

愛知県衛生研究所報

第 61 号 平成 23 年 3 月

目 次

調査研究

愛知県における新型インフルエンザ A/H1N1 の発生動向とその患者特性 —流行第一波における全国との比較—	1
竹島雅之、續木雅子、広瀬かおる、判治岳史、安井善宏、山下照夫、 下岸 協、皆川洋子	
2006 年から 2010 年に流入下水から分離されたエンテロウイルスの消長	11
水谷絵美、安達啓一、藤原範子、伊藤 雅、山下照夫、藤浦 明、皆川洋子	
LAMP 法による耐熱性溶血毒遺伝子陽性 <i>Vibrio parahaemolyticus</i> の 海産魚介類からの検出法	19
山崎 貢 ¹ 、青木日出美 ¹ 、山田貞二 ¹ 、服部 悟 ¹ 、岩出義人 ² 、荒川英二 ³ 、 松本昌門、平松礼司、皆川洋子	
¹ 愛知県衣浦東部保健所、 ² 三重県保健環境研究所、 ³ 国立感染症研究所	
培養細胞を用いたパリトキシン毒性試験法の検討	31
林 瑞那、秦 眞美、舘井浄子、長谷川晶子、藤浦 明、皆川洋子	
Scheduled MRM を用いた LC-MS/MS による食品中の多成分残留農薬分析法の検討	39
渡邊美奈恵、上野英二、棚橋高志、大野春香、猪飼誉友、大島晴美、三上栄一	
一般住宅におけるホルムアルデヒド、アセトアルデヒド及び揮発性有機化合物の実態調査 —平成 10 年度から 10 年間の調査結果—	47
林 留美子、垣添寛和 ¹ 、高橋 裕 ¹ 、松岡弘行 ¹ 、中島秀隆 ¹ 、椛島由佳、 小島美千代、三上栄一	
¹ 愛知県健康福祉部健康担当局生活衛生課	
愛知県における一般住宅室内空気中の窒素酸化物の実態調査について	55
椛島由佳、小島美千代、林 留美子、三上栄一	
他誌掲載論文抄録	63

Report of Aichi Prefectural Institute of Public Health
(Aichi-ken Eisei Kenkyusyoho)

Volume 61, March 2011

Contents

Original Papers

Features of pandemic influenza A/H1N1 2009 in Aichi Prefecture
depicted from case- and sentinel-based surveillance data 1

Masayuki Takeshima, Masako Tsuzuki, Kaoru Hirose, Takeshi Hanji,
Yoshihiro Yasui, Teruo Yamashita, Kyou Shimogishi, Hiroko Minagawa

Continuous isolation of human enteroviruses from sewage water samples ... 11

Emi Mizutani, Hirokazu Adachi, Noriko Fujiwara, Miyabi Ito,
Teruo Yamashita, Akira Fujiura, Hiroko Minagawa

Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for sensitive
and rapid detection of the thermostable direct hemolysin-producing
Vibrio parahaemolyticus strain in seafoods 19

Mitsugu Yamazaki¹, Hidemi Aoki¹, Sadaji Yamada¹, Satoru Hattori¹,
Yoshito Iwade², Eiji Arakawa³, Masakado Matsumoto, Reiji Hiramatsu,
Hiroko Minagawa

¹Aichi Prefectural Kinuura-Tobu Health Center, ²Mie Prefectural Health and Environment Research
Institute, ³National Institute of Infectious Diseases

A cytolytic assay for the measurement of palytoxin 31

Mizuna Hayashi, Mami Hata, Kiyoko Tachii,
Akiko Hasegawa, Akira Fujiura, Hiroko Minagawa

Multi-residue analysis of pesticides in foods by liquid chromatography
with tandem mass spectrometry using scheduled MRM 39

Minae Watanabe, Eiji Ueno, Takashi Tanahashi, Haruka Ohno,
Yoshitomo Ikai, Harumi Oshima, Eiichi Mikami

An indoor air quality research in private houses in Aichi prefecture
from 1998 to 2007 by measuring formaldehyde, acetaldehyde
and volatile organic compounds concentrations 47

Rumiko Hayashi, Hirokazu Kakizoe¹, Yutaka Takahashi¹, Hiroyuki Matsuoka¹,
Hidetaka Nakashima¹, Yuka Kabashima, Michiyo Kojima, Eiichi Mikami

¹Environmental Health Division, Health Office, Aichi Prefectural Department of Health and Public Welfare

Nitrogen oxide concentrations in indoor air in Aichi prefecture 55

Yuka Kabashima, Michiyo Kojima, Rumiko Hayashi, Eiichi Mikami

Summeries of papers accepted to other journals 63

調 査 研 究

愛知県における新型インフルエンザ A/H1N1 の発生動向と その患者特性 — 流行第一波における全国との比較 —

竹島雅之、續木雅子、広瀬かおる、判治岳史、
安井善宏、山下照夫、下岸 協、皆川洋子

要 旨

2009年4月にメキシコで発生が探知され6月には愛知県でも患者が確認された新型インフルエンザ(A/H1pdmN1)の本県における患者発生状況及びその患者特性について、感染症発生動向調査及び入院サーベイランス調査結果に基づいて傾向を解析し、全国のそれと比較検討した。2009年7月5週～2010年3月4週までの期間に県内で新型インフルエンザに罹患し医療機関を受診した患者数は県民人口(740万)の13%強に当たる約100万人と推計された。同期間の入院患者報告数は1,374人(受診者数10万対131.9、人口10万対18.5)、うち10%が重症患者に該当し、死亡数は16人と入院患者報告数の1%相当であった。15歳未満の若年者は基礎疾患をもたない患者が72.5%を占めたのに対し、65歳以上の高齢者では基礎疾患をもつ患者が77.6%であった。本県の入院率等は全国の報告値とほぼ同程度であることが判明した。新型インフルエンザ発生に伴う発生動向監視強化の一環として実施中の調査に関する今回の解析結果は、愛知県における今後の新型インフルエンザ等新興・再興感染症対策の見直しに際して有用な情報と考えられる。

キーワード：新型インフルエンザ、感染症発生動向調査、入院サーベイランス

序文

2009年4月にメキシコで発生が探知された新型インフルエンザ(H1N1)(以下、新型flu)は、当初新型インフルエンザウイルスA/H1pdmN1(以下AH1pdm)の感染力、病原性や患者ハイリスク要因等が未知であったため強毒性ウイルスA/H5N1を想定した行動計画^{1, 2)}に基づく厳重な対策がとられた。空港で患者発生国・地域からの直行便の機内検疫が実施され、患者及び疑似症患者は指定医療機関に入院、同行者及び濃厚接触者も空港内ホテルに停留など「水際対策」

が取られたが、5月には国内で渡航歴のない患者が発生し、6月には愛知県内でも患者を確認、6月17日には入院措置等は中止された。

医療機関や教育機関は新型flu患者の診療時間制限や専用待合室の確保、学級閉鎖基準の変更など、さまざまな対応を次々に求められた。このような特別措置はAH1pdmの世界的流行拡大とともに致死率などの病原性指標が2009/10シーズンの季節性インフルエンザウイルス(A香港型、Aソ連型)と同程度と判明した後徐々に解除されたが、

今後懸念される第2波や将来新たな新型インフルエンザ発生時にも実施すべきか評価が待たれる。そこで、新型fluに関して1999年以降継続して実施中の定点患者数報告（インフルエンザサーベイランス）及び2009年7月に開始された全数報告による入院サーベイランスより得られた情報を解析し、愛知県における新型flu第1波の患者特性を全国集計と比較検討する。

資料と方法

1 インフルエンザサーベイランス

愛知県データは愛知県感染症発生動向調査事業実施要綱に基づく指定届出機関（インフルエンザ定点 195 か所）から毎週報告され NESID（厚生労働省による感染症サーベイランスシステム）に登録されたインフルエンザ報告数の該当週分を用いた。全国データは2010年3月10日現在の WISH（厚生労働行政総合情報システム）公開分を使用した。

2 インフルエンザ入院サーベイランス

インフルエンザによる全ての入院患者を報告対象として導入された2009年7月24日（30週）から2010年3月23日（12週）に i(interim)NESID（暫定的感染症サーベイランスシステム）への報告データを使用した。12月21日までは、入院サーベイランス対象患者には、原則として全員PCR等によるウイルス診断が実施されたが、22日以降は死亡例又は重症化した患者（脳症、人工呼

吸器使用、集中治療室入室のいずれかに該当）に限定実施され³⁾、全員がAH1pdm陽性であった。愛知県分の基礎疾患は、厚生労働省より示された分類⁴⁾及び「疾病及び関連保健問題の国際統計分類」（ICD-10）に基づきデータクリーニングを実施の後集計し、全国集計⁵⁾と比較検討した。

結果

1 2009年7月～2010年3月の愛知県における新型インフルエンザの週別定点当たり報告数と入院患者数の推移（図1）

図1に愛知県でインフルエンザの診断を受けた週別定点当たり報告数及び入院患者数を示す。1999年に開始された感染症発生動向調査において、インフルエンザ定点当たり報告数の愛知県の最高値は、2004年/2005年シーズンの64.1（2005年8週）であり、2009年における新型Fluのピーク値58.8（46週）は、2002年/2003年シーズンのピーク値59.5（2003年4週）に次いで3番目の高値である（2011年6週現在）。

