	237.1	90.0	80	4		226.1	169.0	80	4
Clothianidin	250.0	169.0	88	8	Dimethomorph	388.1	301.0	160	16
	250.0	132.0	88	12		388.1	273.0	160	32
Chloridazon	222.0	92.0	160	28	Boscalid	343.0	307.0	140	16
	222.0	77.0	160	36		343.0	271.1	140	36
Cymoxanil	199.1	128.0	80	0	Ametryn	228.1	186.0	140	16
	199.1	111.0	80	12		228.1	68.0	140	40
Oxycarboxin	268.1	174.9	100	8	Ferimzone(E,Z)	255.2	91.1	144	32
	268.1	43.1	100	36		255.2	132.1	144	16
Thiacloprid	253.0	126.0	116	16	Flamprop methyl	336.1	105.0	120	8
	253.0	90.0	116	40		336.1	77.0	120	40
Aldicarb	116.0	89.0	80	4	Methoxyfenozide	369.2	149.0	88	8
	116.0	70.0	80	4		369.2	313.2	88	0
Thiabendazole	202.0	175.0	172	24	Pyrimethanil	200.1	107.0	160	24
	202.0	131.0	172	36		200.1	82.1	160	24
Carbetamide	237.1	192.0	80	0	Dymuron	269.0	151.0	120	8
	237.1	118.0	80	8		269.0	119.0	120	16
Azamethiphos	325.0	183.0	116	8	Cumyluron	303.1	185.0	100	8
	325.0	112.0	116	36		303.1	124.9	100	36
Bromacil	261.0	204.9	80	8	Chloroxuron	291.1	72.0	140	20
	261.0	116.9	80	40		291.1	46.1	140	20
Bendiocarb	224.1	167.0	80	4	Butafenacil	475.1	331.0	144	8
	224.1	109.0	80	14		475.1	179.9	144	36
Tebuthiuron	229.1	172.0	120	16	Chromafenozide	395.2	175.0	88	8
	229.1	115.9	120	28		395.2	339.2	88	0
Carbaryl	202.0	145.0	100	5	Iprovalicarb	321.2	119.1	88	16
	202.0	127.0	100	20		321.2	203.1	88	0
Monolinuron	215.1	125.9	100	16	Simeconazole	294.2	70.1	116	16
	215.1	148.0	100	12		294.2	73.1	116	32
Thiodicarb	355.1	88.0	80	12	Triticonazole	318.1	70.0	120	12
	355.1	107.9	80	8		318.1	124.9	120	36
Acibenzolar-S-methyl	211.0	139.9	120	24	Flufenacet	364.1	194.0	100	4
	211.0	136.0	120	32		364.1	152.0	100	16
Dimethirimol	210.2	71.1	144	36	Cyazofamide	325.1	108.0	88	8
	210.2	140.1	144	20		325.1	261.1	88	0
Furametpyr	334.1	156.9	140	32	Epoxiconazole	330.1	121.0	140	20
	334.1	290.1	140	12		330.1	122.9	140	12
Pirimicarb	239.1	72.0	100	20	Prometryn	242.1	158.1	140	22
	239.1	182.1	100	12		242.1	200.1	140	14
Methabenzthiazuron	222.1	165.0	100	12	Indanofan	341.1	175.0	100	4
	222.1	150.0	100	36		341.1	187.0	100	8
Diuron	233.0	72.0	120	20	Mepanipyrim	224.1	77.0	160	40
	233.0	160.0	120	25		224.1	106.0	160	24
Fluridon	330.1	310.0	180	28	Diflubenzuron	311.0	158.0	100	12
	330.1	259.0	180	52		311.0	140.9	100	36
Pyrifthalid	319.1	139.0	144	24	Fenoxycarb	302.0	116.0	180	4
	319.1	83.0	144	40		302.0	88.0	180	15
Azoxystrobin	404.0	372.0	120	10	Naproanilide	292.1	171.1	116	8
	404.0	344.0	120	20		292.1	120.0	116	20
Oxabetrinil	233.1	147.0	80	4	Tetrachlorvinphos	364.9	126.9	100	12
	233.1	77.0	80	32		364.9	238.8	100	16
Linuron	249.0	159.9	100	12	Clodinafop-propargyl	350.1	266.0	128	12
	249.0	182.0	100	12		350.1	91.1	128	28

上段: 定量イオン

下段: 確認イオン

農薬名	Q1 (m/z)	Q2 (m/z)	F (V)	CE (V)	農薬名	Q1 (m/z)	Q2 (m/z)	F (V)	CE (V)
Carfentrazone-ethyl	412.1	346.0	160	20	Benfuracarb	411.2	195.0	110	22
	412.1	366.0	160	16		411.2	252.1	110	10
Anilofos	368.0	125.0	116	28	Oxaziclomefone	376.1	190.0	100	8
	368.0	198.9	116	4		376.1	161.0	100	28
Carpropamide	334.1	138.9	100	20	Fenoxaprop-ethyl	362.1	288.0	160	16
	334.1	196.0	100	8		362.1	121.0	160	28
Benalaxyl	326.2	148.1	100	16	Pentoxazone	371.1	286.1	104	14
	326.2	91.0	100	40		371.1	186.0	104	30
Triflumuron	359.0	155.9	120	12	Furathiocarb	383.2	195.0	116	8
	359.0	138.9	120	32		383.2	252.0	116	4
Cyflufenamid	413.0	295.1	116	8	Quizalofop-ethyl	373.1	299.0	160	16
	413.0	241.0	116	20		373.1	271.0	160	24
Mefenpyr-diethyl	373.1	327.0	100	8	Lufenuron	511.0	158.0	120	16
	373.1	159.9	100	32		511.0	140.9	120	40
Pyraclostrobin	388.1	194.0	112	8	Propaquizafop	444.1	100.0	140	16
	388.1	163.0	112	24		444.1	299.0	140	20
Phoxim	299.1	77.1	80	36	Teflubenzuron	381.0	158.0	100	12
	299.1	129.0	80	4		381.0	141.0	100	40
Cyprodinil	226.1	93.0	160	40	Cloquintocet-mexyl	336.1	238.0	116	8
	226.1	77.0	160	40		336.1	192.0	116	24
Pencycuron	329.1	124.9	140	24	Fenpyroxymate(Z)	422.2	366.1	140	12
	329.1	218.0	140	12		422.2	138.0	140	32
Indoxacarb	528.1	149.9	144	20	Hexythiazox	353.0	228.0	100	11
	528.1	203.0	144	40		353.0	168.0	100	23
Pyrazophos	374.1	222.1	140	20	Flufenoxuron	489.1	158.0	140	16
	374.1	238.0	140	20		489.1	140.9	140	40
Novaluron	493.0	158.0	120	20	Etoxazole	360.2	141.0	160	32
	493.0	141.0	110	38		360.2	304.1	160	16
Hexaflumuron	461.0	158.0	140	16	Chlorfluazuron	540.0	382.9	152	20
	461.0	140.9	140	40		540.0	158.0	152	16
Trifloxystrobin	409.1	186.0	120	12	Fenpyroxymate(E)	422.2	366.1	140	12
	409.1	206.0	120	8		422.2	138.0	140	32
Clofentezine	303.0	138.0	96	12	Carbosulfan	381.2	118.1	128	16
	303.0	102.0	96	40		381.2	160.1	128	8
Triflumizole	346.1	278.0	104	4	Spinosyn A	732.5	142.0	180	28
	346.1	43.1	104	24		732.5	189.0	180	32
Cycloate	216.1	83.0	80	12	Fenpropimorph	304.3	147.1	160	28
	216.1	72.0	80	16		304.3	57.1	160	32
Benzofenap	431.1	105.0	172	32	Spinosyn D	746.5	142.0	180	28
	431.1	119.0	172	16		746.5	98.0	180	40

上段: 定量イオン

下段: 確認イオン



表4 各試料における農薬のグループ分類

農薬名	試料					総合評価	農薬名	試料					総合評価
	りんご	ばれいしょ	トマト	ほうれんそう	キャベツ			りんご	ばれいしょ	トマト	ほうれんそう	キャベツ	
Aldoxycarb	A	A	A	C	C	C	Mepanipyrim	A	A	A	A	A	A
Oxamyl	A	B	A	B	C	C	Diflubenzuron	A	A	A	B	C	C
Clothianidin	B	A	A	B	A	B	Fenoxycarb	B	B	B	D	C	D
Chloridazon	A	A	A	A	A	A	Naproanilide	A	A	A	B	A	B
Cymoxanil	B	A	A	A	B	B	Tetrachlorvinphos	A	A	A	A	A	A
Oxycarboxin	B	A	A	A	A	B	Cioldinafop-propargyl	A	A	A	D	B	D
Thiacloprid	A	A	A	A	A	A	Carfentrazone-ethyl	A	A	A	A	A	A
Aldicarb	B	A	D	A	A	D	Anilofos	A	A	A	A	A	A
Thiabendazole	A	A	A	A	A	A	Carpropamide	A	A	B	A	A	B
Carbetamide	B	B	A	A	A	B	Benalaxyl	A	A	A	A	A	A
Azamethiphos	B	B	A	D	D	D	Triflumuron	A	A	A	D	D	D
Bromacil	B	A	A	A	A	B	Cyflufenamid	A	A	A	B	A	B
Bendiocarb	A	A	A	A	A	A	Mefenpyr-diethyl	A	A	A	A	A	A
Tebuthiuron	A	A	A	A	B	B	Pyraclostrobin	C	A	A	A	A	C
Carbaryl	A	A	A	A	A	A	Phoxim	A	A	A	A	A	A
Monolinuron	A	A	A	A	A	A	Cyprodinil	A	D	A	A	A	D
Thiodicarb	B	A	A	A	A	B	Pencycuron	A	A	A	A	A	A
Acibenzolar-S-methyl	A	D	A	A	A	D	Indoxacarb	A	A	A	B	A	B
Dimethirimol	A	D	A	A	A	D	Pyrazophos	A	A	A	A	A	A
Pirimicarb	A	A	A	A	A	A	Hexaflumuron	B	A	A	D	D	D
Furametpyr	A	A	A	A	A	A	Novaluron	B	A	A	D	C	D
Methabenzthiazuron	A	A	A	A	A	A	Trifloxystrobin	A	A	A	A	A	A
Diuron	A	A	A	A	A	A	Clofentezine	B	A	B	D	D	D
Fluridon	A	A	A	A	A	A	Triflumizole	A	A	A	B	B	B
Pyrifthalid	A	A	A	A	A	A	Cycloate	B	D	A	A	A	D
Azoxystrobin	A	A	A	A	A	A	Benzoifenap	A	A	A	B	A	B
Oxabetrinil	A	A	A	A	A	A	Benfuracarb	A	A	A	A	D	D
Linuron	A	A	A	A	A	A	Oxaziclomefone	A	A	A	A	A	A
Fenamidone	A	A	A	A	A	A	Fenoxaprop-ethyl	A	A	A	B	A	B
Methiocarb	A	A	A	A	A	A	Pentoxazone	A	A	A	B	B	B
Boscalid	C	A	A	A	A	C	Furathiocarb	A	A	A	A	A	A
Ametryn	A	A	A	A	A	A	Quizalofop-ethyl	B	A	B	B	A	B
Dimethomorph	A	A	A	A	A	A	Lufenuron	A	A	B	D	C	D
Ferimzone(E,Z)	A	D	A	A	D	D	Propaquizafop	A	A	A	B	A	B
Methoxyfenozide	A	A	A	A	A	A	Teflubenzuron	B	A	A	C	C	C
Pyrimethanil	A	A	A	A	A	A	Cloquintocet-mexyl	A	A	A	A	A	A
Dymuron	A	A	A	A	A	A	Fenpyroximate(E)	A	A	A	B	B	B
Flamprop methyl	A	A	A	A	A	A	Fenpyroximate(Z)	A	A	A	B	B	B
Cumyluron	A	A	A	A	A	A	Flufenoxuron	B	A	A	D	C	D
Chloroxuron	A	A	A	A	A	A	Hexythiazox	A	A	A	B	A	B
Butafenacil	A	A	A	A	A	A	Etoxazole	A	A	A	A	A	A
Chromafenozide	A	A	A	A	A	A	Chlorfluazuron	D	B	C	D	D	D
Iprovalicarb	A	A	A	A	A	A	Carbosulfan	B	B	A	B	D	D
Simeconazole	A	A	A	A	A	A	Spinosyn A	C	B	B	C	C	C
Triticonazole	A	A	A	B	B	B	Fenpropimorph	A	A	A	A	A	A
Flufenacet	A	A	A	A	A	A	Spinosyn D	A	A	A	A	A	A
Cyazofamide	A	A	A	B	C	C							
Epoxiconazole	A	A	A	B	B	B							
Prometryn	A	A	A	A	A	A							
Indanofan	A	A	A	A	A	A							
							Aグループ数	75	84	88	64	69	48
							Bグループ数	17	7	6	19	9	22

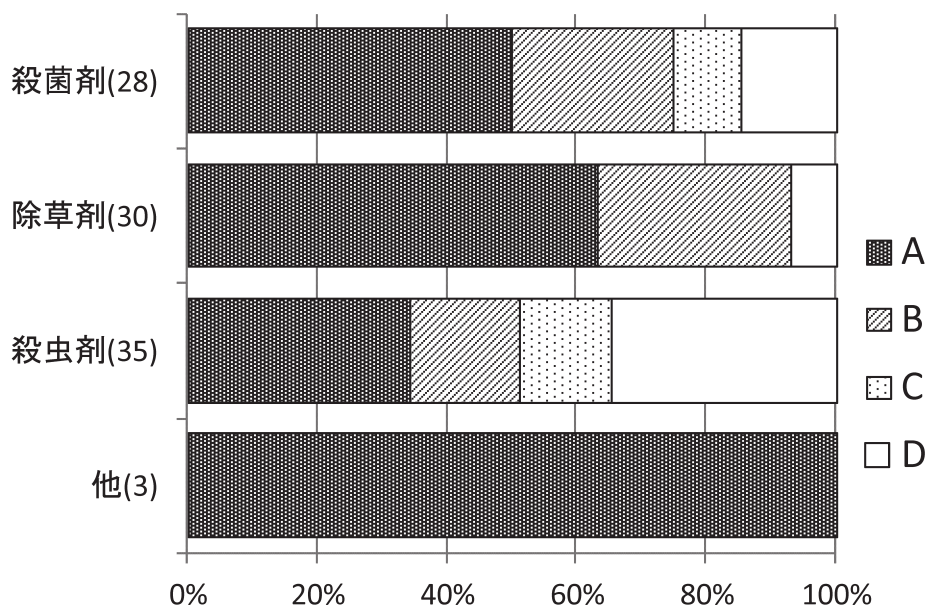


図 農薬の種類における妥当性評価のグループ分類

グループ分類を行った。図に示したように殺菌剤では28成分の内14成分（50%）、除草剤では30成分の内19成分（63%）、殺虫剤では35成分の内12成分（34%）、他の農薬3成分すべてがAグループであった。妥当性評価の目標値への達成度が低かった殺虫剤では、Bグループの6成分を含めると51%の成分がスクリーニングを含め分析可能であることがわかった。

### まとめ

通知試験法による96農薬の一斉分析法をガイドラインに従って検証した。

- 1) 本法で、全作物ガイドラインの目標値を満たした農薬は96農薬中48農薬であった。
- 2) Azinphos methyl, Tebufenozideは、ガイドラインの目標値を満たしたが、確認イオンが感度不足であり再選択が必要である。
- 3) 検量線は、1～200ng/mLの範囲で良好な直線であり、一律基準値の測定が十分可能であった。

### 文 献

- 1) 厚生労働省医薬品食品局食品安全部長通知 食安発1224第1号：“食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインの一部改正について”（平成22年12月24日）
- 2) 浦西克維，山下浩一，山本圭吾：食衛誌，**53**, 1, 63-74 (2012)
- 3) 厚生労働省医薬品食品局食品安全部長通知 食安発第1129002号：“食品に残留する農薬，飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法について（一部改正）”（平成17年11月29日）

## 奈良県におけるノロウイルス胃腸炎集団発生について —2012/2013シーズン—

米田正樹・大浦千明・浦西洋輔・稲田真知・中野 守・北堀吉映

Outbreaks of Gastroenteritis Caused by Norovirus in Nara Prefecture  
— 2012/2013 Season —

Masaki YONEDA, Chiaki OURA, Yosuke URANISHI, Machi INADA, Mamoru NAKANO  
and Yoshiteru KITAHORI

### 緒 言

ノロウイルス (Norovirus, 以下NoV) は, 冬季に多く発生がみられるウイルス性急性胃腸炎の主な原因ウイルスである. 当センターにおいても冬季に行政依頼検査が集中し, 保育園, 小学校, 老人福祉施設等で原因病原体としてNoVを検出してきた.