愛知県において2009年31週～2010年13週に当所及び名古屋市衛生研究所において検出したインフルエンザウイルスは、少数の輸入例を除いてすべてAH1pdmであった⁶⁾ことから、この時期に報告されたインフルエンザはすべて新型Fluとみなした。入院患者数は定点当たり報告数と同様の推移を示し、ピークはともに2009年46週であった。

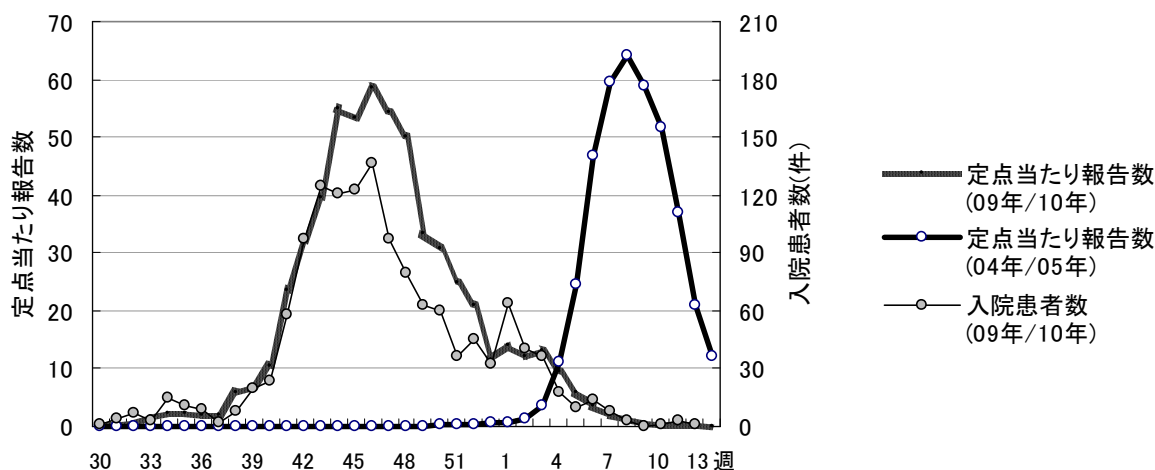


図1 インフルエンザ定点当たり報告数、入院患者数
（愛知県、2004年30週～2005年13週、2009年30週～2010年13週）

2 入院サーベイランス解析による患者の特性

愛知県内医療機関からの入院サーベイランスへの報告総数は 1,374 件と全国(17,583 件)の 7.8%を占めた(表 1)。これは愛知県人口の全国に占める割合(5.8%)よりやや高い。

(1)入院患者における基礎疾患保有率

図 2 に入院患者における基礎疾患保有率を疾患群別に示す。妊娠は厳密には疾患ではないが、腹式呼吸が困難となるので下気道親和性の残存している今回の新型 Flu においては主なハイリスク要因となっている。以下の記載において「基礎疾患」には、妊

娠を含んでいる。

愛知県では基礎疾患なしの割合は 65.3%であり、主な基礎疾患は慢性呼吸器疾患 19.1%が最も多く全国と同様の傾向を示した。神経疾患・神経筋疾患は 4.7%と全国の 1.6%より高い割合となっていたことが目立った。

図 3 に年齢階級別基礎疾患保有率を示す。15 歳未満(小児)では基礎疾患なしが 7 割を占めるが、15 歳以上(成人)では逆に何らかの基礎疾患を持つ患者が 7 割を占めた。さらに 65 歳以上の高齢者(85 名)で基礎疾患がない者は 22.4%と低い割合であった。

表 1 新型インフルエンザ第 1 波(2009 年 31 週～2010 年 12 週)患者集計(愛知県・全国)

	愛知県				全国		
	報告数若しくは推計受診者数	推計受診者 10 万対	人口 10 万対	人口 10 万対(年齢調整値)*2	報告数若しくは推計受診者数	推計受診者 10 万対	人口 10 万対
死亡*1	16	1.5	0.2	0.2	198	1.0	0.2
重症者*1	123	11.8	1.7	1.6	1,641	7.9	1.3
入院患者*1	1,374	131.9	18.5	17.4	17,583	84.7	13.8
受診者	1,042,000	-	14,054.3	13,231.3	20,770,000	-	16,294.0
人口	7,414,098	-	-	-	127,470,000	-	-

*1; 入院サーベイランスに基づく(全国⁵⁾)、 *2; 全国の人口構成で調整。

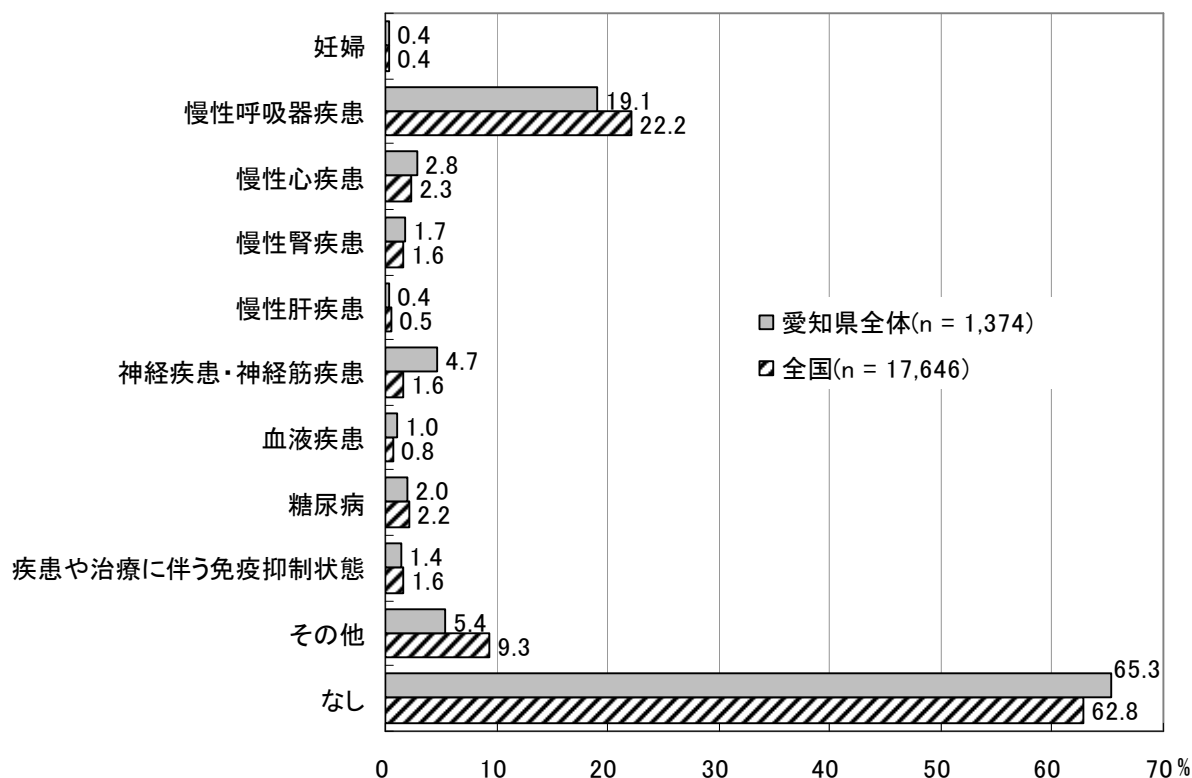


図 2 新型インフルエンザ入院患者の疾患群別基礎疾患保有率 (%) (重複あり、全国・愛知県、2009 年 7 月 24 日～2010 年 3 月 23 日報告分)

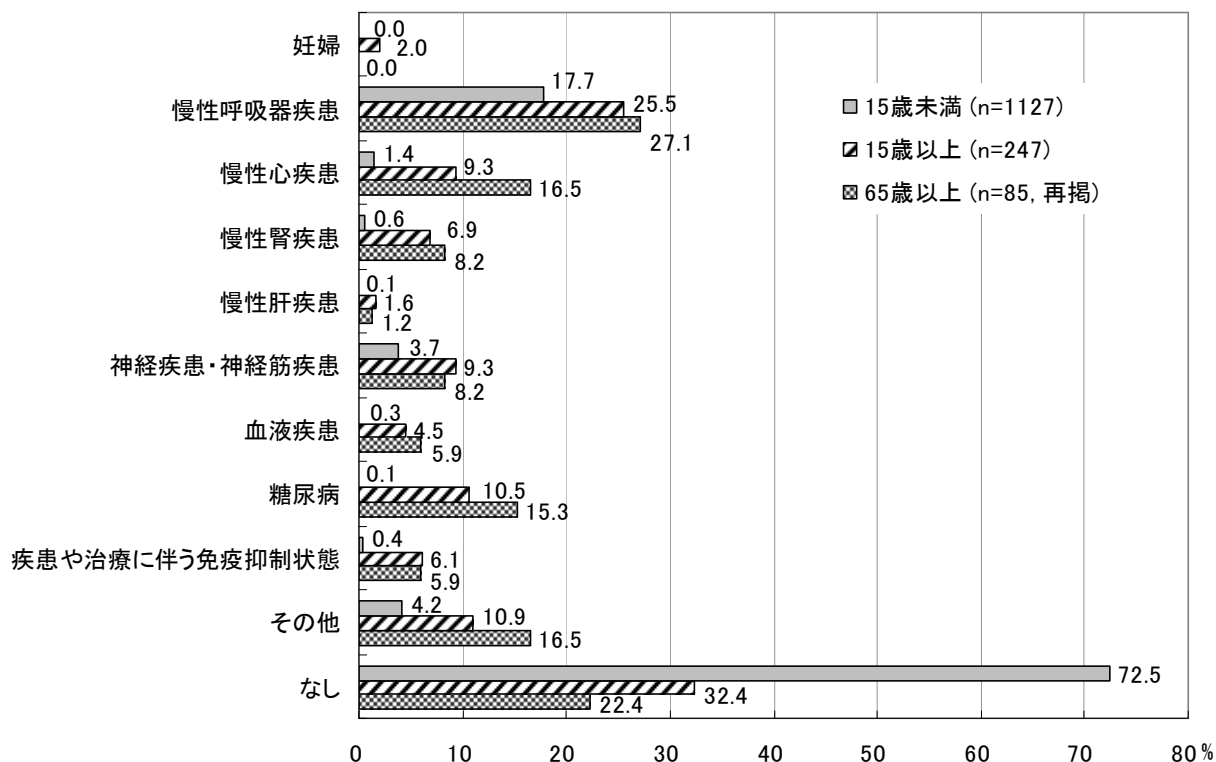


図3 年齢階級別入院患者における疾患群別の基礎疾患保有率 (%)
(重複あり、愛知県、2009年7月24日～2010年3月23日報告分、65歳以上再掲)