NoVは飛沫感染や経口感染によりヒトの小腸で増殖し, 吐物や糞便とともに排泄される. 患者から排泄されたNoVが, 手指やドアノブ等を介してヒトからヒトへ感染する. また, NoVは加熱不十分な二枚貝やウイルスに汚染された食品の喫食により引き起こされる食中毒の原因ウイルスとしても知られている. NoVは遺伝子学的多様性に富むことから, その感染予防には幅広い疫学的知見の蓄積が不可欠である.

当センターでは奈良県におけるNoVの流行状況を詳細に把握するため, 食中毒および集団感染事例を対象とし, NoVの遺伝子学的, 疫学的解析を継続的に実施している<sup>1) - 3)</sup>. 今回, 2012/2013シーズンに発生した事例について解析を行った結果, 新たに得られた知見について2011/2012シーズンまでの調査結果と併せて報告する.

### 方 法

#### 1. 調査対象事例

2012年9月から2013年8月の間に当センターにおいて県外自治体からの調査依頼事例を除く食中毒(有症苦情を含む)事例および集団感染事例(疑い事例を含む)で調査を実施した42事例のうちNoVを検出した38事例を調査対象事例とした.

#### 2. ウイルスRNA抽出およびNoV遺伝子解析

QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) を用い添付のプロトコールに従って10%糞便懸濁上清140  $\mu$ LからウイルスRNAを抽出し, プライマーCOG1F/G1-SKRおよびCOG2F/G2-SKR<sup>4)</sup>を用いたRT-PCR法によりNoVキャプシド領域の増幅を行った.

得られた遺伝子増幅産物について, BigDye Terminator Ver1.1 Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用い添付のプロトコールに従ってダイレクトシーケンスを実施した. 塩基配列を決定した後, Kageyamaら<sup>5)</sup>およびKatayamaら<sup>6)</sup>の遺伝子型番号に従って遺伝子型分類を行った. さらにG II/4に分類された株についてはNJ法により標準株を用いてクラス

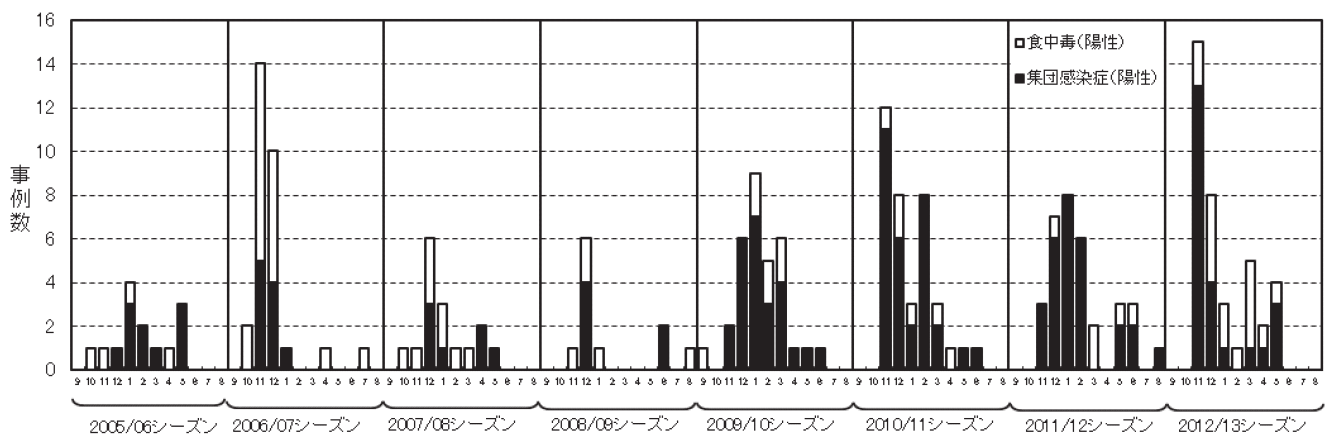


図1 ノロウイルスによる食中毒・集団感染症事例数 (当センター検出事例数)

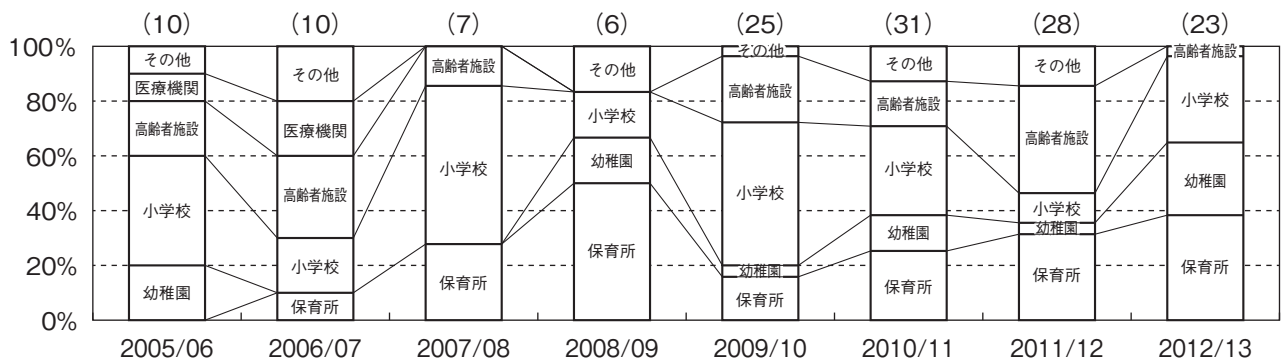


図2 ノロウイルスによる集団感染症事例の発生施設別内訳  
 図上段の（ ）内の数字は事例総数を示す

ター解析を実施した。

## 結果

### 1. NoVによる食中毒・集団感染事例の発生状況

食中毒・集団感染事例の検体採取月別発生状況は、2012年11月:15事例、12月:8事例、2012年1月:3事例、2月:1事例、3月:5事例、4月:2事例、5月:4事例であった。2012/2013シーズンは11月から3月にかけての発生が32事例と84%を占め、2009/2010シーズン以降と同様、11月から3月に明確な発生ピークが見られた(図1)。

食中毒事例数は、2006/2007シーズンの11月、12月の大きな流行以降は、1シーズン10事例を越えない程度で推移していたが、2012/2013シーズンは15事例とやや増加した。

一方、集団感染事例は、2010/2011シーズンの31事例、2011/2012シーズンの28事例と比較すると2012/2013シーズンは23事例とやや減少傾向にあった。しかし、2009/2010シーズン以降、集団感染事例が30事例前後に増加した状態で推移している。

集団感染事例23事例について発生施設別に区分す

ると、保育所:9事例(39%)、幼稚園:6事例(26%)、小学校:7事例(30%)、介護老人保健施設等の高齢者施設:1事例(4%)であった。2012/2013シーズンは幼稚園および小学校での事例の割合が増加した。一方で高齢者施設での事例は1事例に留まった(図2)。

2005/2006シーズンから2012/2013シーズンまでの8シーズンの間に発生した集団感染事例について発生地域を市町村別に区分した結果を示した(表1)。調査した8シーズンに渡って継続的に発生した地域は存在せず、奈良市内を除く事例については奈良県内での集団事例の発生地が移り変わっているこれまでの傾向に変化はなかった。

### 2. 遺伝子解析結果

2012/2013シーズンに検出したNoVの遺伝子型を表2に示した。全38事例の内訳は、GI単独によるものが2事例(5%)、GII単独によるものが33事例(87%)、GIとGIIの複合事例が3事例(8%)と2012/2013シーズンもこれまでのシーズンと同様GIIによるものが圧倒的多数であった。ダイレクトシーケンスによる遺伝子解析を実施した32事例のうち、GII/4に分類された事

表1 ノロウイルスが検出された集団感染症の市町村別発生状況(当センター検出分)

発生地	2005/06	2006/07	2007/08	2008/09	2009/10	2010/11	2011/12	2012/13	合計
生駒市	0	0	1	4	3	0	5	5	18
広陵町	1	1	1	0	1	6	4	3	17
天理市	0	0	1	1	3	2	5	1	13
宇陀市	3	0	0	0	5	3	0	2	13
大和高田市	0	1	0	0	2	1	3	2	9
大和郡山市	0	0	0	0	1	3	2	3	9
葛城市	0	2	0	0	1	5	1	0	9
橿原市	0	0	0	0	1	1	2	1	5
斑鳩町	1	0	1	0	1	1	0	1	5
その他	5	6	3	1	7	9	6	5	42
合計	10	10	7	6	25	31	28	23	140

表2 検出されたノロウイルスの遺伝子型 (2012/2013シーズン)

	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	遺伝子型別合計
G I /6				1*			1*	1					3*
G I (Genotype未同定)							2*						2*
G II /2									1				1
G II /4			15	7*	3		4*						29*
G II /14									1				1
G II (Genotype未同定)				1		1		1	2				5
事例数合計			15	8*	3	1	5*	2	4				38*

※: 複数の遺伝子型が検出された混合事例(12月1事例、3月2事例)を含む。

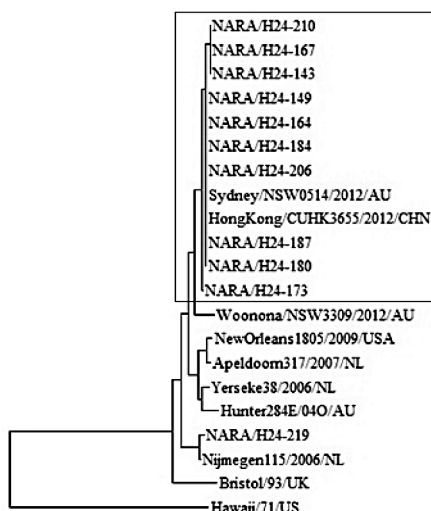


図3 G II/4株のキャプシド領域の塩基配列を用いた系統樹 (282bp)

例が29事例 (91%) と最も検出頻度が高く、G II/4は、依然として他の遺伝子型より出現率の高い状態を維持していた。また、2005/2006シーズン調査を開始して以来、初めてG II/14による事例を1事例 (3%) 確認した。

さらに、G II/4に分類された29事例のうち11事例のウイルス株について、得られたキャプシド領域の塩基配列から参照株を用いた分子系統樹解析を実施した (図3)。結果、10株は2012/2013シーズン新たに遺伝子変異を生じ国内でも流行が確認されている Sydney/NSW/0514/2012/AU<sup>7)</sup> と同じクラスター (図中の□部分) に分類された。一方、2006/2007シーズン以降流行が継続していた Nijmegen115/2006/NL<sup>8)</sup> のクレードに分類されたウイルス株は県内東部山間部の小学校で発生した1事例に留まった。また、2011/2012シーズン流行していた NSW001P/2008/AU と同じクラスターに分類された株はなかった。以上のことから2012/2013シーズン流行したG II/4は Sydney/NSW/0514/2012/AU のクレードに属するウイルス株による流行が主体であったことが明らかとなった。

## 考 察

2012/2013シーズンの奈良県内におけるNoVによる食中毒・集団感染症事例について調査した。今シーズンは特記すべき大規模事例はなく、流行季に変化はみられなかった。過去に大きな流行を起こしたG II/4による事例が全38事例中29事例 (76%) を占め、依然として公衆衛生上の大きな驚異となっている。遺伝子解析の結果、2012/2013シーズンはG II/4の変異によって2011/2012シーズンまで流行していた Nijmegen115/2006/NL や NSW001P/2008/AU のクレードに属する株から Sydney/NSW/0514/2012/AU のクレードに属する株へと大きくシフトした。Sydney/NSW/0514/2012/AU のクレードに属する株は国内各地で確認されており<sup>7)</sup>、これらの株の発生によってウイルスの抗原性に変化が生じたと推測されている。この影響もあって2012/2013シーズンは国内では2006/2007シーズンに次ぐ大きな流行シーズンとなった。今後も継続的にG II/4変異株の発生動向に注視することは重要であると考えられる。

発生地域については2005/2006シーズンに調査を開始して以降、ノロウイルスによる集団感染事例が奈良県内で長期継続的に発生している地域は存在していない。大和平野部を中心に市街地での発生がほとんどであることから、ヒト-ヒト感染によると推測されるウイルス特有の発生様式をあらわした結果と考えられる。2012/2013シーズンの遺伝子解析の結果では、以前から流行していた Nijmegen115/2006/NL のクレードに属するウイルス株は東部山間部でのみ確認された。これは市街地で瞬く間に Sydney/NSW/0514/2012/AU のクレードに属する株が流行していった一方で、生活の場が異なる山間部では Sydney/NSW/0514/2012/AU のクレードに属する株の驚異にさらされなかったことによるものと考えられる。今後このような集団は Sydney/NSW/0514/2012/AU のクレードに属するウイルスの脅威にさらされる可能性を完全に否定することはできない。また、市街地と山間部では新種病原体ウ



イルスの流行に時差を生じさせることを示唆させた事例であったと考えている。

本報告が示すように長期にわたって調査を継続し様々な疫学情報を蓄積することは、NoVの長期的な発生動向を把握するために必要である。今後はNoVの解析に関し、遺伝子型や発生地域だけでなく、患者情報、感染性胃腸炎患者報告数、ロタウイルスやサポウイルス等の他の胃腸炎ウイルスの発生動向等とあわせて多角的に解析していくことが重要であると考えている。

## 文 献

- 1) 米田正樹, 他: 奈良県保健環境研究センター年報, **45**, 87-88, (2010)
- 2) 米田正樹, 他: 奈良県保健環境研究センター年報, **46**, 65-67, (2011)
- 3) 米田正樹, 他: 奈良県保健環境研究センター年報, **47**, 61-64, (2012)
- 4) 厚生労働省医薬食安全部監視安全課長通知食安監発第1105001号「ノロウイルスの検出法について」, 平成15年11月5日
- 5) Kageyama T, *et al.*, : *J. Clin. Microbiol.*, **42**, 2988-2995, (2004)
- 6) 国立感染症研究所感染症情報センターホームページ: ノロウイルスの遺伝子型 (<http://idsc.nih.go.jp/pathogen/refer/noro-kaisetu1.html>)
- 7) 国立感染症研究所感染症情報センターホームページ: <速報>ノロウイルスGII/4の新しい変異株の遺伝子解析と全国における検出状況 (<http://www.nih.go.jp/niid/ja/norovirus-m/norovirus-iasrs/2957-pr3942.html>)
- 8) 国立感染症研究所, 厚生労働省健康局結核感染症課: 病原微生物検出情報, **31** (11), 369, (2010)

## 感染症発生動向調査による奈良県の患者発生状況：平成25年（2013年）

稲田真知・大浦千明・浦西洋輔・米田正樹・中野 守・北堀吉映

The Status of Infection Diseases in Nara Prefecture, 2013

Machi INADA・Chiaki OURA・Yosuke URANISHI・Masaki YONEDA・Mamoru NAKANO  
and Yoshiteru KITAHORI

### 緒 言

感染症発生動向調査は、平成11年4月から施行された「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律」（感染症法）の大きな柱に位置づけられている。感染症患者発生の情報について、正確に把握・分析し、その結果を国民や医療関係者への確に提供・公開することにより、感染症発生の予防や蔓延を防止することを目的に、医師等の医療関係者の協力をうけ、全国的に実施されている。奈良県でも、感染症発生動向調査の結果を迅速かつ的確に活用し、事前対応型の感染症予防対策とするため、奈良県感染症発生動向調査事業実施要綱、同要領に基づき調査を実施している。

今回、本県の平成25年の患者発生状況についてとりまとめたので報告する。

### 方 法

全数把握対象疾患は、診断した全ての医師が保健所に届出を行い、発生状況を把握している。また、定点把握対象疾患は、知事が指定した定点医療機関（79機関）を受診した患者数を把握することで流行状況を調査している。

平成25年には追加等された対象疾患は以下のとおりである。3月に重症熱性血小板減少症候群（SFTS）（四類）の追加。4月にそれまでの髄膜炎菌性髄膜炎から侵襲性髄膜炎菌感染症へ変更、同時に侵襲性インフルエンザ菌感染症、侵襲性肺炎球菌感染症（すべて五類全数）の追加、10月に基幹定点における感染性胃腸炎（ロタウイルスによるものに限る）が追加された。また、5月には鳥インフルエンザ（H7N9）が指定感染症とされた。

平成25年に届出のあった全数把握対象疾患及び報告のあった定点把握対象疾患について、感染症サーベイランスシステム（NESID）より情報を収集・解析した。

### 結 果

#### 1. 全数把握対象疾患の発生状況

平成25年の患者届出数を表1に示す。

表1 奈良県における全数把握対象疾患届出数

類別	疾患名	届出数
二類	結核	343
三類	細菌性赤痢 腸管出血性大腸菌感染症	1 30
四類	チクングニア熱 デング熱 マラリア ライム病 レジオネラ症	1 2 2 1 12
五類	アメーバ赤痢 ウイルス性肝炎 クロイツフェルト・ヤコブ病 劇症型溶血性レンサ球菌感染症 後天性免疫不全症候群 ジアルジア症 侵襲性肺炎球菌感染症 梅毒 破傷風 風しん	8 2 8 1 8 1 9 8 2 185

診断日による集計

#### 1) 一類感染症

届出はなかった。

#### 2) 二類感染症

結核343例の届出があり、昨年の425件から大きく減少し、一昨年並となった。類型は、患者243例、無症状病原体保有者91例、疑似症患者8例及び感染症死亡疑いの者の死体1例であった。患者の病型は、肺結核が184例、その他の結核（結核性胸膜炎、リンパ節結核等）が52例、肺結核及びその他の結核が7例であった。全届出例の年齢階層は、10歳未満15例、10歳代9例、20歳代19例、30歳代25例、40歳代44例、50歳代25例、60歳代44例、

70歳代69例, 80歳代77例, 90歳代16例で, 80歳代が最も多く, 70歳以上が全体の47.2%を占めていた.

### 3) 三類感染症

細菌性赤痢 1例, 腸管出血性大腸菌感染症30例の届出があった.

細菌性赤痢 1例は40歳代男性で, 菌型が*S. sonnei*, 感染地域はインドであった.

腸管出血性大腸菌感染症は, 昨年の17例から増加した. 類型は, 患者24例, 無症状病原体保有者が6例で, その年齢階層は, 10歳未満が2例, 10歳代が5例, 20歳代5例, 30歳代6例, 40歳代2例, 50歳代2例, 60歳代6例, 70歳代1例及び80歳代1例であった. 血清型・検出病原体は, O157が25例 (VT1 & VT2が21例, VT1が1例, VT2が3例), O26が3例 (VT1が3例), O111が1例 (VT1), 不明が1例であった. この不明事例は血清抗体陽性で届出されている30歳代女性で, 溶血性尿毒症症候群 (HUS) を発症しており, 発症5日前の焼き肉が原因と推定されている. 前年度に, 牛生レバーの喫食が禁止され, 生食用食肉についても規格基準等が設定されたことから, 腸管出血性大腸菌感染症の届出は, 減少傾向が続くとみられたが, 平成25年は増加している. 感染経路としては, 推定ではあるが経口感染が15例, 接触感染が2例, 不明が13例であった.

### 4) 四類感染症

チクングニア 1例, デング熱 2例, マラリア 2例, ライム病 1例, レジオネラ症12例の届出があった.

チクングニア熱は, 平成23年2月より全数報告対象疾患となっており, 本県で初めての届出となった. 患者は, 20歳代女性で, 感染推定地域はフィリピンとされている.

デング熱 2例の病型はデング熱型で, とともに「動物・蚊・昆虫等からの感染」とされている. 3月届出の1例は20歳代女性, 2月にタイ, カンボジア, ベトナムで感染 (推定), 10月届出の1例は, 40歳代男性, 9月末にインドネシアジャカルタで感染 (推定) とされている.

マラリア 2例の病型は, とともにマラリア熱型で, 6月15日発病の40歳代女性と6月16日発病の70歳代女性であった. とともに, ケニア滞在中の動物・蚊・昆虫等からの感染が原因とされている. 70歳代女性はDICを発症した.

ライム病は, 本県での初めての届出である. 患者は30代男性で, 6月下旬の北海道でのマダニ刺咬が原因と確定されている.

レジオネラ症12例の病型はすべて肺炎型で, 男性が10例 (60歳代6例, 70歳代2例, 80歳代2例) 女性

が2例 (80歳代及び90歳代それぞれ1例) となっている. 推定感染経路は水系感染が5例, 塵埃感染が1例, 不明が6例となっている.

### 5) 五類感染症

アメーバ赤痢 8例, ウイルス性肝炎 2例, クロイツフェルト・ヤコブ病 8例, 劇症型溶血性レンサ球菌感染症 1例, 後天性免疫不全症候群 8例, ジアルジア症 1例, 侵襲性肺炎球菌感染症 9例, 梅毒 8例, 破傷風 2例, 風しん185例の届出があった.

アメーバ赤痢の病型は, 腸管アメーバ症 6例, 腸管外アメーバ症 2例であった. その年齢階層は, 男性が20歳代, 30歳代, 40歳代がそれぞれ1例, 50歳代が3例, 70歳代1例, 女性が80歳代1例であった. 感染原因は, 経口感染が2名, 性的接触2名, 不明4例であった.

ウイルス性肝炎 2例は, 20歳代と40歳代のそれぞれ男性で, とともにB型, 推定感染経路は性的接触であった.

クロイツフェルト・ヤコブ病 8例の病型は古典型 5例, 医原性 1例, 家族性 1例, その他 1例であった. 年齢階層は, 男性が60歳代 2例, 70歳代 3例で, 女性が40歳代, 60歳代, 70歳代それぞれ1例であった. 40歳代女性が医原性で, 1987年に使用されたヒト乾燥硬膜が感染原因と推定されている.

劇症型溶血性レンサ球菌感染症 1例は, 50歳代男性, 血清群はA群であった.

後天性免疫不全症候群 8例の病型は, AIDS 4例, 無症候性キャリア 4例であった. すべて男性で, 20歳代 1例, 40歳代及び50歳代がそれぞれ2例, 60歳代 1例, 70歳代 2例であった. 感染原因・感染経路は, 性的接触 6例 (同性間 5例, 不明 1例), 輸血 (20年以上前ブラジルで) 1例, その他 (カミソリの使い回し) 1例であった.

ジアルジア 1例は20歳代男性で, 発病前2年間のエクアドル渡航中の経口感染が感染経路と推定されている.

侵襲性肺炎球菌感染症 9例は, 男性が10歳未満 1例, 60歳代 1例, 70歳代 2例で, 女性が50歳代 2例, 60歳代 1例, 80歳代 2例であった. 5月とその前後に発病しているのが6例, 12月に発病しているのが3例で, 季節性があるように見える. 感染経路は, 飛沫感染が3例, 接触感染が1例, 不明が5例であった.

梅毒 8例の病型は早期顕症梅毒 3例 (I期 1例, II期 2例), 無症候 5例であった. 性別, 年齢階層は, 男性が30歳代及び50歳代それぞれ2名, 女性が30歳代, 50歳代, 60歳代及び70歳代それぞれ1名, 感染経路は性的接触が5例, 不明3例であった.

破傷風は平成19年 (2007年) 以来の患者発生であった. 40歳代及び50歳代の男性で, 2例とも診断方法

は臨床症状からの診断であった。

風しんは185例と前年に比べて大きく増加した。なお、診断日12月31日の1例を含む。全国で平成24年から流行の始まった風しんは、県内では平成24年9月には終息したかに見えたが、平成25年に入ると報告が始まり、その後徐々に増加、5月には73例/月まで増加した(図1)。

全国的な風しんワクチン接種補助事業開始に合わせて本県でも5月末から一部市町で補助を開始、その後全県的に補助が開始された。風しんで最も危惧されるのは、先天性風しん症候群の発生である。幸い、平成26年6月現在、本県では先天性風しん症候群の届出は無い。

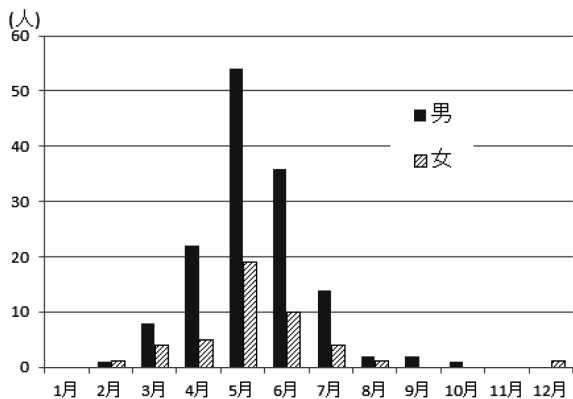


図1 月別・男女別風しん患者数

患者の年齢階層は、男性が10歳未満4例、10歳代15例、20歳代34例、30歳代42例、40歳代26例、50歳代16例、60歳代3例の計140例、女性は10歳未満5例、10歳代6例、20歳代17例、30歳代8例、40歳代4例、50歳代4例、60歳代1例の計45例、ともに70歳代以上は無い。

就労世代の男性を中心に流行し、特に女性では妊娠可能性女性を中心に流行した。これは、風しんワクチンの接種が、平成25年当時30～40代の女性には中学3年生時に風しんの定期接種があったが男性は対象外であったこと、それ以下の年齢では、男女とも個別接

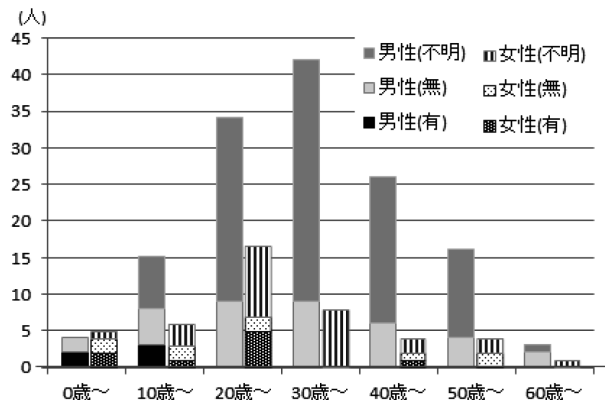


図2 年齢別・性別・ワクチン接種歴別風しん患者数

種となり接種率が低下したことによる。

ワクチン接種歴については、有が14例(男性4～16歳で5例、女性1～26歳8例、48歳1例)で、うち2回接種が4例あった。接種歴無は46例(男性37例、女性9例)、不明125例(男性98例、27例)であった(図2)。

推定感染経路の記載がある30例では、家族12例、職場・学校15例、交通機関3例で、家族は父からが5例、夫3例、その他兄弟等が4例であった。

## 2. 定点把握対象疾患の流行状況

県内の定点医療機関数を表2に示す。平成25年夏に内吉野保健館内の小児科定点が閉院により1減少した。

表2 患者定点医療機関数(平成25年4月現在)

地区 保健所	北部		中部		南部		合計
	奈良市	郡山	桜井	葛城	内吉野	吉野	
インフルエンザ定点	11 (5)	16 (2)	11 (5)	11 (3)	3 (1)	3 (2)	55 (18)
小児科定点	7 (4)	10 (2)	7 (3)	7 (3)	2 (1)	2 (2)	35 (15)
眼科定点	1	3	2 (1)	2	-	1	9 (1)
基幹定点	1 (1)	2 (2)	1 (1)	1 (1)	1 (1)	-	6 (6)
性感染症定点	3	2	2	2	-	-	9

( )内は、病原体定点数

### 1) 週単位報告対象疾患(週報)

週報対象の18疾患について、週別患者報告数を表3に示す。ほとんどが、全国より低かった。なお、基幹定点対象疾患の感染性胃腸炎(ロタウイルスに限る)は、第42週から報告対象となっている。

平成25年の年間定点当たり報告数で、上位5疾患は、①インフルエンザ、②感染性胃腸炎、③手足口病、④水痘、⑤A群溶血性レンサ球菌咽頭炎であった。これらについて、奈良県と全国の定点当たり報告数の推移を図3～7に示す。