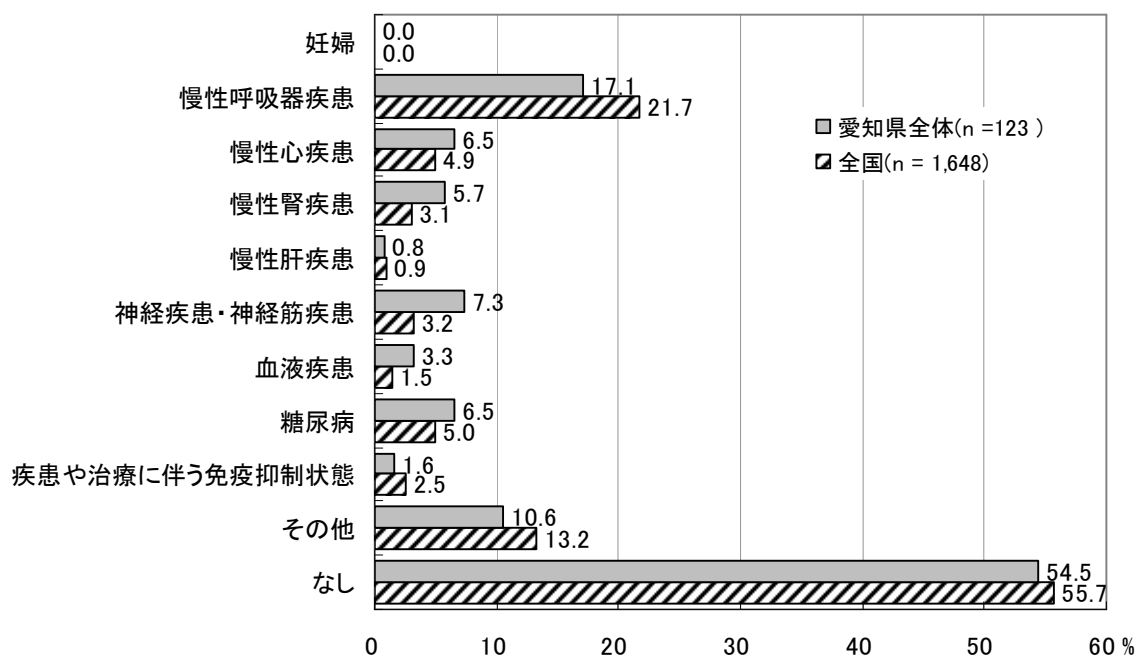


図4 重症患者における基礎疾患保有率 (%)
(全国・愛知県、2009年7月24日～2010年3月23日報告分)

主な基礎疾患としては、小児・成人とも慢性呼吸器疾患が17.7%、25.5%と最も多かった。高齢者に最も多い基礎疾患は慢性呼吸器疾患(27.1%)、次いで慢性心疾患16.5%、糖

尿病15.3%、慢性腎疾患8.2%などであった。

(2)重症患者における基礎疾患保有率
入院サーベイランスにおける重症患者の定義は、入院中に1)急性脳症がみられた

2)人工呼吸器を使用、3)集中治療室に入室の1つ以上を満たす者とされた³⁾。愛知県における重症患者は全入院患者1,374人中123人と9.0%(全国は9.3%)であった(図4)。重症患者において基礎疾患なしは54.5%であり、全国と同様入院患者全体における基礎疾患なしの65.3%(図2)より低かった。

3 死亡事例(図5)

該当期間に愛知県において報道発表のなされた新型インフルエンザによる死亡者数は16人であった。年齢階級別では60歳以上が7人と最も多く、0~4歳2人、5~9歳2人、40歳代2人、50歳代2人、10歳代1人であった。0~9歳の4人はすべて基礎疾患なしであったが、10歳以上の12人中基礎疾患なしは50歳代の1人のみであった。基礎疾患を有していた10人の疾患群別件数は(重複あり)、慢性呼吸器疾患2、慢性心疾患3、慢性腎疾患3、神経疾患・神経筋疾患2、血液疾患4、糖尿病1、疾患や治療に伴う免疫抑制状態(推定)4であった。該当期間中に本県及び全国において新型インフルエンザによる妊婦の死亡はなかった。

4 推定受診者数(率)・入院数(率)・重症化率・死亡率

(1)愛知県における年齢階級別入院者数

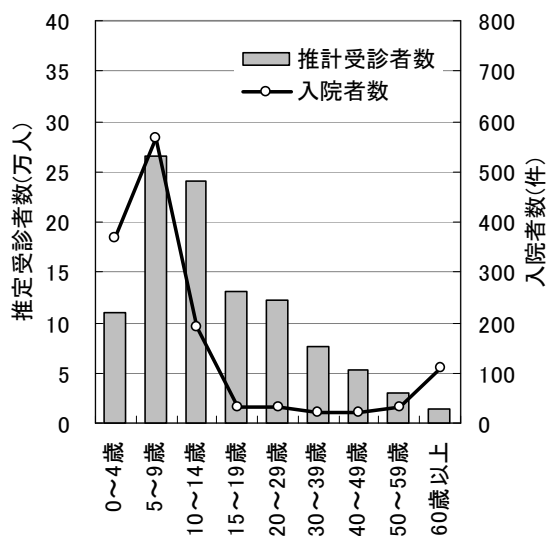


図6-1 年齢階級別推定受診者数及び入院数(愛知県、2009年31週~2010年12週)

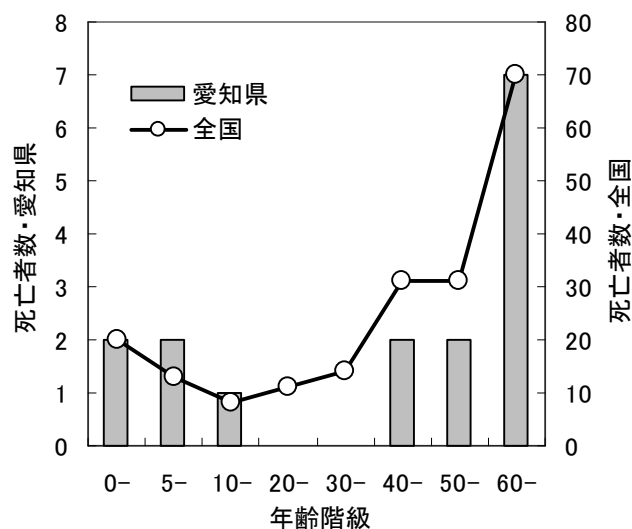


図5 年齢階級別新型インフルエンザ感染を伴う死亡者数(全国・愛知県、2009年7月24日~2010年3月23日報告分)

を、年齢階級別推計受診者数(国立感染症研究所感染情報センターが全国罹患数推計に用いている方法⁷⁾に準じてインフルエンザ定点医療機関から報告された患者数に基づき推計⁸⁾)とともに図6-1に示す。該当期間における入院総数1,374人のうち5~9歳が568人と41%、さらに推計受診者総数(1,042,000人)においても、5~9歳は265,000人と25%を占め、いずれも実数では最多であった。図6-2には年齢階級別人口10万対推定受診者数割合(以下、受診率)

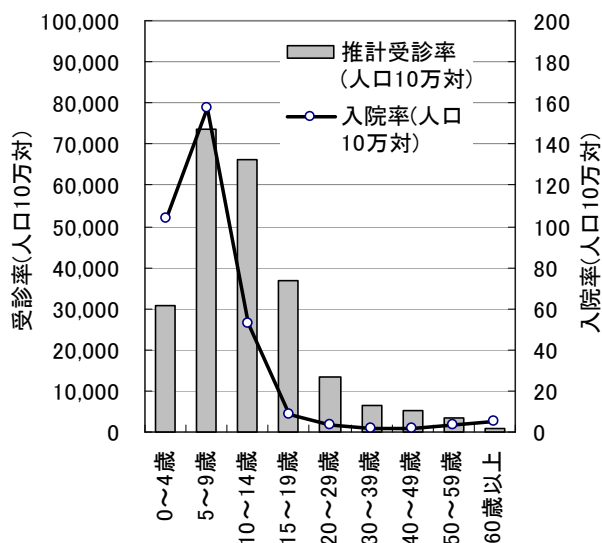


図6-2 年齢階級別受診率及び入院率(愛知県、年齢階級別人口当たり、2009年31週~2010年12週)