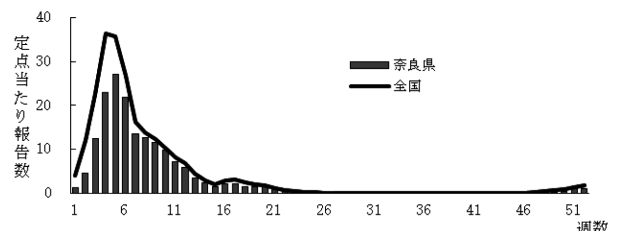


図3 インフルエンザ

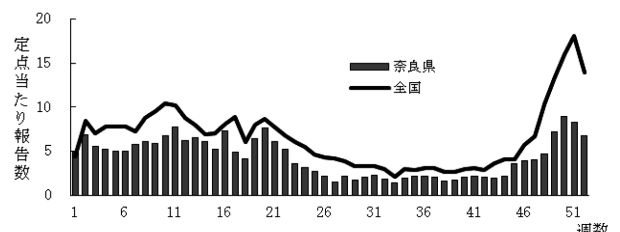


図4 感染性胃腸炎



表3 平成25年 週単位報告対象疾患 報告数

定点	疾患名\週	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29			
※	インフルエンザ	70	251	682	1264	1489	1208	738	700	637	540	393	326	185	125	80	116	113	81	76	81	66	27	19	16	5	3	1					
	RSウイルス感染症	24	18	7	17	10	21	13	12	31	16	18	13	5	5	11	5	7				3	3	3		3	1	2	1				
	咽頭結膜炎	3	10	7	4	9	12	2	5	12	13	7	16	12	9	14	17	10	20	16	22	14	15	20	22	18	10	14	7	4			
	A群溶連菌咽頭炎	11	31	20	25	33	29	26	35	21	37	30	21	19	16	29	27	27	18	44	39	46	37	50	31	20	25	16	24	15			
	感染性胃腸炎	171	240	193	184	177	176	201	212	207	235	270	218	228	214	182	255	172	145	225	269	215	184	125	110	95	75	53	75	58			
	水痘	25	32	25	29	24	37	19	27	16	21	26	24	23	21	42	17	28	27	44	30	46	39	35	30	18	13	20	19	15			
	手足口病	1	1	1	1	2	2	2	1	1	1	1	1	1	1	3	5	10	5	2	7	7	23	32	41	45	47	82	152	195	194		
	伝染性紅斑	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2				1	2									
	伝染性発しん	6	5	9	8	7	11	8	12	7	10	10	12	11	7	13	12	12	7	14	15	16	12	9	14	15	17	16	13	10			
	百日咳	1																															
	ヘルパンギーナ	4	2	4	3	1	2	1	2	1	2	6	1	1	1	1	3	2	3	3	3	2	4	2	11	16	29	43	39	54			
	流行性耳下腺炎																																
	急性出血性結膜炎																																
	流行性角結膜炎	8	2	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	4	4	2	1	6	3	6	3	4	4	3	5	5	5				
	細菌性髄膜炎																																
無菌性髄膜炎																																	
マイコプラズマ肺炎	6	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1		
クラミジア肺炎																																	
感染性胃腸炎 (ロタウイルス)																																	
定点	疾患名\週	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	合計	定点当たり報告数	定点当たり報告数	(全国) 定点当たり報告数					
※	インフルエンザ	5	6	5	4	4	10	3	19	46	22	26	23	36	48	31	36	30	31	32	54	45	67	73	916	175.39	26,94	237.19					
	RSウイルス感染症	10	11	1	7	7	3	3	4	6	7	5	3	4	2	2	7	12	20	18	38	24	21	570	16.76	16,76	23.22						
	咽頭結膜炎	14	8	10	7	11	8	5	20	4	10	8	13	14	18	22	9	13	21	34	21	24	23	1134	33.35	33,35	80.8						
	A群溶連菌咽頭炎	70	76	61	48	67	75	73	68	56	58	70	74	68	67	73	121	134	136	159	245	304	282	230	7779	228.79	228,79	340.88					
	感染性胃腸炎	12	17	19	15	15	8	9	20	20	15	22	21	13	15	15	16	16	20	23	24	32	33	49	1221	35.91	61.53	55.69					
	水痘	187	164	200	126	85	96	88	63	41	32	31	28	13	16	13	8	3	17	8	4	3	5	3	2092	61.53	61,53	96.54					
	手足口病	9																							32	0.94	0,94	3,22					
	伝染性紅斑	6	17	10	10	16	18	7	11	8	9	14	12	10	8	9	14	8	7	6	8	8	10	5	549	16.15	16,15	28.47					
	突発性発しん																								1	0.03	0,03	0,53					
	百日咳	70	78	61	36	38	38	24	25	12	4	4	1	2	3	2	2								615	18.09	18,09	30.15					
	ヘルパンギーナ	6	5	7	5	4	2	3	1	5	4	4	4	4	6	2	6	3	2	6	3	4	6	1	154	4.53	4,53	13.05					
	流行性耳下腺炎																								7	0.78	0,78	0,98					
	急性出血性結膜炎	6	6	1	1	3	3	3	5	4	2	5	8	2	2	3	3	1	5	1	3	3	2	3	146	16.22	16,22	30.25					
	流行性角結膜炎	1																							8	1.33	1,33	0.95					
	細菌性髄膜炎																								17	2.83	2,83	2,43					
無菌性髄膜炎	1																							25	4.17	4,17	24.04						
マイコプラズマ肺炎																								0	0.0	0,0	1,59						
クラミジア肺炎																								3	0.5	0,5	0,34						
感染性胃腸炎 (ロタウイルス)																																	

\*インフルエンザ  
A群溶血性レンサ球菌咽頭炎はA群溶連菌咽頭炎と表示している



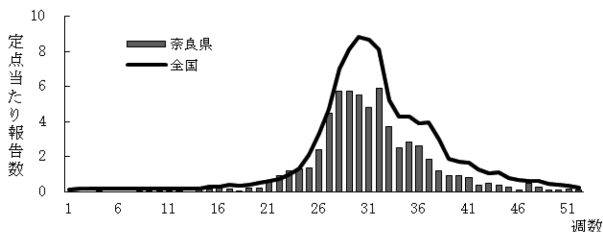


図5 手足口病

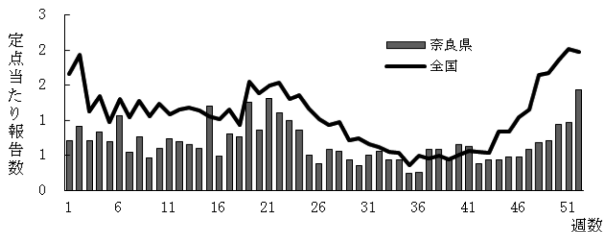


図6 水痘

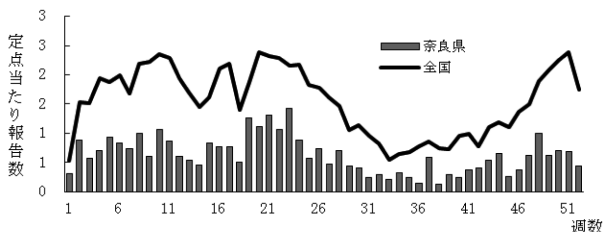


図7 A群溶血性レンサ球菌咽頭炎

### (1) インフルエンザ

年間の全報告数は、9,471件で、急増した平成24年の14,568件より減少した。最も報告数が多かったのは、第5週の1,489件（定点当たり27.07）で、警報開始基準値（30）は超えなかった。

### (2) 感染性胃腸炎

例年、上位5疾患では1位となる感染性胃腸炎が、平成25年は大きく減少した。例年、晩秋からの急増が年末あたりにピークとなるが、平成25年はそのピー

クが低かったためと思われる。ピークは、第50週の304件（同8.94）で、全国では51週、定点当たり18.12であった。

### (3) 手足口病

平成23年には全国的にも大流行となり、定点当たりの報告数が過去10年間で最も多く、逆に平成24年には過去10年間で最も少なくなった手足口病だったが、平成25年は再度急増し、平成23年に次ぐ患者数となった。主に原因となったウイルスが2種類あったようで、2歳以下の乳幼児では、この年だけで2度罹患した子もいたようである。

### (4) 水痘

概ね、全国と同様の推移を示したが、ほぼ全国より少なめであった。

水痘は、不顕性感染が無い場合、ワクチンを接種していないと必ず罹患する。そのため、出生率との比較により、本サーベイランスの精度の指標として使用されることもある。同様に突発性発疹も生後半年から2年ほどでほぼすべての乳児が罹患する疾患であることから指標とされる。

### (5) A群溶血性レンサ球菌咽頭炎

概ね、全国と同様の推移であったが、定点当たり報告数は、年間をとおして全国より低かった。

### 2) 月単位報告対象疾患（月報）

月報対象の性感染症4疾患及び薬剤耐性菌感染症4疾患について月別の報告数を表4に示す。

性感染症としては、目立った動きはない。4疾患とも男性が圧倒的に多い。また、10～14歳で性器クラミジア感染症が男1例、女1例、淋菌感染症が女1例でみられた。

表4 平成25年 月単位報告対象疾患 報告数

		1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	合計	
性感染症	性器クラミジア感染症	男	5	10	7	2	6	3	12	2	8	7	5	4	71
		女	2	1	2	2	3	4	4	2	2	1	1	2	26
	性器ヘルペス	男	2	2	1	1	2	4	3	1	2		2	1	21
		女	2	2		1	1	1		1		4	3		15
	尖圭コンジローマ	男	1	2	3	1							2	1	10
		女						1						1	2
薬剤耐性菌感染症	淋菌感染症	男	8	7	1	2	1	3	2	2	2	4	4	5	41
		女		1				1	1		1		1		5
	メチシリン耐性黄色ブドウ球菌感染症	男	21	23	10	28	18	21	25	14	20	27	18	22	247
		女	11	5	7	13	14	4	17	15	11	14	8	10	129
	ペニシリン耐性肺炎球菌感染症	男	7	5		13	5	2	9	5	3	7	3	5	64
		女	4	5	5	5	5	6	4	4	3	5	7	3	56
	薬剤耐性緑膿菌感染症	男	1							1			1		3
		女												1	1
	男													0	
	女													0	

薬剤耐性菌感染症については、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌感染症が平成25年も定点当たり60を越えた。メチシリン耐性黄色ブドウ球菌感染症及びペニシリン耐性肺炎球菌感染症は、0歳児の報告が最も多く、年齢が上がると報告数は低下し、60歳代から増加、薬剤耐性緑膿菌感染症は、小児は報告が無く、60歳代で4例のみであった。

### 考 察

平成25年の特徴は、風しんの大流行と手足口病の流行である。流行期には週報・ホームページ等に最新の流行状況をわかりやすく掲載することに努めた。

また、1月には、本邦では初めて確認されたSFTSや3月末に中国で鳥インフルエンザAH7N9のヒトへの感染が報告されたことから、情報収集・提供に努めた。SFTSは本県での発生が無く、鳥インフルエンザAH7N9も国内への侵入は無かったが、今後も感染症に関する情報収集と迅速な情報提供を心がけたい。

### 謝 辞

感染症発生動向調査事業にご協力いただきました奈良県医師会及び関係機関の方々に、深謝いたします。

### 参考資料

- 1) 厚生労働省，国立感染症研究所：感染症週報

## 第3章 調査研究・報告

### 第3節 資 料

## 食品中の放射性セシウムの検査状況（平成23年度～平成25年度）

柚田有加・木本聖子・城山二郎・岡山明子

Results of the Radioactive Cesium in Foods (H23～H25)

Yuka SOMADA・Seiko KIMOTO・Jirou SHIROYAMA and Akiko OKAYAMA

### 緒言

平成23年3月に発生した福島第一原子力発電所の事故以降、食品中の放射性物質による健康被害が懸念されることから、機器と検査体制の整備が緊急課題となった。また、平成24年4月には暫定規制値に代わる新たな基準値が施行<sup>1)</sup>され、一般食品が100 Bq/kg、乳幼児食品及び牛乳が50 Bq/kg、飲料水が10 Bq/kgに引き下げられた。奈良県には平成24年10月に消費者庁国民生活センターよりNaIシンチレーションスペクトロメーター（以下、NaI）が貸与され、スクリーニング検査を実施することになった。今回、平成23年7月から平成26年3月までに搬入された検体の検査結果について報告する。

### 方法

#### 1. 試料

平成23年7月から平成26年3月末までに奈良県内で流通及び製造された食品222検体を用いた。

検査方法は「緊急時における食品の放射能測定マニュアル」<sup>2)</sup>及び「食品中の放射性セシウムスクリーニング法」<sup>3)</sup>に準じて行った。

#### 2. 対象核種

セシウム134 (Cs-134)、セシウム137 (Cs-137)

#### 3. 測定

測定機器はSEIKO EG&G社製のゲルマニウム半導体検出器 (Ge検出器) とガンマデータ・インストルメント社製のNaI (Tl) 検出器を使用した。

### 結果

食品群及び測定機器ごとの検体数を表1に、その中で放射性セシウムが検出された検体数を表2に示した。表3には放射性物質が検出された検体の測定結果を示した。

表1 食品群及び測定機器ごとの検体数

食品群	H23		H24		H25	
	Ge	Ge	NaI	Ge	NaI	Ge
野菜類	8	44	19	8	93	
穀類	1	12	1	4	3	
キノコ類	2	2	0	1	1	
飲用茶	0	3	0	2	0	
魚介類	1	2	0	2	0	
飼料	2	1	0	1	0	
牛乳	0	0	0	2	0	
肉類	5	1	0	1	0	
合計	19	65	20	21	97	

表2 放射性セシウム検出検体の内訳

食品群	H23	H24	H25
野菜類	0	0	0
穀類	0	3	0
キノコ類	1	1	1
飲用茶	0	0	0
魚介類	0	0	0
飼料	0	0	0
牛乳	0	0	0
肉類	4	0	0
合計	5	4	1

222検体のうち、放射性セシウムが検出されたのは10検体で、穀類、キノコ類、肉類から検出された。

平成23年度に搬入された肉類（4検体）からは総セシウムとして15～45 Bq/kg、キノコ類（1検体）からは11 Bq/kgが検出された。これらの測定結果は、当時の暫定規制値（肉・卵・魚・その他）である500 Bq/kg、現在の基準値（一般食品）100 Bq/kgも下回る結果であった。セシウムが検出された4検体の肉類は、放射性セシウムによって汚染された稲わらを飼料として与えられた牛のものであった。

平成24年度にはキノコ類(1検体)から総セシウムとして0.7 Bq/kg, 県外産米(3検体)から0.4~1.8 Bq/kg検出された。

平成25年度はキノコ類(1検体)から総セシウムとして13 Bq/kgが検出された。

表3 放射性セシウムの検査結果

年度	試料	(Bq/kg)	
		測定結果(検出限界)	
		Cs-134	Cs-137
H23	キノコ	4.4 (0.7)	6.6 (0.8)
	肉	17 (13)	17 (16)
	肉	6.6 (6.1)	8.7 (7.3)
	肉	21 (7.9)	24 (7.2)
	肉	14 (6.3)	12 (8.4)
H24	米	0.6 (0.3)	1.2 (0.4)
	米	0.6 (0.3)	1.0 (0.3)
	米	N.D (0.4)	0.4 (0.4)
	キノコ	N.D (0.4)	0.7 (0.4)
H25	キノコ	3.5 (2.4)	9.1 (2.3)

### 考 察

キノコ類からは毎年度放射性セシウムが検出されている。キノコ類は野菜類の中でも放射性セシウムを取り込みやすいことがよく知られている。寺田らの報告<sup>4) 5)</sup>によると、培地濃度に応じて高い放射性セシウム濃度の子実体が形成されることが明らかになっており、シイタケ等の栽培で用いられる原木や、培地に使われているオガ粉の管理が重要であると報告されている。当センターで放射性セシウムが検出されたキノコ類はすべて原木しいたけであったことから、栽培に使用される資材等にも留意する必要がある。

原子力発電所の事故直後、Cs-134及びCs-137はほぼ1:1の割合で放出された。それぞれの物理学的半減期がCs-134は約2年、Cs-137は約30年である<sup>6)</sup>ことから、その存在比率は年々変化していると推測される。当センターで検出された放射性セシウムは微量だが、Cs-137に対するCs-134の減少傾向がみられた(図1)。

また、県内に流通している食品から放射性物質はほとんど検出されず、検出されたものも基準値を大きく下回る結果であった。このことは、食品をとりまく放射性物質に関する監視体制が機能していることを示している。しかし、事故自体が収束したわけではなく、放射性物質の環境への放出は続いている。食品中の放射性物質に関する県民の関心は未だ高く、県民の食の安全・安心を確保するためにも、食品中の放射性物質検査は今後も継続する必要がある。

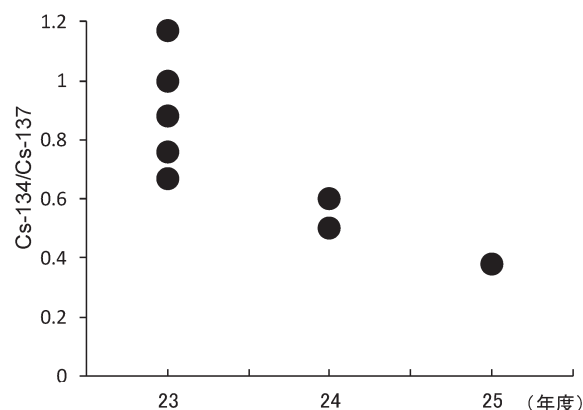


図1 検出した放射性セシウムの存在比率

### 文 献

- 1) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知, 食安発0315第1号, 平成24年3月15日
- 2) 厚生労働省医薬食品局保健部監視安全課, 緊急時における食品の放射能測定マニュアル, 平成14年3月
- 3) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課, 食品中の放射性セシウムスクリーニング法, 平成24年3月1日
- 4) 寺田宙, 山口一郎: 保健医療科学, **60** (4), 300-305 (2011)
- 5) 杉山英男, 寺田宙, 他: *RADIOISOTOPES*, **42**, 683-690 (1993)
- 6) 自然科学研究機構 国立天文台編, 理科年表 平成24年(机上版), 476 (2011)



## マイクロチップ電気泳動装置を用いた結核菌JATA(12)-VNTR法の検討

琴原優輝・辻本真弓・田邊純子・田口和子・大前壽子

Study of JATA(12)-VNTR Method for *Mycobacterium tuberculosis*  
with Microchip Electrophoresis System

Yuki KOTOHARA・Mayumi TSUJIMOTO・Sumiko TANABE・Kazuko TAGUCHI and Hisako OHMAE

### 緒言

奈良県では、結核対策に資することを目的に平成25年度から「奈良県結核菌分子疫学調査事業」を開始した。その中で当センターは、収集された結核菌株について遺伝子解析を実施する機関として位置づけられ、遺伝子型別法の一つであるVariable numbers of tandem repeats (VNTR) 法を実施している。

VNTR法は、結核菌ゲノム上の繰り返し配列のコピー数を分析して型別を行う方法である。PCRを基本とするため導入しやすく、結果を数値化できるためデータの比較や蓄積が容易という特徴がある。

当センターでは、前田ら<sup>1)</sup>により国内標準法として提唱されているJapan Anti-Tuberculosis Association (JATA) (12)-VNTR法を実施するにあたり、効率のよい解析と迅速な結果報告を行うためマイクロチップ電気泳動装置を使用した方法について検討したので報告する。

### 材料と方法

#### 1. 材料

平成26年1月末までに当センターへ搬入された結核菌株27株から抽出したDNAと、結核予防会結核研究所から配布された精度管理用DNA溶液1検体の計28検体を用いた。搬入された小川培地上の菌は、TE緩衝液に懸濁し、ヒートブロックで95℃15分の加熱処理後に凍結融解させ、遠心分離した上清をDNA抽出液とした。

#### 2. 方法

JATA (12)-VNTR法は、前田らによる方法<sup>1)</sup>を参考に実施した。

##### 1) PCR反応

熱処理94℃5分の後、熱変性94℃30秒、アニーリング

63℃30秒、伸長72℃3分の増幅反応を35サイクル行う条件で実施した。

##### 2) 電気泳動

得られたPCR産物は、マイクロチップ電気泳動とアガロースゲル電気泳動を実施して分子量 (base pair ; bp) を測定した。

###### (1) マイクロチップ電気泳動

PCR産物を適宜希釈し、マイクロチップ電気泳動装置MultiNA (MCE-202 ; 島津製作所) で測定した。分析試薬はDNA-1000キット(島津製作所)を用いた。

###### (2) アガロースゲル電気泳動

TBE緩衝液を用いた2%アガロースゲルで電気泳動(50V, 120分)を行い、検出したバンドの位置をマーカーから読み取り分子量を算出した。

##### 3) 反復数の換算

各電気泳動で得られた分子量を、前田ら<sup>1)</sup>が示した表(換算表)の値(理論値)に当てはめて各領域の反復数を換算した。

### 結果

#### 1) 反復数の比較

電気泳動の結果から反復数を換算するとき、測定値に近い分子量の反復数を選択した。そしてMultiNAによる電気泳動とアガロースゲル電気泳動の結果からそれぞれ判定した反復数を比較したところ、異なる事例が見られた。これは、アガロースゲル電気泳動で得られた分子量と比べてみたところ、すべての事例でMultiNA測定値が実際より大きい値を示したためであった。前田ら<sup>2)</sup>によると、MultiNAは理論値と測定値にずれ(誤差)が生じる場合があるものの再現性良く検出されるため、誤差を把握することで対応は可能としている。そこで、生じた誤差の程度を把握することとした。

## 2) 測定値の誤差の確認と補正

MultiNA測定値に対する誤差の割合（誤差割合）とMultiNA測定値との関係をグラフにしたところ（グラフ非表示）、測定値750 bp以上において、誤差割合が増加して反復数を誤ることが判明した。従って、JATA(12)-VNTR法にMultiNAを導入するには、この誤差を許容範囲内にするために補正をする必要がある。

そこで、誤差とMultiNA測定値の関係性を明らかにするため、縦軸に誤差を、横軸にMultiNA測定値をプロットしたグラフを作成した（図1）。その結果、750 bpから1500 bp付近のMultiNA測定値において、誤差と測定値との間に比較的良好な直線関係が見られた（ $R^2=0.96$ ）。この回帰直線式を用いてMultiNA測定値に生じる誤差を補正できると考えられた。

以上から、理論値が750 bp以上のものについて、予測される誤差を直線式から求めて上乘せした値（補正值）を換算表にあてはめたMultiNA測定値用の換算表（MultiNA換算表）を作成した。

作成したMultiNA換算表にMultiNA測定値を照らし合わせて反復数を判定し、アガロースゲル電気泳動の結果による反復数と比較したところ、全ての結果が一致した。また、MultiNA換算表の値に対するMultiNA測定値の誤差について、再度、誤差割合とMultiNA測定値との関係をグラフにして見たところ、許容範囲内に収まることを確認した（図2）。

### まとめと考察

JATA(12)-VNTR法にマイクロチップ電気泳動装置MultiNAを使用する方法について検討した。その結果、750 bpから1500 bp付近において理論値とMultiNA測定値に誤差を生じ、反復数を誤って判定する可能性のあることが判明した。しかしこの誤差とMultiNA測定

値の間には直線関係が見られたことから、計算式で補正したMultiNA測定値用の換算表を作成することで対応が可能となった。

一方でMultiNA測定値が1000 bp以上だった場合は、使用するDNA-1000キットが100 bpから1000 bpを対象とする製品のため、アガロースゲル電気泳動による確認を実施している。またJATA10とJATA12においてはMultiNA換算表で反復数判定に迷う事例が見られたので、その場合はアガロースゲル電気泳動による確認を行っている。このようなアガロースゲル電気泳動を必要とする事例は少なく（1検体あたり多くて3領域）、必要な場合もMultiNAで分子量が推定されるため適切な泳動条件で実施できる。

MultiNA分析の所要時間は、1検体12領域あたり約45分（初期洗浄及び後洗浄の時間を含む）であった。迅速に測定結果が得られ、自動分析により省力化が図れることから、多検体処理には非常に有用であると考えられた。今後もデータの蓄積と共にMultiNA換算表の整合性の確認と補正を行っていきたい。

### 謝 辞

本研究を進めるにあたりご助言いただきました結核予防会結核研究所の前田伸司先生、VNTR解析の開始にあたりご指導いただきました大阪府立公衆衛生研究所の田丸亜貴先生に深謝いたします。

### 文 献

- 1) 前田伸司, 村瀬良朗, 御手洗聡, 他: 結核, **83**, 673-678 (2008)
- 2) 前田伸司, 曾我部有司: 島津アプリケーションノートNo.19 (2011), (株)島津製作所

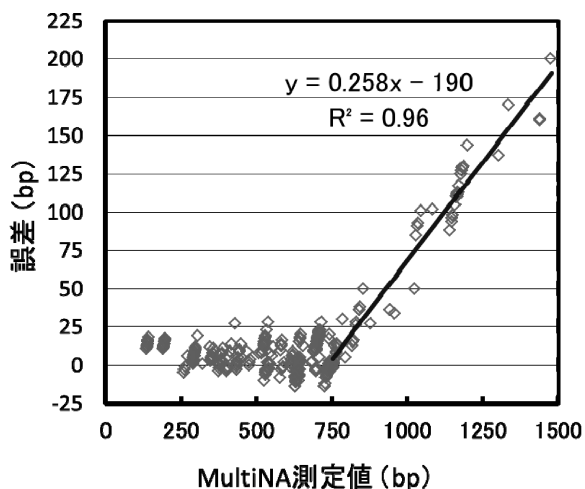


図1. 誤差とMultiNA測定値

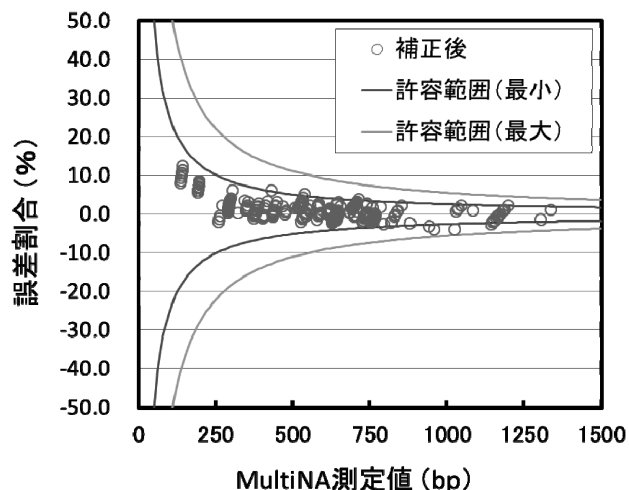


図2. 誤差割合とMultiNA測定値（補正後）

## 奈良県における腸管出血性大腸菌検出状況：2013年度

辻本真弓・田邊純子・田口和子・大前壽子

Prevalence of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* detected in Nara Prefecture, 2013

Mayumi TSUJIMOTO・Sumiko TANABE・Kazuko TAGUCHI and Hisako OHMAE

### 緒言

腸管出血性大腸菌 (enterohemorrhagic *Escherichia coli*: EHEC) 感染症は、感染症法で三類感染症に指定され、診断した医師の全数届出が義務付けられている。患者から検出された菌株は、保健所協力のもと地方衛生研究所に搬入され、性状、血清型及び毒素型等を確認した後、厚生労働省通知に基づき国立感染症研究所 (以下、感染研) へ送付される。感染研では全国から集められた菌株についてパルスフィールド・ゲル電気泳動 (PFGE) による遺伝子解析を実施し、全国的な状況を把握するとともにその結果を還元している。

本報では、2013年4月から2014年3月の間に当センターへ搬入されたEHEC菌株の由来患者情報及び細菌検査の結果についてまとめたので報告する。

### 材料と方法

#### 1. 材料

2013年4月から2014年3月の間に奈良県に報告されたEHEC感染者30例のうちHUS発症例で菌株を分離できなかった1例を除く29菌株と、他自治体で報告があったが患者の住所地が奈良県内であったため当センターに搬入された1菌株の計30菌株が当センターに搬入された。30菌株のうち1菌株は同一人物からの再検出であり、性状等も一致したため、今回の報告ではこの1株を除く29菌株を材料とする。患者情報は、保健所の調査結果に基づく。

#### 2. 血清型別及びベロ毒素 (VT) 型別

血清型別には、病原大腸菌免疫血清「生研」(デンカ生研) を使用した。VT型別は、Cebulaら<sup>1)</sup> のプライマーを用いてPCRを実施し、合わせてWangら<sup>2)</sup> のプライマーを用いたPCRで変異型VT2遺伝子*stx2c*, *stx2d*, *stx2e* 及び*stx2f*の保有状況を調査した。

#### 3. 薬剤感受性試験

アンピシリン(ABPC), セフォタキシム(CTX), セフポドキシム(CPD), ゲンタマイシン(GM), カナマイシ

ン(KM), ストレプトマイシン(SM), テトラサイクリン(TC), シプロフロキサシン(CPFX), ナリジクス酸(NA), ST合剤(ST), クロラムフェニコール(CP)及びホスホマイシン(FOM)の12薬剤について、センシ・ディスク(日本BD)を用いた感受性試験をCLSI法に準拠して実施した。

#### 4. 分子疫学解析

血清型O157菌株については、IS-printing system (東洋紡績, 以下IS法)による遺伝子型別を実施した。また、必要に応じて「PFGE New Protocol-Kinki」に従いPFGE解析を実施した。感染研に送付された菌株はPFGE解析が実施され、パターンごとに付けられた番号が情報提供された。

### 結果

#### 1. 腸管出血性大腸菌の検出状況 (図1, 図2)

菌株29株のうち11株が10月に検出され、夏季に検出のピークが見られる例年とは異なる傾向を示した。

菌株由来患者の年齢は2歳から81歳まで幅広く見られた。性別で見ると男性13人、女性16人であった。

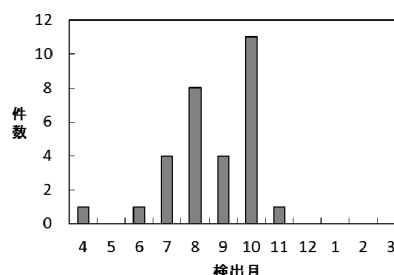


図1 菌株の月別検出状況

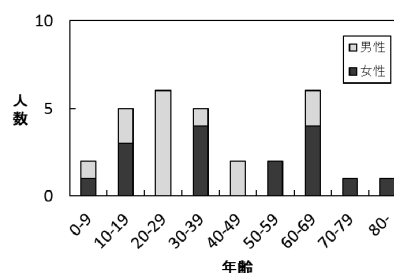


図2 患者情報：年齢、性別

## 2. 血清型・毒素型と臨床症状 (表1)

O血清型はO157:H7とO26:H11及びO111:HUTの3種類が見られた。毒素型を見ると、O157ではVT1&VT2が22株(88%)と多く、O26及びO111はVT1単独保有株のみであった。

臨床症状は、O157が検出された25例中20例が有症で、多い症状は腹痛が15例、下痢が14例、血便が11例であった。O26では3例全てが有症で、腹痛が3例、下痢及び血便がそれぞれ2例であった。O111の1例は有症で、腹痛、下痢の症状を示した。

変異型VT2遺伝子の調査では、O157:H7:VT2の1株で*stx2c*遺伝子の保有を確認した。

表1 血清型と毒素型

	VT1	VT2( <i>stx2c</i> )	VT1&VT2( <i>stx2c</i> )	合計
O157:H7	0	3(1)	22(0)	25
O26:H11	3	0	0	3
O111:HUT	1	0	0	1
合計	4	3(1)	22(0)	29

## 3. 薬剤感受性試験 (表2)

O157では1剤以上の薬剤に耐性を示した菌株が3株あり、他22株は12薬剤に感受性を示した。O26及びO111では4株全てが12薬剤に感受性を示した。

表2 薬剤感受性試験

O血清群	耐性	耐性薬剤名	菌株数
O157	3剤	ABPC,SM,TC	1
	2剤	ABPC,SM	1
	1剤	CP	1
	なし	-	22
O26	なし	-	3
O111	なし	-	1
合計			29