及び入院率を示す。受診率(人口 10 万対)は 5~9 歳の 73,704.3 が最も高く、次いで 10~14 歳(66,303.9)、15~19 歳(36,977.6)、0~4 歳(30,817.9)の順に高かった。

入院率(人口 10 万対)は受診率同様 5~9 歳(157.8)の年齢層で最も高く、以下 0~4 歳(103.6)、10~14 歳(52.7)、15~19 歳(8.7)の順に高かった。30 歳以上では年齢階級が上がるにつれ、入院率が微増する傾向が見られた。

(2)年齢階級別推定受診者 100 人当たりの入院率及び重症化率を図 7 に示す。入院率・死亡率ともに 60 歳以上が最も高く、年齢階級の低下とともに入院率・重症化率も低下し 15~19 歳が最低であった。14 歳以下の小児では低年齢ほど入院率・重症化率が上昇した。

考 察

1 愛知県における報告数・推計受診者数の全国集計との比較

愛知県及び全国の定点医療機関からのインフルエンザサーベイランス報告総数と各々に基づく推計受診者数、及び入院サーベイランス報告数とそれに基づく人口 10 万対入院率等をまとめて表 1 に示す。愛知県における人口 10 万対入院患者数 18.5 は全国に比べやや高いが、人口 10 万対推計受診者数 14,054.3、重症者数 1.7、死亡者数 0.2 は、全国集計と同様とみなせる範囲にあった。愛知県においては感染者の多い 10 歳未満の若年者の割合が全国より高いので全国の人口構成¹⁰⁾で調整してみると、人口当たりの推計受診者数、重症者数は全国とほぼ同程度となったが、入院者数は 17.4 と依然として全国(13.8)より高かった(表 1)。一方愛知県における人口 10 万人当たり推計受診者数は、全国の 86%、人口構成調整後では 81%であった。最近菅原ら¹²⁾は薬局サーベイランスの有用性検討において、全国の感染症発生動向調査における推定患者数の過大推計を示唆している。

2009 年に発生した新型インフルエンザ流行時に、単位人口当たり愛知県の推計受診者及び入院患者全数報告数が、より規模

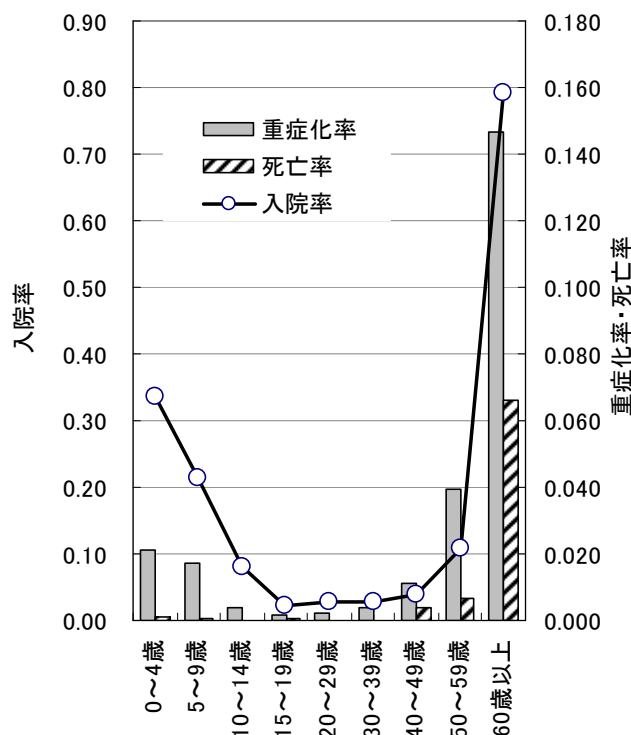


図7 年齢階級別入院率、重症化率及び死亡率 (愛知県、推定受診者100人当たり、2009年7月24日～2010年3月23日報告分)

の大きい全国集計と同様の傾向を示したことから、県内の医療機関及び保健所を始めとする各行政機関の協力・連携に基づく患者発生状況の「監視 surveillance」体制が、感染症発生動向調査開始以来最長となった今回の流行においても、流行終息まで良好に機能したと考えられる。

定点から毎週報告される受診患者数に基づくインフルエンザサーベイランスシステムにおいて、全国の活動中の医療施設 68,147 か所(2005年)のうち、4,693 か所がインフルエンザ定点に指定されており(抽出率 6.9%)⁷⁾、愛知県においても活動中医療施設数 3,433 か所(2005年)のうち 195 か所(抽出率 5.7%)が指定されている。愛知県のインフルエンザ定点抽出率は全国に比べ低い、受診者数推計値の標準誤差率は 2009 年 31 週～2010 年 12 週の期間において 6.0～45.7%、特に患者数の多かった 2009 年 42 週～51 週においては 45 週(12.4%)を除き 10%以下と特に低かった。これは愛知県全体の定点医療機関の指定状況が適切であることを示している。加えて、定点外医療機関も対象として全数報告を求められた入院

表2 慢性呼吸器疾患を有している場合の重症化に対する相対危険度(愛知県)

	全年齢	0-14歳	15-64歳	65歳以上
人口 ⁹⁾	7,414,098	1,078,196	4,837,668	1,462,681
慢性呼吸器疾患推定患者数 ^{*1}	64,678	24,973	20,480	19,516
重症患者 ^{*2}	123	77	34	12
重症患者のうち慢性呼吸器疾患保有者数 ^{*2}	21	13	8	0
相対危険度	19.6	7.3	55.6	-

*1; 平成20年患者調査¹¹⁾及び人口^{9,10)}に基づき算出、*2; 入院サーベイランスの定義⁵⁾に基づき報告された症例

サーベイランスについても全国集計と同様の傾向を示したことから、各保健所管内において、定点以外の医療機関からも適切な報告の得られる体制が確立され、流行時のピークにおいても維持されていたと推測された。

したがって新型インフルエンザの流行状況や患者重症度の全国集計は、愛知県における流行状況推察及び将来の新型インフルエンザをはじめとする新興・再興感染症行動計画等の見直しや策定に当たり、大いに参考にできると考えられる。

2 愛知県における入院サーベイランス報告内容の検討

愛知県における入院サーベイランス報告全1,374例のうち基礎疾患を有しないものは65.3%、15歳未満では72.5%を占めていた。一方で、推定受診者数当たり入院率の高い(図6、7)高齢者においては基礎疾患を保有しない者の割合は低く、慢性呼吸器疾患、慢性心疾患、慢性腎疾患、糖尿病などの基礎疾患保有者が8割を占めた。60歳以上の年齢階級別人口当たりの入院率は、小児より低かったが、推定受診者当たり入院率、重症化率及び死亡率は他のいずれの年齢階層よりも高かった(図6、7)。また、基礎疾患を有する者477例(34.7%)のうち、最も多い疾患群は慢性呼吸器疾患263例19.1%であり、重症入院患者123例においても、慢性呼吸器疾患21例17.1%が最多であった。そこで、慢性呼吸器疾患を有している場合の重症化に対する相対危険度を検討した(表2)。平成20年患者調査¹¹⁾における傷病分類別総患者数に基づく推定有病率を用いて愛知県における慢性呼吸器疾患患者数を推定した。今回はデータの得られる

「気管支炎及び慢性閉塞性肺疾患」並びに「喘息」を慢性呼吸器疾患推定患者とし重症化に対する相対危険度を算出した。慢性呼吸器疾患を有する場合の相対危険度は全年齢では19.6、15歳以上の成人で55.6ときわめて高く、小児でも7.3と高値であった。

今回の解析に先立って実施した入院サーベイランスのデータクリーニングの際、分類候補に予め挙げられている疾患を選択する方が適当と思われる疾患名が「その他」に入力されている症例が散見された。積極的疫学調査において、基礎疾患に関する情報収集は、感染源特定に直結しないこともあり、ともすれば他の項目より軽視されかねない。しかし新興感染症の第一波流行時には、重症化のハイリスク要因となる基礎疾患等の迅速な把握が、効果的な予防対策ひいては死亡率低下につながることも期待でき、予防及び医療対策策定上極めて重要であることを指摘しておきたい。

3 小児や高齢者にみられた特徴に基づく提案

2009/10 シーズンを対象とした今回の解析では、入院患者において基礎疾患をもたない者が3/4を占めた15歳未満の小児については、全員が新型Flu感受性者と考えられ、さらに罹患患者数当たり一定の確率で重症患者が出現していた。したがって重症患者の集中的発生に伴う人工呼吸器や集中治療室等医療資源の一時的枯渇を回避するには、通常時より患者数の少ない基準での学級閉鎖・休校の実施等による罹患受診者数の平準化が有効と考えられる。

一方高齢者層では推定受診者数当たりの入院率・重症化率・死亡率が高く、基礎

疾患保有者で顕著であった。高齢者においては基礎疾患保有者に重点を置いた予防対策（例：予防接種の重点的な勧奨）が考えられる。2009年の新型Fluと近縁の血清亜型ウイルスの流行は、1910年代の「スペイン風邪」と1950年代の「アジア風邪」の間にもあり、90歳未満の高齢者にも一定割合で存在した免疫保有者が罹患者数を押し下げていたと考えられる。仮に次の新型Fluが過去100年間に人類の間で流行のない、即ちH1, H2, H3以外の血清型に属するウイルスにより発生したら、高齢者も小児と同時にかつ高率に罹患して医療負荷のピークが極大化するおそれがある。

一般に新興感染症発生時においては、通常時よりサーベイランスの対象を拡大（例：発生当初の全数報告、入院患者全数報告）し、情報還元頻度を高める（例：発生当初毎日情報を更新）べきである。今回の新型Fluに対しては、これらに加えてPCRを主体とするウイルス検査の迅速な実施による情報の即時性と信頼性の確保に衛生研究所として一定の貢献ができたと思う¹³⁾。一方反省点として、行政第一線の保健所や県庁に対して随時データ分析に基づく適切な科学的根拠や助言をすべき立場にあったが随時提供には至らなかった。なお、今後は地方自治体の裁量と責任は増す方向にある¹⁴⁾ので、基幹地方感染症情報センターにはデータ提供にとどまらず解析及びシンクタンク機能が期待される¹⁵⁾。基幹地方感染症情報センターでの大規模な新興感染症対応という貴重な経験を記録・解析し、今後とも広く共有される情報発信に努めたい。

謝 辞

入院サーベイランスデータを提供していただきました名古屋市健康増進課、豊田市保健所、豊橋市保健所及び岡崎市保健所に深謝します。また、愛知県分の入院サーベイランスデータの使用を許可していただいた健康対策課に感謝します。

文 献

1) 愛知県健康福祉部健康担当局健康対策

- 課：愛知県新型インフルエンザ対策行動計画（平成17年12月（平成20年1月改訂））
- 2) 鳥インフルエンザ等に関する関係省庁対策会議：新型インフルエンザ対策行動計画（平成17年12月（平成18年5月改訂））
新型インフルエンザ行動計画
- 3) 厚生労働省新型インフルエンザ対策推進本部事務局：『新型インフルエンザ（A/H1N1）に係る今後のサーベイランス体制等について（二訂版）』平成21年12月14日
- 4) 厚生労働省：『基礎疾患を有する方へ「新型インフルエンザの優先接種の対象とする基礎疾患の基準」手引き（概要）』平成21年11月11日。
- 5) 厚生労働省：新型インフルエンザの発生動向～医療従事者向け疫学情報～Ver. 3
2010年4月23日。
- 6) 愛知県衛生研究所：2008/09・2009/10シーズンインフルエンザウイルス分離・検出状況（2010年5月20日現在）、
http://www.pref.aichi.jp/eiseiken/67f/infbunri08_09.htm。
- 7) 永井正規：感染症発生動向調査に基づく流行の警報・注意報および全国年間罹患数の推計－その9－。「疫学的・統計学的なサーベイランスの評価と改善グループ」研究報告書，29-75，2009。
- 8) 續木雅子，竹島雅之，広瀬かおる，判治岳史，皆川洋子：愛知県感染症発生動向調査2009年定点把握疾病の概要とインフルエンザ罹患数推計，愛知県衛生研究所報，60，1-8，2010。
- 9) 愛知県県民生活部統計課：愛知県人口動向調査結果（年速報，2009年12月24日）
統計表第3表。
- 10) 総務省統計局：人口推計月報 年齢（5歳階級），男女別推計人口。平成22年1月1日現在（概算値）。
- 11) 厚生労働省：平成20年患者調査。
- 12) 菅原民枝，大日康史，川野原弘和，谷口清州，岡部信彦：2009インフルエンザA(H1N1)におけるリアルタイム薬局サーベイランスとインフルエン

- ザ推定患者数，感染症学雑誌，85，8-15，2011.
- 13) 皆川洋子，安井善宏，秦 眞美，小林慎一，伊藤 雅，藤原範子，水谷絵美，安達啓一，山下照夫，下岸 協，續木雅子，竹島雅之，広瀬かおる，判治岳史，遠山明人：新型インフルエンザ A/H1N1 発生に対する愛知県衛生研究所の対応検証(第 1 報)全数報告期の総括，愛知県衛生研究所報，60，29-40，2010.
- 14) 厚生労働省：新型インフルエンザ専門家会議意見書，平成 23 年 2 月 28 日.
<http://www.mhlw.go.jp/stf/shingi/2r985200000132k0.html>
- 15) 皆川洋子：愛知県衛生研究所，公衆衛生，74，1050-1053，2010.

Features of pandemic influenza A/H1N1 2009 in Aichi Prefecture depicted from case- and sentinel-based surveillance data

Masayuki Takeshima, Masako Tsuzuki, Kaoru Hirose, Takeshi Hanji,
Yoshihiro Yasui, Teruo Yamashita, Kyou Shimogishi, Hiroko Minagawa

In 2009, pandemic by a new swine-origin influenza A virus (A/H1pdmN1) originated from the North America. The virus was detected in Japan in May and the first cases in Aichi Prefecture was reported on June 1. By analyzing the weekly sentinel-based influenza out-patient surveillance and admission case surveillance data from NESID (National Epidemiological Surveillance System) from 30th epidemiological week (e.w.) of 2009 to 12th e.w. of 2010, we described the severity and disease burden of the pandemic in Aichi and compared with the overall national situation. Based on the reported numbers of newly diagnosed cases from the 195 medical institution, the estimated total number of influenza patients was one million in Aichi. By age group, the largest incidence (25.4%) was estimated in the age of 5-9 years (y), followed by the 10-14 y (23.2%) and the 15-19 y (12.6%). Among the 1,374 reported hospitalized cases with AH1pdm infection, 477 had at least one of the underlying disease conditions, of which 263 cases (19.1%) had chronic respiratory illness. The highest hospitalization rate was observed in the age group of 5-9 y (157.8 per 100,000 population), followed by the 0-4 y (103.6) and the 10-14 y (52.7). Although the hospitalization rate in those over 60 y was low (5.4), severity and mortality rate were significantly higher than the younger age groups. Cumulative number of the death was 16. Children (0-14y) were universally sensitive to AH1pdm. Further analyses of the surveillance data would provide with useful information to prepare against future pandemic.

Key words : pandemic influenza A/H1N1, sentinel surveillance, case-based surveillance, severity, mortality, health planning

調 査 研 究

2006 年から 2010 年に 流入下水から分離されたエンテロウイルスの消長

水谷絵美、安達啓一、藤原範子、伊藤 雅、山下照夫、藤浦 明、皆川洋子

要 旨

2006 年 6 月から 2010 年 5 月までに境川浄化センター（愛知県刈谷市衣崎町）において週に一度採水された流入下水 204 検体についてウイルス分離を試みた。その結果、108 検体から 16 血清型 160 株のエンテロウイルスが分離された。これら分離ウイルス株を感染症発生動向調査事業において同時期の患者からの分離株と比較した結果、患者から分離されたが下水からは分離されなかった血清型はコクサッキーウイルス A16 型 (CV-A16)、エンテロウイルス 71 型 (EV-71)、エコーウイルス 9 型 (E-9)、E-18 の 4 型であった。また、CV-B1、及び CV-A9 も患者からの分離株と比較して同時期の下水からの分離株に占める割合が小さかった。下水検体と患者検体の両者からのウイルス分離傾向の比較を通して、下水からのエンテロウイルス分離の意義について考察する。

キーワード：流入下水、エンテロウイルス、ウイルス分離、サーベイランス

序 文

エンテロウイルス属は、ヘパトウイルス属、パレコウイルス属、コブウイルス属などとともにピコルナウイルス科に属する動物ウイルスである。ヒトに感染症を起こすエンテロウイルスには、ポリオウイルス 1～3 型 (Poliovirus:PV-1～3)、A 群コクサッキーウイルス 1～24 型 (Coxsackievirus A:CV-A1～24)、B 群コクサッキーウイルス 1～6 型 (Coxsackievirus B:CV-B1～6)、エコーウイルス 1～34 型 (Echovirus:E-1～34)、エンテロウイルス 68～107 型 (Enterovirus:EV-68～107) が知られている^{1),2)}。急性灰白髄炎（ポリオ）の原因ウイルス PV は脊髄前角の運動神経細胞に感

染し、弛緩性麻痺を生じさせる。1950 年代までは世界各地でしばしば流行がみられたが、ワクチン定期接種の普及により、日本では 1972 年以降野生株検出報告はなく、2000 年には日本を含む北太平洋地域でのポリオ根絶宣言がなされた。一方で、ポリオウイルス以外のエンテロウイルスは手足口病、ヘルパンギーナ、無菌性髄膜炎等の病原体として、毎年さまざまな血清型のウイルスが流行を繰り返している。例えば、発熱や水疱を伴う手足口病の主な原因ウイルスは CV-A16 や EV-71 であることが知られている¹⁾。通常は数日の経過で自然治癒するが、EV-71 感染症は他のエンテロウイルスに比べ重症化の頻度が高く、髄膜炎や脳

炎の合併や死亡例も珍しくない。1990年代にマレーシアや台湾³⁾で、2000年代には中国⁴⁾で大流行し、死亡例も報告されている。また、エンテロウイルス感染症の集団発生も度々報告があり^{5)~7)}、エンテロウイルスは動向に注意が必要なウイルスの1つと言える。しかし、エンテロウイルスは不顕性感染で終わることも多く、発症した患者検体からのウイルス分離のみではウイルスの消長を把握できているとは考えがたい。エンテロウイルス(“entero”は『腸』を意味する)は主に腸内で増殖し、長期間にわたって便にウイルスが排出されることが知られている。したがって、人の尿尿が流入する下水は、患者や一時的キャリアから排泄されたウイルスが流入し、その地方のウイルス流行の指標となりうる可能性を含んでいると考えられる。これまでに環境水(下水、河川水)中のウイルス汚染状況について各地で調査されており、エンテロウイルスの他にレオウイルス、アデノウイルス、ノロウイルスなど腸管系ウイルスの検出が報告されている^{8)~12)}。