## 4. 分子疫学解析

O157菌株25株について、IS法とPFGE解析の結果の比較を行った。

IS法の結果、IS型は16種類あり、2株以上一致したものは4パターン計13株あった。

1パターン5株については、4株において疫学情報から同時期に県内の焼肉店2施設でそれぞれ2名ずつが喫食しており関連が疑われた。当センター及び感染研におけるPFGE解析の結果、4株のパターンが一致した。保健所による遡り調査が実施されたが、共通食材等の特定には至らなかった。1株についてはPFGE型が一致せず、疫学情報の関連性も見られなかった。

家族及び親族内感染例で搬入・分離された5株について、4株でIS型が一致した。当センターで実施した

PFGE解析においても4株でパターンが一致し、IS型が一致しなかった1株は1バンド違いであった。感染研のPFGE解析においては3株が一致し、1株は2バンド違いで、IS型が一致しなかった1株は3バンド違いであった。この結果から、これら5株は同一菌株由来の感染と考えられ、二次感染と推察された。

IS型が一致した2パターン各2株は感染研のPFGE型が異なり、疫学情報でも関連は見られなかった。

O157においてIS型が異なるが感染研のPFGE型が一致したものが2株あったが、疫学情報の関連性は見られなかった。

O26の3株は全て感染研のPFGE型が異なっており、疫学情報の関連性も見られなかった。

## 考 察

EHEC感染症は全国で例年3,000例以上報告されており、2013年1月から12月までの患者報告数は4,046例であった<sup>3)</sup>。2011年の生食用食肉の規格基準見直しや2012年の生食用牛の肝臓の販売禁止などの措置により、生肉や生レバーの喫食が原因と推定されるO157感染事例は2011年以降減少し、その傾向は2013年末まで継続している<sup>3)</sup>。奈良県におけるEHEC感染症報告数は2010年度56例、2011年度21例、2012年度17例と減少していたが、2013年度は30例と増加した。疫学情報から焼肉の喫食歴がある感染例が多かったため、引き続き生肉や加熱不十分な食肉等を食べないように注意喚起が必要である。

IS法やPFGE解析で型別が一致した際、行政に情報提供し遡り調査が行われるケースがあり、その中には原因の特定に至らないこともあるが、今後も、EHEC感染事例のデータの収集・蓄積と科学的解析を行い、感染症の予防と拡大防止に寄与していきたいと考えている。

## 謝 辞

菌株の収集にご協力頂いている関係機関の方々に、またPFGE解析結果を還元して頂いている国立感染症研究所の皆様には、深く御礼申し上げます。

## 文 献

- 1) Cebula TA, Payne WL, Feng P, *et al.*: *J. Clin. Microbiol.*, **33**, 248-250 (1995)
- 2) Wang G, Clark CG, Rodgers FG, *et al.*: *J. Clin. Microbiol.*, **40**, 3613-3619 (2002)
- 3) 国立感染症研究所 厚生労働省健康局結核感染症課: 病原微生物検出情報, **35** (5), 117-132 (2014)



## 奈良県における食品由来大腸菌の薬剤耐性状況調査

吉田孝子・阿部剛士・琴原優輝・田邊純子・田口和子・大前壽子

Study on Antimicrobial Susceptibility of *Escherichia coli* Isolated from Food in Nara Prefecture

Takako YOSHIDA・Koushi ABE・Yuki KOTOHARA・Sumiko TANABE・Kazuko TAGUCHI and Hisako OHMAE

### 緒言

近年、食用動物の疾病治療や飼料に使用される抗菌性物質により、家畜・家禽の腸内細菌が耐性を獲得し、人の感染症治療に使用される抗菌性物質にも耐性を示す可能性が指摘され、社会的に重要な課題となっている。

その中でも、薬剤耐性菌の一つである基質特異性拡張型β-ラクタマーゼ(Extended-Spectrum β-Lactamase;ESBL)産生菌<sup>1)</sup>は、β-ラクタマーゼ遺伝子に変異が起こり、従来分解できなかった第3世代セフェム系薬剤も分解する。この第3世代セフェム系薬剤は医療現場で感染症治療に広く使用されるため、治療への影響が懸念されている。

今回、当センターで食品の収去検査、及び依頼検査により分離した大腸菌について、薬剤感受性試験、ESBL確認試験及びPCR法によるESBL遺伝子の保有について調査したので結果を報告する。

### 方法

#### 1. 材料

2010年度から2013年度に、収去検査、及び依頼検査として搬入された食品835検体より分離した大腸菌41株を用いた。

#### 2. 薬剤感受性試験

アンピシリン(ABPC)、セフトキシム(CTX)、セフトキシム(CPDX)、ゲンタマイシン(GM)、カナマイシン(KM)、ストレプトマイシン(SM)、テトラサイクリン(TC)、シプロフロキサシン(CPFX)、ナリジクス酸(NA)、ST合剤(ST)、クロラムフェニコール(CP)、ホスホマイシン(FOM)の12薬剤についてセンシディスク(日本BD)を用い、CLSIの抗菌薬ディスク感受性試験実施基準に準拠して実施した。

#### 3. ESBL確認試験

薬剤感受性試験でセフェム系薬剤であるCTX、若しくはCPDXに耐性と判定された菌株について、ミューラーヒントン寒天培地上に、CTXとCAZの薬剤

ディスクを配置して耐性を見ると共に、両ディスクの間に、アモキシリン・クラブラン酸(AMPC/CVA)、アンピシリン・スルバクタム(AMPC/SBT)のβ-ラクタマーゼ活性阻害剤を配置し、阻止帯の形成を確認した(ダブルディスクシナジー試験)。

#### 4. ESBL遺伝子確認

ESBL確認試験により、阻止帯の形成が確認されたものについて、PCR法によるESBL遺伝子の確認を行った。ESBL遺伝子の検出には、CTX-M-1 group(CTX-M-1G)、CTX-M-2 group(CTX-M-2G)、CTX-M-9 group(CTX-M-9G)、TEM-型及びSHV-型の各プライマー<sup>2), 3)</sup>を用いた。

### 結果

#### 1. 菌株由来検体

食品835検体から大腸菌を41株検出した。大腸菌の由来食品を表1に示した。食肉由来が多かったが、中でも鶏肉由来が多く27株を占めた。

表1 由来食品及び検出数

由来食品	検出数
食肉(鶏肉)	27
食肉(牛肉)	5
食肉(豚肉)	3
惣菜類	6
合計	41

#### 2. 薬剤感受性試験

12薬剤に対する薬剤別耐性菌株数を表2に示す。

表2 薬剤別耐性菌株数

薬剤名	耐性菌株数(%)
ABPC	16(39.0)
NA	15(36.6)
TC	14(34.1)
KM	12(29.3)
SM	10(24.4)
CPFX	7(17.1)
CP	7(17.1)
ST	6(14.6)
CPDX	5(12.2)
CTX	4(9.8)
GM	1(2.4)
FOM	1(2.4)

耐性率が最も高かった薬剤は、ABPC耐性で16株あり、次に多かったのはNA耐性で15株、TC耐性で14株であった。

また、耐性薬剤数別菌株数では、41株中25株(61.0%)が何れかの薬剤に耐性であり、その内20株、つまり全体の48.8%が2剤以上に耐性である多剤耐性菌であった。一方、今回供試した12薬剤全てに感受性であった菌株は16株であった。最も耐性薬剤数の多かった菌株は、8剤耐性で3株あった。耐性薬剤のパターンは表3に示した。

表3 薬剤耐性パターン

耐性薬剤数	薬剤名	菌株数
8	ABPC・CTX・CPDX・GM・TC・CPFX・NA・CP	1
	ABPC・KM・SM・TC・CPFX・NA・ST・CP	2
7	ABPC・SM・TC・CPFX・NA・ST・CP	1
6	ABPC・CTX・CPDX・SM・TC・NA	1
	ABPC・CTX・CPDX・SM・NA・ST	1
	ABPC・CPDX・KM・SM・TC・CP	1
5	ABPC・KM・TC・CPFX・NA	2
	ABPC・SM・TC・CPFX・NA	1
	ABPC・SM・TC・NA・ST	1
4	ABPC・TC・ST・CP	1
3	ABPC・CTX・CPDX	1
	ABPC・KM・TC	1
	KM・SM・NA	2
2	ABPC・KM	1
	ABPC・NA	1
	KM・NA	1
	TC・CP	1
1	KM	2
	TC	1
	NA	1
	FOM	1
合計		25

### 3. ESBL確認試験

セフェム系に耐性であった5株について、CTXとCAZに対する耐性を確認したところ、CTX耐性は4株で、CAZ耐性は2株であった。ダブルディスクシナジー試験の結果、全5株についてβ-ラクタマーゼ活性阻害による阻止帯の形成を確認した。なお、この5株は全て鶏肉由来大腸菌であった。

### 4. ESBL遺伝子確認

阻止帯の形成を確認した5株について、ESBL産生性有りと判断してPCR法によるESBL遺伝子の確認を行った。

PCR法の結果、4株からいずれかのESBL遺伝子を検出し、1株は複数保持していた(表4)。検出した遺伝子の内訳としては、CTX-M-1G型1株、CTX-M-2G型1株、TEM-型2株、SHV-型1株であった。

表4 ESBL遺伝子検出パターン

検出遺伝子	菌株数
CTX-M-1G +TEM- 型	1
CTX-M-2G	1
TEM- 型	1
SHV- 型	1

### 考 察

奈良県における流通食品の薬剤耐性菌による汚染状況を把握し、さらにESBL産生菌大腸菌による浸淫状況を確認するため、調査した結果、4株よりESBL遺伝子を検出したことより、県内流通食品にもESBL産生大腸菌が存在することが明らかとなった。

当センターでは奈良県において人から検出されたESBL産生菌の遺伝子型調査を行っており、既報<sup>4)</sup>により、CTX-M-9Gを62.1%検出している。国内においては、食品からのESBL産生大腸菌の報告は多数有り、検出遺伝子型はCTX-M-型が多く、由来食品は鶏肉が大多数を占める<sup>5), 6), 7)</sup>。今回、食品由来大腸菌からCTX-M-型が2株検出されたが、今後も調査を継続し、状況把握する必要があると考える。TEM-型及びSHV-型を検出した菌株については、シーケンスによる遺伝子解析を行う予定である。また、表現型では確認したが、今回試験したいずれのESBL遺伝子も検出なかった菌株があり、AmpC型β-ラクタマーゼ<sup>8)</sup>の可能性も考えられる。

今後も公衆衛生上、ESBL産生菌等の薬剤耐性菌についてその動向に注視していく必要がある。

### 文 献

- 宮崎博章：臨床と微生物，40 (3)，213-218 (2013)
- L. Xu, V. Ensor, S. Gossain, et al. : *J. Medical Microbiology*, **54**, 1183-1187 (2005)
- H. Monstein, A. Ostholm-Balkhed, M. Nilsson, et al. : *APMIS*, **115** (12), 1400-1408 (2007)
- 田邊純子，琴原優輝，松井恵梨子，他：奈良県保健環境研究センター年報，**46**, 89-90 (2011)
- 永井佑樹，岩出義人，赤地重宏，他：三重県保環研年報，**15**, 37-42 (2013)
- 八柳潤，今野貴之，高橋志保，他：秋田県健康環境センター年報，**8**, 38-43 (2012)
- 下島優香子，井田美樹，猪股光司，他：東京健安研七年報，**62**, 145-150 (2011)
- G. A. Jacoby: *Clinical Microbiology Reviews*, **22** (1), 161-182 (2009)



## 奈良県における手足口病の流行状況とウイルス解析：2013

北堀吉映・米田正樹・浦西洋輔・大浦千明・稲田真知・中野 守

Epidemiological characteristics and virus analysis of hand, foot and mouth disease in Nara Prefecture 2013

Yoshiteru KITAHORI・Masaki YONEDA・Yosuke URANISHI・Chiaki OURA・Machi INADA and Mamoru NAKANO

## 緒 言

手足口病は手や足などに水疱性の発疹が現れる小児に起こる急性ウイルス感染症の代表的な疾患である。

わが国での歴史は浅く1960年代後半に存在が明らかとなった。これまで、本疾患の原因ウイルスはコクサッキーA群（CAと略す）16, 10およびエンテロウイルス71型（EV71と略す）などであった。しかし、2009年、突如これまでヘルパンギーナの主な原因ウイルスとされていたCA6が本疾患の原因ウイルスとして検出されるようになった。臨床症状もこれまでと異なり、上腕、大腿部、臀部の大きな水疱性発疹と回復後の爪甲剥離などを特徴が報告されている<sup>1-2)</sup>。

2013年は全国的に手足口病が大きく流行した。本報告では本県における手足口病の患者発生状況および原因ウイルスについての疫学を取りまとめたので報告する。

## 材料と方法

## 1. 調査対象

奈良県感染症発生動向調査で平成25年1月から12月の間に35定点医療機関で手足口病と診断され患者として届けられた数値を、定点当たりの患者発生数として流行状況の解析のための指標とした。また、原因ウイルスの解析は病原体定点の医療機関から入手した22例の咽頭ぬぐい液を検査材料として実施し、患者年齢等の疫学を加え解析を試みた。

## 2. ウイルス型種解析

咽頭ぬぐい液からQIAamp Viral RNA Mini kit(Qiagen社)を用い添付のプロトコールに従ってRNAを抽出した。検出プライマーはNix<sup>3)</sup>らの報告に従い第1回の遺伝子増幅は#So224および#So222を用いた。その後、第2回目の増幅は#AN89および#AN88プライマーでRT-PCRを行った。増幅産物はアガロースゲル電気泳動を行い、遺伝子産物を回収しパーシャルシーケンスを実施した。得られた遺伝子配列はBLAST解析を実施しウイルス型種を確定した。

## 結 果

## 1. 患者発生状況

県内の35定点医療機関から報告された患者報告数は2,092名で、各保健別内訳は奈良市保健所が595名、郡山保健所が453名、葛城保健所が543名、桜井保健所が371名、吉野保健所が86名および内吉野保健所が41名であった。

月別の定点当たりの患者発生状況は図1に示した。県内の患者発生ピークは郡山保健所を除く、他の保健所は7月がピークであった。ピーク時の定点当たりの報告数を比較すると、奈良市保健所：6.68人、葛城保健所：6.60人、吉野保健所：4.2人、桜井保健所：3.65人、郡山保健所：3.2人および内吉野保健所：1.5人で、奈良市保健所と葛城保健所管内では大きい流行であったことが判明した。また、両保健所管内は10月末まで定点あたり1.0の報告数を維持しており長期間にわたり発生していた。

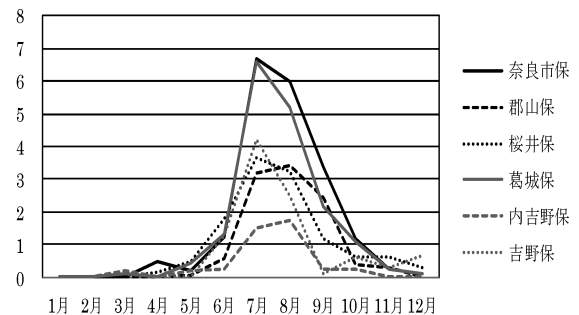


図1. 保健所別の定点当たりの手足口病患者発生

## 2. ウイルス解析と疫学

5月から8月の間に病原体定点医療機関から提出された手足口病と診断された患者からの検体22例（奈良市保健所管内：7、桜井保健所管内：15）からRT-PCRによる遺伝子増幅を行い、CA6が16例、EV71が6例を解析した。検出されたウイルス種と患者年齢は図2に示した。CA6が検出された患者年齢は、1歳未満は3例、1歳から2歳未満は8例、2歳から3歳未満は3例お