そこで、愛知県刈谷市、豊田市、安城市、大府市、知立市、豊明市、みよし市、東郷町、東浦町を流域とし、愛知県(名古屋市を除く)の人口の約14.9%をカバーする境川浄化センターに流入する下水について、下水中のエンテロウイルス分離を実施し、患者から分離されるウイルスと比較しその有用性について検討した。

材料と方法

1. 調査検体

愛知県中央部を流域とする境川浄化センターに流入する下水で、2006年6月~2010年5月の間に週1度、採水された204検体を用いた。

2. ウイルス分離及び型別

下水の遠心上清をポリエチレングリコール6000にて10倍に濃縮し、抗生物質(ペニシリン100単位/mL、ストレプトマイシン100 μ g/mL、ファンギゾン1.25 μ g/mL、ゲンタマイシン50 μ g/mL)及び0.2% bovine serum albumin を添加した Veal

infusion broth で溶出したものを下水検体とした。

ウイルス分離には Vero 細胞、HeLa 細胞及び RD-18S 細胞を用いた。各細胞に下水検体を接種し、接種後の細胞については3~4日毎に抗生物質及び2%牛胎児血清を添加した Eagle's MEM 培地を交換し、2週間観察した。細胞変性効果のみられたものに関しては、2代目まで継代し、さらに細胞変性効果のみられたものをウイルス分離株とした。

分離されたウイルスはウイルス実験学¹³⁾の方法に準じ、中和法で血清型を決定した。なお、中和法で用いたポリオウイルス用組血清、エコーウイルス用組血清、EV-71 単味血清及び CV-A16 単味血清は国立感染症研究所より分与されたもの、CV-A9 単味血清及び CB 群用単味血清はデンカ生研製の抗血清を使用した。また、分離されたものの中和法での型別が困難であった株については VP1 領域の塩基配列に基づいて型別した。

3. 愛知県における患者からのウイルス分離状況

愛知県では1976年より感染症発生動向調査の一環として、主に小児の消化器系疾患、呼吸器系疾患、神経系疾患の病原ウイルス検索を実施しており、協力医療機関において採取された糞便、咽頭ぬぐい液、髄液などを検体とし、ウイルス分離・検出を実施している。現在では、名古屋市を除く県内15保健所管轄地域に1カ所以上設けられた総計31医療機関に検体採取をお願いしている。2006年6月~2010年5月の4年間においては、約4,000名の患者検体を調べ、20血清型576株のエンテロウイルスが分離されている(図1)。分離されたウイルスのうち、EV-71は2006年に、CV-A16は2008年に非常に多く分離されている。両ウイルス共に手足口病の主な原因ウイルス¹⁾とされており、2006年及び2008年は他の年と比べて、手足口病患者数の多い年であった。また、分離されたPV株はすべてVP1領域のシーケンス解析を行い、ワクチン株由来であることを確認している。

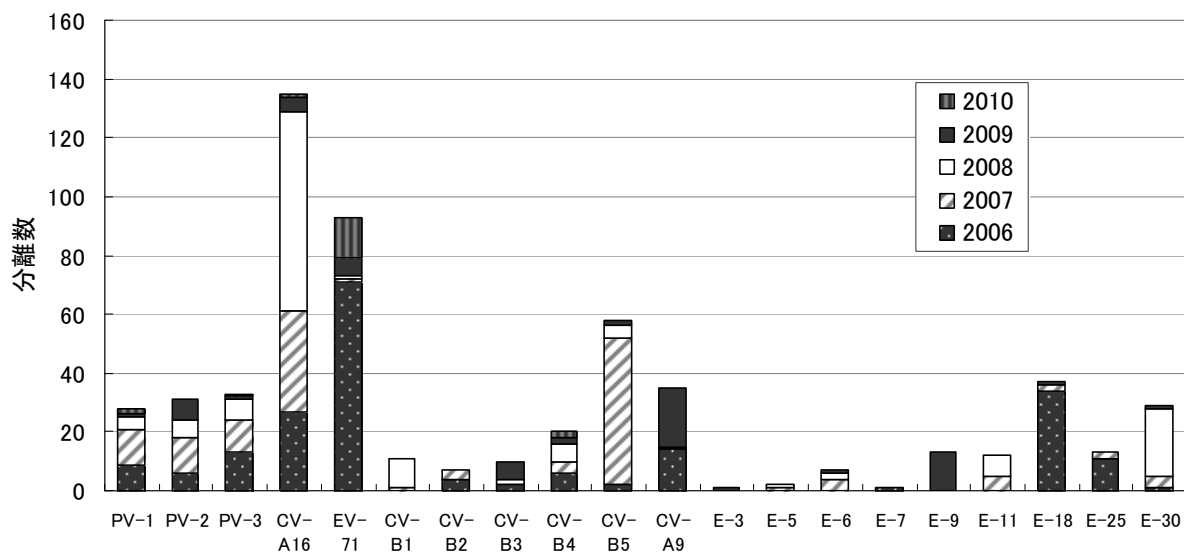


図1 患者から検出されたエンテロウイルス (2006年6月～2010年5月)

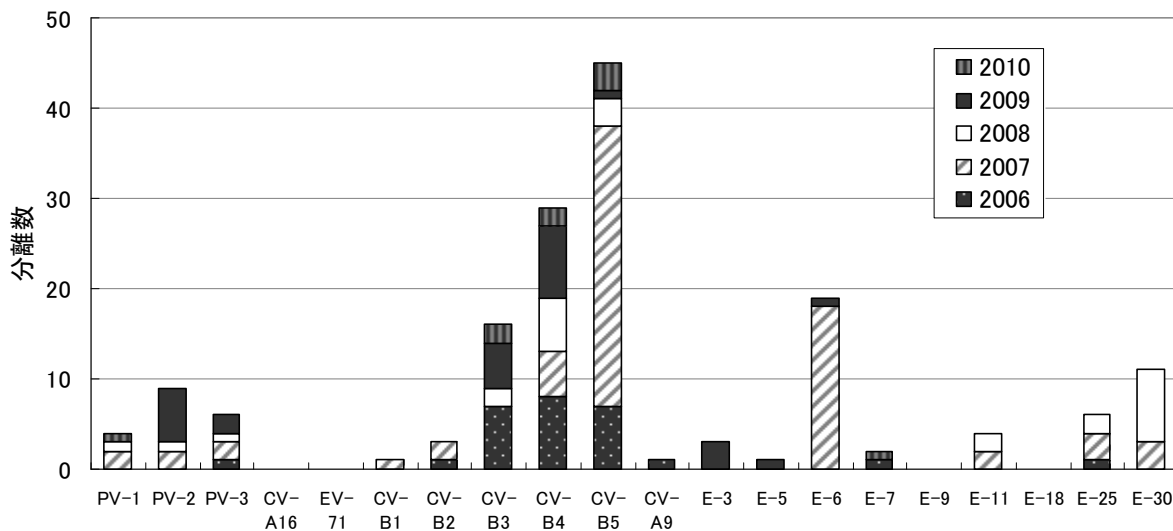


図2 下水から分離されたエンテロウイルス (2006年6月～2010年5月)

結果及び考察

下水 204 検体中 108 検体 (52.9%) から 16 血清型 160 株のエンテロウイルスが分離された (図 2)。このうち、10 株以上分離されたウイルスは CV-B3、CV-B4、CV-B5、E-6、E-30 であった。特に、CV-B3 は 2006 年、CV-B5 及び E-6 は 2007 年、E-30 は 2008 年に下水から多く分離されている。患者及び下水から分離された株の月別消長を比較すると、多くのウイルスについて検出時期の一致がみられた (図 3)。

下水由来と患者由来のウイルス分離頻

度を比較した結果、患者からは検出されやすいが下水からは分離されにくいウイルス、逆に下水からの分離に比べ患者からの分離は少ないウイルスの存在が明らかになった (図 1、2)。CV-A16 及び EV-71 は調査期間中に患者から非常に多く検出されたが、下水からは全く検出されなかった。他にも、患者からは分離された E-9 及び E-18 は下水からは分離されず、CV-A9 及び CV-B1 については患者からの分離数と比較して下水からの分離株に占める割合が小さかった。

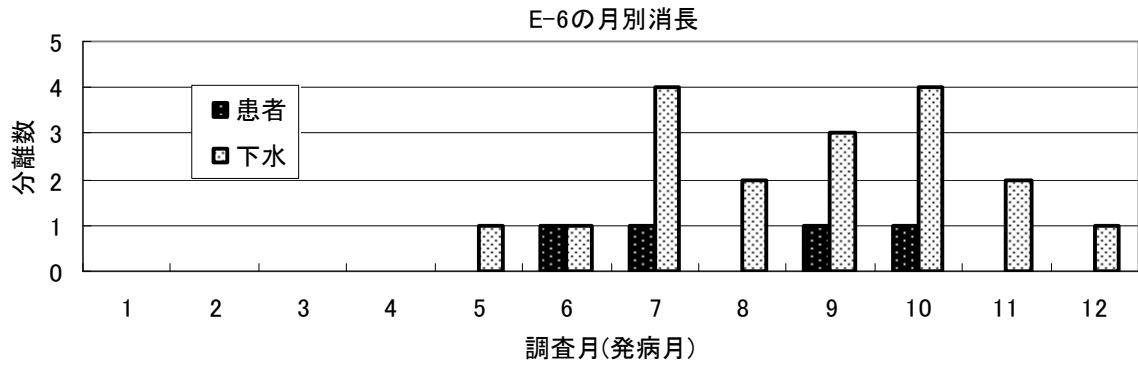
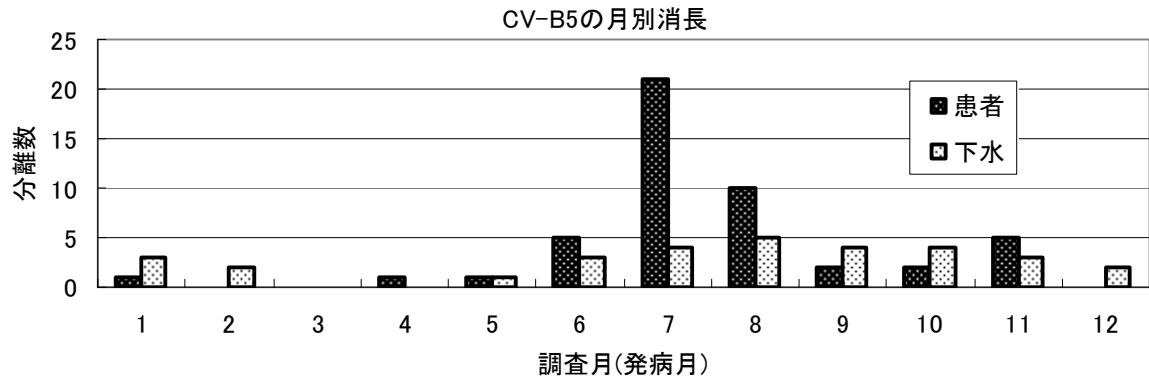


図3 コクサッキーウイルスB5型(CV-B5)及びエコーウイルス6型(E-6)の月別消長 (2007年)

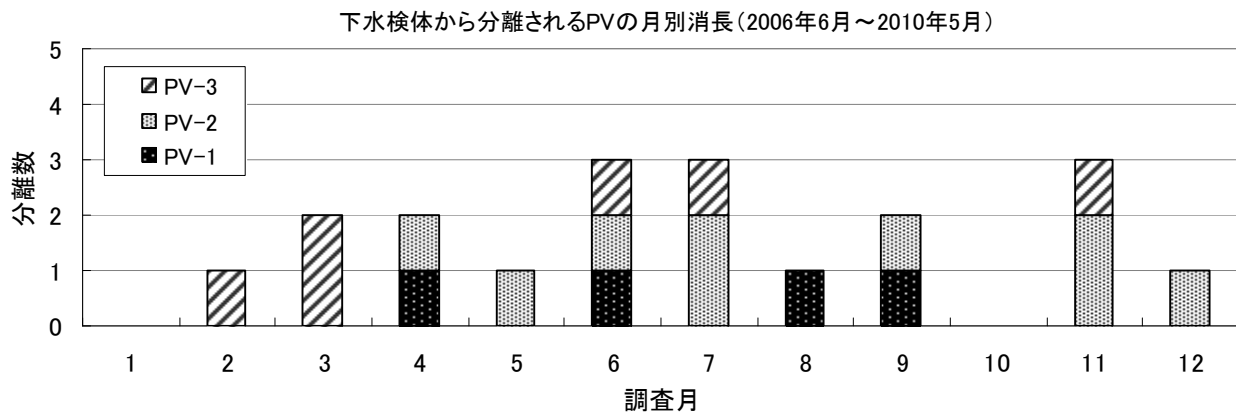
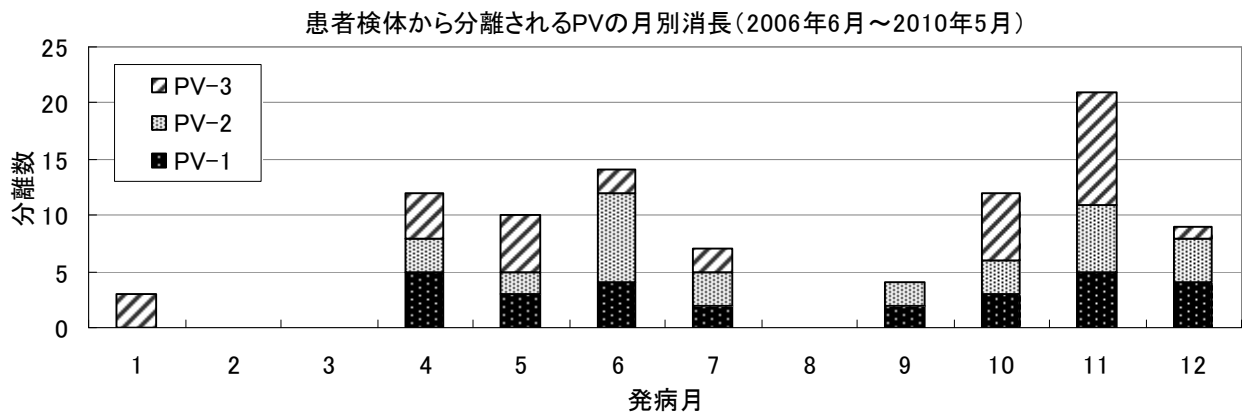
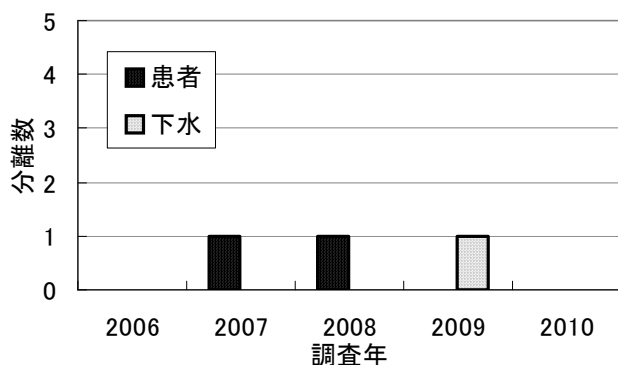
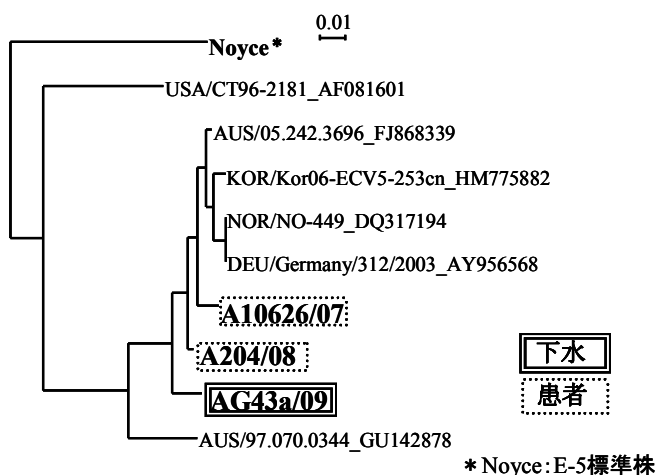


図4 ポリオウイルス(PV)の月別消長 (2006年6月～2010年5月)



a. エコーウイルス5型の年次消長



b. エコーウイルス5型の系統樹解析

図5 エコーウイルス5型の年次消長 (a) と系統樹解析 (b)

下水検体と患者検体で分離の傾向が異なる理由として、前述した不顕性～医療を要しない軽症者の存在のほか、環境中でのウイルスの抵抗力や、複数のウイルスが存在した場合の細胞培養における増殖速度の違いに伴う検出率の偏り等が考えられる。また、ウイルス粒子の凝集や構造タンパクの状態により抵抗力が異なる事が報告されており^{14),15)}、ウイルス粒子の環境中での状態の違いが影響している可能性も考えられる。今回の研究においても、エコーウイルスは、血清型により下水及び患者からの分離傾向が同じものとそうでないものがあった。また、増殖速度の遅いEV-71などは下水で分離されない傾向にあった。

PV は世界保健機関 (WHO) による根絶計画が進行中である¹⁶⁾。愛知県内において乳幼児へのポリオ生ワクチン定期接種は、主に春と秋に実施されている。今回の調査期間中に下水から分離されたPV株19株はすべてVP1領域の塩基配列においてワクチン株と99%以上の相同性を保持していた。また、患者及び下水から分離されたPV株について調査期間における月別分離数を比較した。その結果、患者由来のPV株はワクチン投与時期(春、秋)に対応して分離される傾向にあることが明らかになった。一方で、下水由来のPV株は比較的季節を問わず分離された(図4)。

次に下水及び患者から分離されたウイルスの関係について明らかにするため、系統樹解析を行った。その結果、下水及び患者から相同性の高い株が分離された。さらに興味深いことに、採取された年の異なる下水及び患者検体から非常に相同性の高い株が分離された(図5、6)。このことから、E-5とE-25に関しては、年間を通じて感染が繰り返されていたと考えられた。