よび5歳から6歳未満が2例であった。また、EV71が検出された患者年齢は、2歳から3歳未満は1例、3歳から4歳未満は1例、4歳から5歳未満は3例および5歳から6歳未満が1例であった。

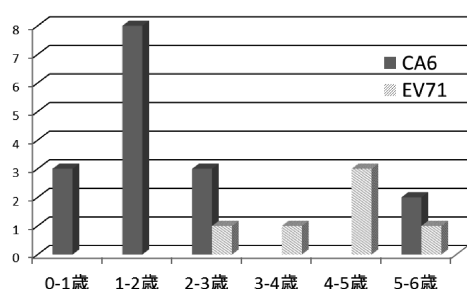


図2. 手足口病の原因ウイルス別患者年齢

### 考 察

2013年の手足口病患者の発生は、全国の小児科定点からの報告による感染症発生動向調査<sup>3)</sup>から、2011年の大きな流行の規模に次ぐものであったことが報告されている。その流行には地域には差があり、最多の報告数は新潟県(14.3)、福島県(10.1)、長野県(9.1)、山梨県(8.7)、静岡県(7.6)、福井県(7.5)の順で、本県は5.73と決して大きな流行地域に位置されるものではなかった。流行ピークは全国的には第30週であったが、本県でも第28週と大きな違いはみられていない。また、県内の患者は保健所管内毎に集計すると、奈良市保健所管内と葛城保健所管内と、ほぼ同じ人口を抱える郡山保健所および桜井保健所管内を7月時点で比較すると約1.9倍の開きがあり県内の流行には明らかな地域差があったことが判明した。

この流行で記載すべきこととして、原因となるウイルスについてである。感染症研究所の報告では第33週(8月12日から18日)時点で、全国で解析された631件のウイルス解析結果から、45.0%がCA6、次いで

多いのがEV71の16.3%と、わずかながら2009年以前の代表的な原因ウイルスであるCA6の2.7%が検出されている。同様に、本県でも22例の検体から、16例のCA6と6例のEV71を検出した。その比率は、CA6とEV71は72.7%:27.3%とCA6優位であった。また、CA6を原因とした患者年齢は、16例中14例(87.5%)が0歳児から3歳未満児であった。このことは、2011年の夏場の大きな流行以降に生まれたCA6に抗体がないために2013年のこの流行で感染したものと推察される。また、5歳児から6歳児未満の2例についても、2009年の流行で感染しなかった小児が新たに感染したものと考えられる。

最後に、今後の手足口病の発生動向を考えたとき、CA6による2014年の流行は大きなものとはならないと考えている。しかし、全国的な解析結果らもわずかではあるが、これまでの原因ウイルスであるCA16が存在することは、近い将来、これを原因とする流行が起こる可能性があり、今後とも注意深い観察が必要である。

### 謝 辞

材料提供にご協力いただいた、国保中央病院、済生会御所病院小児科、矢追医院等の諸先生方ならびに奈良県内保健所(奈良市、郡山、葛城、桜井、吉野および内吉野)の職員の方々に深謝いたします。

### 文 献

- 1) 須藤恒久: 感染症学雑誌, 52: 479-481 (1978)
- 2) 国立感染症研究所, IDWR, 2013年第33号, 注目すべき感染症: 手足口病
- 3) Nix WA, Oberste MS, Pallansch MA, J Clin Microbiol, 44: 2698-26704 (2006)

## 奈良県におけるヒトメタニューモウイルスの疫学調査と遺伝子学的解析：2010-2013

大浦千明・浦西洋輔・米田正樹・稲田眞知・中野 守・北堀吉映

Epidemiological study and genetic analysis of human metapneumovirus  
in Nara Prefecture : 2010-2013

Chiaki OURA, Yosuke URANISHI, Masaki YONEDA, Machi INADA,  
Mamoru NAKANO and Yoshiteru KITAHORI

### 緒 言

ヒトメタニューモウイルス (hMPV) は2001年に発見されたパラミクソウイルス科に属する一本鎖RNAウイルスで、RSウイルスと遺伝子学的に近縁のウイルスである。臨床症状は上気道炎、気管支炎等の呼吸器系疾患で、発熱の持続を伴う。乳幼児や高齢者あるいは免疫低下状態の場合には、時として重症化しやすく、まれに脳症なども併発することから決して軽視できない疾患である。近年では簡易迅速キットの開発により、臨床現場での診断が容易になったことから、臨床的に注目されるウイルスとなっている。

遺伝子型は、大きく2つのグループ (A, B) に分けられ、さらにそれぞれが2つのサブグループ (A1, A2, B1, B2) に分けられる<sup>1)</sup>。

hMPVは発見されてから日が浅いことから、これまで原因不明であった呼吸器ウイルス感染症の何割かはhMPVが原因であった可能性がある。hMPVはほとんどの小児が5歳までに初感染し、大人になっても再感染を繰り返す。

本研究では、奈良県感染症発生動向調査で集められた咽頭ぬぐい液検体を用いて、これまで本県では実施していなかったhMPVの流行状況を調査するとともに、遺伝子型の変遷を明らかにしたので報告する。

### 材料と方法

2010～2013年の4年間に感染症発生動向調査で呼吸器系疾患と診断された患者検体 (咽頭ぬぐい液)のうちインフルエンザウイルスの検出例を除いた検体を調査対象とした。

(2010年:103検体, 2011年:89検体, 2012年:162検体, 2013年:138検体)

ウイルス検索は咽頭ぬぐい液からQIAampViral RNA Mini kit (Qiagen社)を用いてRNA抽出を行い、

Peret<sup>2)</sup>, Takao<sup>3)</sup>らのプライマーを用いてRT-PCRで標的ウイルス遺伝子を増幅し、その後遺伝子産物はパーソナルシーケンスにより塩基配列を決定した。決定した配列はDNA Data Bank Japanにアクセスし相同性検索 (BLAST) を行い、遺伝子型を決定した。また、合わせて患者情報 (時期, 年齢, 臨床症状) を取りまとめた。

### 結 果

調査期間における検出頻度は、年別では2010年3.9% (4/103), 2011年4.5% (4/89), 2012年1.9% (3/162), 2013年8.0% (11/138) であった。

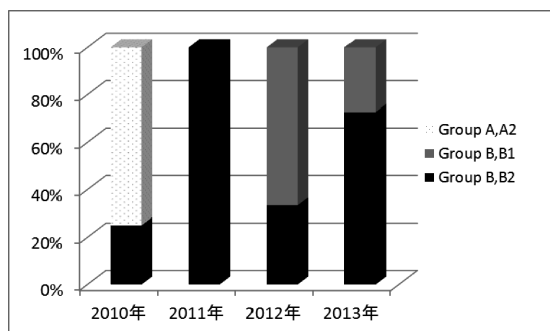
月別では4月が最も多く31.8% (7/22), 次いで3月が22.7% (5/22), 5月が18.2% (4/22) と続いた。また、患者年齢別では1歳が最も多く31.8% (7/22), 次いで2歳と3歳がいずれも22.7% (5/22) と続いた。

患者は複数の症状を示した例が多く、咳が68.2% (15/22), 鼻汁が59.1% (13/22) で、気管支炎は54.5% (12/22) であった。また、嘔吐と下痢を呈した患者が各々9.1% (2/22) および27.3% (6/22) みられた。

サブグループの分類結果を次ページの図1に示す (図1)。2010年はA2:3株 (75%), B2:1株 (25%), 2011年B2:4株 (100%), 2012年B1:2株 (66.7%), B2:1株 (33.3%), 2013年はB1:3株 (27.3%), B2:8株 (72.7%) であった。

### 考 察

今回の調査により、これまで本県における流行状況が明らかでなかったhMPVについて、過去4年間に渡りその疫学情報を蓄積し、遺伝子型別を明らかにした。今回の調査結果は、検出時期、患者年齢等において、これまで報告されてきた調査結果と概ね同様の結果であった<sup>46)</sup>。



(図1) hMPVのサブグループ

本県においてはこれまで原因不明であったhMPVの4年間を通じた検索で、年平均4.6%の検出率であり、毎年一定程度検出している。主な検出時期は3～5月で、この3ヶ月で72.7%を占めており、hMPVの流行季は春季とする報告と合致する<sup>4,6)</sup>。年齢別では、1～3歳で77.2%を占めた。0歳は2人と少なく、9歳からも検出したことから、RSウイルスが生後まもなく～1歳で多くみられるとする報告<sup>1)</sup>と比較すると、やや高い年齢層であると考えられる。臨床症状では、多くが上気道炎、下気道炎といった呼吸器系疾患であったが、それらに加えて下痢症状を示した例が27.3%みられた。hMPVの検出時期からみて、ロタウイルス等の重複感染の可能性も十分考えられるが、呼吸器系疾患として搬入されており便検体の提出はないため確認はできなかった。ただし、糞便検体からhMPVを検出したという報告<sup>7)</sup>があるため、病原性や臓器親和性を考えるうえで今後の調査報告が待たれる。

サブグループ解析では、2010年はA型とB型の両方を確認したが、2011年以降はB型のみ検出した。主流株はA2→B2→B1→B2と毎年変化していた。集団免疫の効果により主流株が2～3年ごとに変化するという報告<sup>8)</sup>があり、本県でもその傾向がみられた。遺

伝子型による臨床症状の違いについては、今回の調査結果では目立った特徴はなかった。

今後も積極的な疫学調査、遺伝子学的調査を行い遺伝子型がどのように変化していくのか、また遺伝子型により臨床症状の差異があるのかについて注視するとともに、得られた情報を速やかに発信して流行期を迎える前に注意喚起を促すことが、hMPVの流行を防ぐために今後ますます重要になってくると考えている。

## 謝 辞

材料提供にご協力いただいた、済生会御所病院小児科、済生会奈良病院小児科、国保中央病院、田中小児科医院、矢追医院、岡本内科こどもクリニック、大和高田市立病院の諸先生方ならびに奈良県内各保健所（奈良市、郡山、葛城、桜井、吉野および内吉野）の職員の方々に深謝いたします。

## 文 献

- 1) 菊田英明：臨床とウイルス，56, 173-182 (2006)
- 2) Teresa C. T. Peret, *et al.* : *J. Infect. Dis.*, 185, 1660-1663 (2002)
- 3) Shinichi Takao, *et al.* : *Jpn. J. Infect. Dis.*, 56, 127-129 (2003)
- 4) 高尾信一，他：感染症誌，78, 129-137 (2004)
- 5) Katsumi Mizuta, *et al.* : *Jpn. J. Infect. Dis.*, 66, 140-145 (2013)
- 6) John V. Williams, *et al.* : *J. Infect. Dis.*, 193, 387-395 (2006)
- 7) 吉岡政純，他：感染症誌，86, 755-762 (2012)
- 8) Barbara Huck, *et al.* : *Emerg. Infect. Dis.*, 12 (1), 147-150 (2006)

## 第3章 調査研究・報告

### 第4節 他誌掲載論文の要旨



## 奈良県における希少G3P [4] ロタウイルスの局所的流行

浦西洋輔・米田正樹・稲田真知・大浦千明・中野 守・北堀吉映

臨床とウイルス, **42**, 63-67, 2014

奈良県で2010年9月から2011年8月の間に検出したA群ロタウイルスについて、GおよびP遺伝子型解析を行った。88例について解析した結果、G3P[8]が72例 (81.8%)、G2P[4]が7例 (8.0%)、G1P [8] が4例 (4.5%)、G4P [8] が2例 (2.3%)、さらに希少例であるG3P [4] を3例 (3.4%) 確認した。3例のG3P [4] は同一の保育所に通う患者から検出したもので、同地域で流行していたG3P [8] およびG2P [4] のVP7およびVP4の相同性比較を行ったところ、それぞれのアミノ酸配列で99.7%、96.4%の相同性を確認した。この結果は、G3P [4] のVP7とPV4に関して、それぞれ類似性の高いヒトロタウイルスが同シーズンの市中に存在していたことを示している。

## Epidemiological characteristics of norovirus associated with sporadic gastroenteritis among children from the 2006/2007 to 2011/2012 season in Nara Prefecture, Japan

Masaki YONEDA, Akiko OKAYAMA and Yoshiteru KITAHORI

Intervirology **57**, 31-35, 2014

The present study aimed to describe the epidemiological characteristics of norovirus (NoV) associated with sporadic gastroenteritis in regional populations of Nara Prefecture, Japan, from the 2006/2007 to 2011/2012 epidemic season. Fecal specimens of sporadic gastroenteritis collected between September 2006 and August 2012 in Nara Prefecture were examined for the presence of NoV by reverse transcription-polymerase chain reaction. The NoV genotype was determined by nucleotide sequence analysis. In total, 274 NoVs associated with sporadic gastroenteritis were identified. We detected 10 different NoV genotypes: GI/3, GI/4, GI/8, GII/2, GII/3, GII/4, GII/6, GII/7, GII/12, and GII/13. A high NoV detection rate of 35.9% was identified in 1-year-old children. Among the 274 NoV isolates, 142 were obtained from males and 131 were obtained from females (the source of one was unknown). The most prevalent genotype was GII/4, accounting for 117 of the 192 different NoVs identified by sequencing. More epidemiological data will be required to determine the epidemiological characteristics of NoVs in other areas of Japan.



## Molecular evolution of the VP7 gene of Japanese G2 rotaviruses before vaccine introduction

Do Phoung LOAN, Toyoko NAKAGOMI, Doan Hai YEN, Yoshiteru KITAHORI  
and Osamu NAKAGOMI

Arch. Virol., **159**, 315-319, 2014

Changes in the prevalence of G2 rotavirus after vaccine introduction are an important issue. However, such changes in a given country should be interpreted in the global context over time. We determined 35 Japanese G2 sequences and compared them with 508 globally collected G2 sequences. The D96N substitution, a substitution known to be associated with an abrupt increase in G2 strains and antigenic changes, emerged in those strains that formed a nascent lineage outside of the currently predominant lineage (sublineage IVa). Further studies are warranted to monitor the potential of their global spread, since they also appeared in Europe and Australia.

## 第3章 調査研究・報告

### 第5節 報告書の要旨

## 検査機関の信頼性確保に関する研究

小島幸一（一般財団法人食品薬品安全センター・秦野研究所）・尾花裕孝（大阪府立公衆衛生研究所）・菅原隆志（岩手県環境保健研究センター）・上野英二（愛知県衛生研究所）・山下浩一（奈良県保健研究センター）・神藤正則（堺市衛生研究所）・久野恵子（和歌山県環境衛生研究センター）・佐々木珠生（広島市衛生研究所）・宅間範雄（高知県衛生研究所）・古田雅一（大阪府立大学）

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）  
平成25年度分担研究報告書

8機関による加工食品を用いた外部精度管理試験を実施し、加工食品の放射線照射履歴の判定能力について検証した。試料として放射線照射済み、あるいは未照射のチーズ、ピーナッツバター、スモークサーモンを使用し、アルキルシクロブタノン類を検知指標とした方法で各機関の判定結果を比較検討した。その結果、3種類の加工食品全てで全機関が誤回答なく照射履歴の判定をすることができた。

## 近畿ブロックにおける病原体解析手法の高度化による 効率的な食品由来感染症探知システムの構築に関する研究

勢戸和子（大阪府立公衆衛生研究所）・梅原成子・河野智美（滋賀県衛生科学センター）・浅井紀夫・平田佐知・杉浦伸明（京都府保健環境研究所）・清水麻衣（京都市衛生環境研究所）・秋山由美・齋藤悦子（兵庫県立健康生活科学研究所）・濱夏樹（神戸市環境保健研究所）・横山北斗（姫路市環境衛生研究所）・村山隆太郎（尼崎市衛生研究所）・小笠原準・中村寛海（大阪市立環境科学研究所）・下迫純子・岩崎直昭（堺市衛生研究所）・田辺純子・辻本真弓・琴原優輝（奈良県保健研究センター）・廣岡真理子（和歌山市衛生研究所）・中岡加陽子（和歌山県環境衛生研究センター）・田口真澄・河原隆二・原田哲也（大阪府立公衆衛生研究所）

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）  
平成25年度分担研究報告書

近畿ブロックでは、IS-printing System (IS) 法をEHEC O157遺伝子型別のスクリーニング法として位置づけ、2009年から各施設で実施したISタイプをデータベース化して情報を共有しており、2014年2月10日現在で2,064株が登録されている。2013年にはこれまでになかったISタイプの株が2施設から登録され、原因施設の判明につながった。ISデータベースにより情報交換や精査が必要と判断された場合には、型別能力に優れたパルスフィールド・ゲル電気泳動 (PFGE) 法やMultilocus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) 法の実施が必要になる。それぞれの解析手法について、近畿ブロックで共通の疫学指標として使用するため、精度管理の継続やプロトコルの最適化が必要であると考えられた。

## 奈良県における A 群ロタウイルスの遺伝子学的解析調査：G 型及び P 型

浦西洋輔

財団法人 大同生命厚生事業団 平成24年度地域保健福祉研究助成

2011/2012シーズンに感染症発生動向調査事業において得られた感染性胃腸炎患者糞便142検体から、迅速診断キットでロタウイルス陽性と判定した28例について調査を行った。その結果、6種の遺伝子型（G1P [8], G3P [8], G2P [4], G4P [8], G3P [9], G9P [8]）を確認し、流行の主体はG1P [8]（46%）およびG3P [8]（39%）の2種であることが判明した。一部の株について系統樹解析を行った結果、G1は3種類のクラスターに分類できるが、G3は一つのクラスターに全て位置することが判明した。本調査では11月という非流行期に希少例G3P [9]を検出した。この株は香港、タイなどの東アジアで検出されたヒトロタウイルスに近縁であり、海外で流行しているヒトロタウイルスG3P [9] がヒトを介して本県に侵入したものと推測している。

## 第3章 調査研究・報告

### 第6節 研究発表の抄録



## ***Aspergillus niger*とその近縁種 黒麹菌のマイコトキシン産生と系統解析**

北岡洋平<sup>1</sup>・陰地義樹<sup>1</sup>・浅野勝佳<sup>2</sup>・橋本ルイコ<sup>3</sup>・横山耕治<sup>4</sup>・高橋治男<sup>5</sup>

<sup>1</sup>奈良県保健研究センター・<sup>2</sup>奈良県景観・環境総合センター・<sup>3</sup>千葉県衛生研究所  
<sup>4</sup>千葉大学真菌医学研究センター・<sup>5</sup>国立医薬品食品衛生研究所

平成25年11月14日（橿原市）第34回奈良県公衆衛生学会

*Aspergillus niger*を含む近縁菌にマイコトキシンのオクラトキシンA産生が報告され、さらにフモニシンB2の産生性があることが明らかになった。*A. niger*とその近縁種、特に沖縄で醸造に用いられている黒麹菌などにおけるオクラトキシン及びフモニシンの産生能について詳細に検討した。

その結果、醸造に用いられている黒麹菌についてはオクラトキシンA及びフモニシンB2を産生する株は見られなかった。また、ミトコンドリアチトクロームb (mtCytb) による遺伝子解析結果においてオクラトキシンAやフモニシンB2産生能を有する株のタイプはD-5-1であり、黒麹菌株のタイプはD-9-1であった。

## **奈良県における腸管出血性大腸菌感染症の発生状況（2010年度～2013年現在）**

田邊純子・琴原優輝・辻本真弓・田口和子・大前壽子

平成25年11月14日（橿原市）第34回奈良県公衆衛生学会

2010年度から2013年10月末までに県内で届出された腸管出血性大腸菌感染症124症例及び当所へ搬入された菌株117株について、発生状況や細菌学的検査等の結果を報告した。発生は毎年8月を中心とした夏季に多く、年齢は19歳以下が約半数を占めていた。症状は腹痛、水様性下痢、血便が多く、HUS発症者は3例あった。血清型は毎年O157が最も多かった。O157は全株IS-printing systemを実施し、2013年度はその結果と疫学情報から集団事例が疑われたためパルスフィールド・ゲル電気泳動を行った結果、同一感染源と推定される事例があった。2013年度の感染者情報では焼肉喫食例が多く見られ、加熱不十分な食肉の喫食や生肉との調理器具の共用の可能性も考えられることから、引き続き食品の取扱いについて啓発が重要であると思われた。

## 奈良県における抗インフルエンザ薬剤耐性ウイルスの発生状況2001-2011

米田正樹・浦西洋輔・北堀吉映

平成25年6月9日（倉敷市）第54回日本臨床ウイルス学会

当センターで検出したインフルエンザウイルスのうち、アマンタジン耐性ウイルス検索は2001/2002から2010/2011までの10シーズンの352株について、オセルタミビル耐性ウイルス検索は2007/2008から2010/2011までの4シーズンの347株について実施した。A (H3N2) は2005/2006シーズンに72% (13/18) と高頻度となり翌シーズン以降は、全てのウイルスが耐性であった。A (H1N1) は2007/2008シーズンで59% (20/34) となった。オセルタミビル耐性ウイルス検索の結果、2007/2008シーズンはA (H1N1) の28株全てが感受性を有していたが、翌2008/2009シーズンは94%(32/34)が耐性ウイルスとなった。2009年6月以降はA (H1N1) 2009について調査した結果、オセルタミビル耐性ウイルスは4% (8/230) と低頻度であった。近年、使用される抗インフルエンザ薬の種類が増加傾向にある。今後使用される薬剤に対する耐性ウイルスの検索を実施することで、薬剤耐性サーベイランス体制の充実を図ることが重要であると考えている。

## わが国で検出されたG2ロタウイルスVP7遺伝子の分子進化

Do Phoung Lan・中込とよ子・北堀吉映

平成25年6月9日（倉敷市）第54回日本臨床ウイルス学会

単価ロタウイルスワクチンについては、議論の基盤情報として、わが国におけるG2株の分子進化の様相を明らかにする必要がある。54株のG2VP7遺伝子は進化系統樹のI, III, 亜系統Iva1, Iva-3に属し、Iva-1からIva-3への移行がみられ、単価ワクチンが定期接種された地域ではこの移行が加速される傾向が判明した。

## 奈良県における A 群ロタウイルスの流行疫学：2011/2012 シーズン

浦西洋輔・米田正樹・大浦千明・稲田眞知・中野 守・北堀吉映

平成25年9月20日（大津市）平成25年度地研近畿支部ウイルス部会研究会

2011/2012シーズンの本県におけるロタウイルスの流行疫学について解析するとともに、1999年以降に蓄積したデータも併せて長期的な流行様式について考察した。2011/2012シーズンの流行主体はG1P [8] およびG3P [8] の2種であり、これまでの調査結果と同様、複数種の遺伝子型が共存する混合型の流行であった。地域別に発生状況を解析した結果、北部・中部ではG1が優位であったが、南部ではG3が優位であった。また、本調査では11月という非流行期にG3P [9] という希少例を検出した。

## 奈良県におけるサポウイルス、アストロウイルスの流行状況

米田正樹・大浦千明・浦西洋輔・稲田眞知・中野 守・北堀吉映

平成25年11月14日（橿原市）第34回奈良県公衆衛生学会

2011年9月から2013年8月の2シーズン間に県内医療機関で採取された奈良県感染症発生動向調査の感染性胃腸炎患者糞便検体293検体を対象とし、サポウイルスおよびアストロウイルスを検索した。サポウイルスの検出率は2011/2012シーズンは8.7% (13/150), 2012/2013シーズンは2.1% (3/143) で、調査期間を通じて5.5% (16/293) であった。アストロウイルスの検出率は2011/2012シーズンは7.3% (11/150), 2012/2013シーズンは5.6% (8/143) で、調査期間を通じて6.5% (19/293) であった。サポウイルス、アストロウイルスとも春季から夏季にかけて採取された検体からの検出が83.3% (20/24) を占めた。同調査期間内でのノロウイルスの24.6% (72/293), ロタウイルスの26.3% (77/293) と比較すると検出率は低く、全国的な傾向と同様であった。

## 奈良県保健研究センター年報投稿規定

1. 奈良県保健研究センター年報は、研究センターにおいて行った研究・調査の業績を掲載する。
2. 投稿者は、本研究センター職員とする。ただし、共同研究者はこの制限を受けない。
3. 原稿の種類と内容

### (1) 原著

調査研究などで、独創性に富み、新知見を含むまとまったものは、原著として投稿できる。記述の順は、表題（和文、欧文）、著者名（和文、欧文）、要旨（200字程度）、緒言、方法、結果、考察、文献とする。

### (2) 報告

調査研究、事業に係る技術等検討などでまとめておく必要のあるものは、報告として投稿できる。記述の順は、表題（和文、欧文）、著者名（和文、欧文）、緒言、方法、結果、考察、文献とする。

### (3) 資料

事業に係る技術等検討及び特に記載してまとめておく必要のあるものは、資料として投稿できる。記述の順は、表題（和文、欧文）、著者名（和文、欧文）、本文とする。本文には緒言、方法、結果、考察に相当する内容を含め、体裁にとらわれず自由に記述することができる。資料の長さは刷り上がり2ページを超えない。

### (4) 他誌掲載論文の要旨

他誌に掲載した論文の内容を紹介する。記述の順は、表題、著者名、掲載誌名、要旨（欧文も可）とする。

### (5) 研究発表の抄録

学会(研究会を含む)に発表した内容を紹介する。記述の順は、表題、発表者名、学会名(研究会名)、抄録（欧文も可）とする。抄録の内容は400字以内（欧文は10行以内）にまとめる。

## 4. 原稿作成要領

### (1) 執筆要領

- i) 本文は日本語を用いる。
- ii) すべての原稿はワープロソフトで作成し、句読点は「,」「.」とする。
- iii) 原稿はA4版用紙を使用する。表題（和文、欧文）、著者名（和文、欧文）、要旨は、1行46文字、緒言以下は、1行24文字、1頁46行の2段組とする。
- iv) 見出しおよび小見出しはゴシック体を用いる。見出しには「1., 2., …」を、細文見出しには「1), 2), …」を、さらなる細文見出しには「(1), (2) …」「①, ② …」「i), ii) …」等の番号をつける。
- v) 単位は国際的に慣用されているものを使用し、末尾にはピリオドをつけない。

### (2) 表題、著者名、所属機関名

- i) 表題の和文はゴシック体とし、欧文は冠詞、前置詞・副詞、接続詞以外の単語は第1字目を大文字にする。
- ii) 著者名の欧文は、名は最初の1文字のみを大文字とし、姓はすべて大文字とする。
- iii) 本研究センター職員以外の著者名については、その右肩に「\*、\*\*」の記号をつけ、それぞれの所属機関名をその頁の最下段に脚注として記載する。

### (3) 図・表および写真

- i) 図・表および写真は原則として白黒とする。
- ii) 図・写真では下にタイトルと説明を、表では上にタイトル、下に説明を記載する。
- iii) 図はそのまま写真印刷されるので、線の太さ、文字の大きさなど縮尺を考慮し作成する。
- iv) 本文中に図・表及び写真の挿入箇所を示す。

#### (4) 脚注および引用文献

- i) 脚注は「\*」を用い、欄外に入れる。
- ii) 引用文献は<sup>1)</sup>, <sup>2)</sup>, …のように一画をあたえて右肩に示し、最後に一括して番号順に列記する。
- iii) 文献は下記のように著者名(3名まで)、雑誌名、巻、ページ、年号(西暦)の順に記載し、巻数はゴシック体、欧文雑誌名はイタリック体とする。以下に例を示す。
  - 1) 佐藤恭子, 山田隆, 義平邦利, 他: 食衛誌, **27**, 619-623 (1986)
  - 2) J. Hine, A. Dowell, J. E. Singley, et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 479-483 (1956)
  - 3) “食品衛生検査指針理化学編” 厚生省生活衛生局監修, 212-216 (1991), (社)日本食品衛生協会

#### 5. 原稿の提出について

- (1) A4版用紙に印字した原稿と図・表を各1部とする。なお、紙情報にあわせて原稿・図・表の電子情報の形で提出のこと(添付メール形式)。無理な場合は原稿だけでも電子情報で提出のこと。
- (2) 原稿は所属担当統括主任研究員を経て編集委員に提出する。
- (3) 提出期限は編集委員会で定める。

#### 6. 審査

原稿は編集委員会において審査し、採否を決定する。また編集委員会は必要に応じて、種類・内容の変更を求めることができる。

#### 7. 校正

校正はすべて著者の責任とするが、編集委員会は編集の都合上変更を求めることができる。

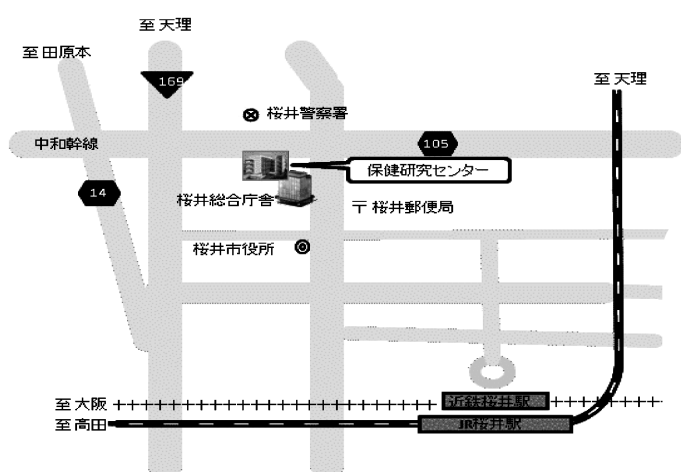
#### 8. その他

- (1) 年報編集に関し必要な事項は、すべて編集委員会において決定する。なお編集委員会はセンター所長(編集委員長)、副所長及び各担当1名の編集委員で構成する。
- (2) 編集委員の任期は2年とし、業務は年報の発送をもって終了する。なお、再任を認める。
- (3) 編集委員は上記の業務終了後、速やかに次期編集委員に業務の引継ぎを行う。

#### 9. 附則

- (1) この奈良県保健研究センター年報投稿規定は、平成19年4月12日から施行(改正)する。
- (2) この規定は、平成25年4月1日に改正する。

#### 【奈良県保健研究センター】



- ◆JR 桜井駅、近鉄桜井駅  
北口より 徒歩15分
- ◆奈良交通天理行きバス  
桜井総合庁舎前下車すぐ

・ <http://www.pref.nara.jp/4827.htm>



編 集 委 員

常 岡 秀 好 (委員長)

福 田 忠 明

北 堀 吉 映

吉 田 孝 子

陰 地 義 樹

奈良県保健研究センター年報

第48号 平成25年度(2013年)

編集発行人 奈良県保健研究センター

〒633-0062 奈良県桜井市栗殿1000

電 話 0744-47-3160 (代)

FAX 0744-47-3161

印刷所 株式会社 春日

〒630-8126 奈良市三条栄町9-18

電 話 0742-35-7222