まとめ

下水204検体中108検体から16血清型160株のエンテロウイルスが分離された。多くのウイルスにおいて患者と下水検出時期に重なりがみられたことから、下水中のウイルス調査が人での流行状況を反映し、病原体サーベイランスを補強する手段として有用と考えられた。今後、さらに研究を進め、100近い血清型(遺伝子型)が知られているエンテロウイルスの、より多くの血清型について、人での流行がほぼ同時期に下水に反映されやすい血清型と一致の見出し難い血清型を解明したい。

謝辞

下水の定期的採水にご協力いただきました境川浄化センター及び衣浦東部保健所の方々に深謝いたします。

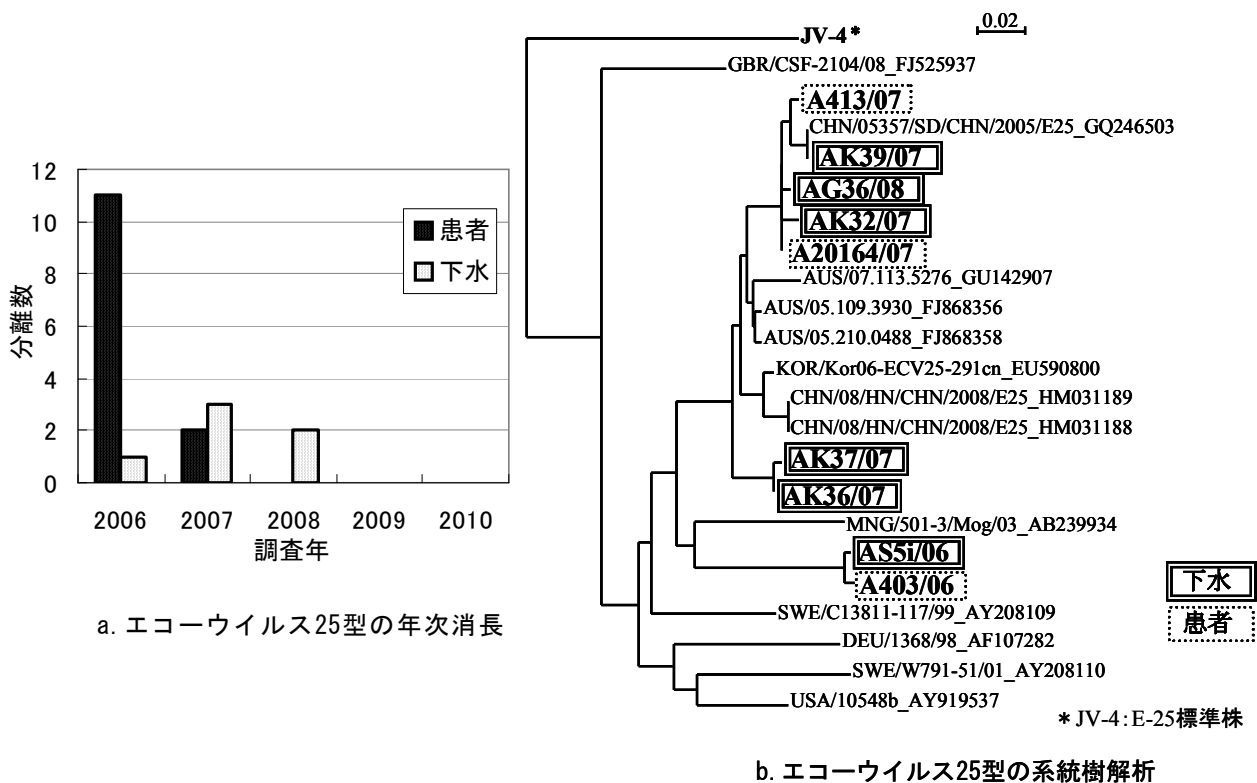


図6 エコーウイルス25型の年次消長(a)と系統樹解析(b)

参考文献

- 1) Pallansch M, Roos R: Enteroviruses: Polioviruses, Coxsackieviruses, Echoviruses, and Newer Enteroviruses, Fields Virology Fifth edition, 839-893, 2007.
- 2) Yamashita T, Ito M, Tsuzuki H, Sakae K, Minagawa H: Molecular Identification of Enteroviruses Including Two New Type (EV-98 and EV-107) Isolated from Japanese Travellers from Asian Countries, Journal of General Virology, 91(4), 1063-1066, 2010.
- 3) Shimizu H, Utama A, Yoshii K, Yoshida H, Yoneyama T, Sinniah M, Yusof MAB, Okuno Y, Okabe N, Shih S, Chen H, Wang G, Kao C, Chang K S, Miyamura T, Hagiwara A: Enterovirus 71 from fatal and nonfatal cases of hand, foot and mouth disease epidemics in Malaysia, Japan and Taiwan in 1997-1998, Japanese Journal of Infectious Diseases, 52, 12-15, 1999.
- 4) WHO: Outbreak news-Enterovirus, China, Weekly Epidemiological Record, 83, 169-170, 2008.
- 5) 山下照夫, 伊藤 雅, 長谷川晶子, 小林慎一, 秦 眞美, 田中正大, 皆川洋子: 新生児室におけるエコーウイルス18型の感染事例-愛知県, 病原微生物検出情報, 27, 15-16, 2006.
- 6) Sato K, Yamashita T, Sakae K, Suzuki Y, Ishikawa N, Nishimura Y: A New-born Baby Outbreak of Echovirus Type 33 Infection, Journal of Infection, 37, 123-126, 1998.
- 7) 長岡健朗, 加藤聖紀, 本田颯子, 小河正雄: エコーウイルス30型による無菌性髄膜炎の高校での集団発生事例-大分県, 病原微生物検出情報, 30, 8-9, 2009.
- 8) 藤浦 明, 小林慎一, 山下照夫, 梶島由佳, 伊藤 雅, 榮 賢司: 矢作川浄化センターに流入する下水からのウイルス分離について, 愛知県衛生研究所

- 報, 53, 21-26, 2003.
- 9) 佐藤 卓, 齋藤幸一, 小林良雄, 白藤周司: 下水中の病原ウイルスの動態に関する研究, 岩手県衛生研究所年報, 43, 19-24, 2000.
- 10) 田中真弓, 岸本直子, 川本 歩, 田川陽子, 本田達之助: 都市河川からのウイルス分離について, 鳥取県衛生研究所報, 33, 35-36, 1993.
- 11) 岩崎謙二: 下水からのウイルス検索と母集団の感染流行推測, 病原微生物検出情報, 1, 10, 1980.
- 12) 岩井雅恵, 松浦久美子, 滝澤剛則: 富山県における環境水ウイルスサーベイランスの疫学的意義, 臨床とウイルス, 36, 127-133, 2008.
- 13) 国立予防衛生研究所学友会編: ウイルス実験学各論, 143-151, 1982.
- 14) Young DC, Sharp DG: Poliovirus aggregates and their survivals in water, Applied and Environmental Microbiology, 33(1), 168- 177, 1977.
- 15) Young DC, Sharp DG: Virion conformational forms and the complex inactivation kinetics of echovirus by chlorine in water, Applied and Environmental Microbiology, 49(2), 359-364, 1985.
- 16) WHO: Conclusions and recommendations of the Advisory Committee on Poliomyelitis Eradication, Geneva, 11-12 October 2006, Part I, Weekly Epidemiological Record, 81, 453-464, 2006.

Continuous isolation of human enteroviruses from sewage water samples

Emi Mizutani, Hirokazu Adachi, Noriko Fujiwara, Miyabi Ito,
Teruo Yamashita, Akira Fujiura, Hiroko Minagawa

From June 2006 to May 2010, 204 samples of raw sewage waters were collected every week at Sakaigawa Sewage Treatment Plant in Aichi Prefecture for the isolation of human enteroviruses to investigate the relationship between the viruses isolated from the environmental waters and those from patients. A total of 160 strains comprised 16 serotypes including 45 isolates of Coxsackievirus B5(CV-B5), 29 of CV-B4, 19 of echovirus 6(E-6), 16 of CV-B3, and 11 of E-30 were isolated from 108 of the 204 raw sewage samples. It was noteworthy that enterovirus 71(EV-71) and CV-A16 were not isolated from raw sewage water samples at all, although these were isolated from the many patients in the same region. The significance of virus isolation from raw sewage water were also discussed, throughout comparison between virus isolation from raw sewage water and that from the patients.

Key words: raw sewage water, enterovirus, virus isolation, surveillance

調 査 研 究

LAMP 法による耐熱性溶血毒遺伝子陽性

Vibrio parahaemolyticus の海産魚介類からの検出法

山崎 貢¹、青木日出美¹、山田貞二¹、服部 悟¹、岩出義人²、荒川英二³、
松本昌門、平松礼司、皆川洋子

愛知県衛生研究所、¹愛知県衣浦東部保健所、²三重県保健環境研究所、³国立感染症研究所

要 旨

loop-mediated isothermal amplification (LAMP)に基づく遺伝子増幅を応用して、耐熱性溶血毒 thermostable direct hemolysin (TDH) 遺伝子を保有する腸炎ビブリオ *Vibrio parahaemolyticus* (*V. p*) を海産魚介類から迅速に検出する方法を開発した。本 LAMP 法の検出限界は 8 cells/反応であった。本 LAMP 法により TDH⁺ *V. p* 15 株は全株陽性と判定され、TDH⁻ *V. p* 10 株及び *V. p* 類縁菌 29 株は全株陰性と判定された。海産魚介類 10 検体に TDH⁺ *V. p* 生菌を 0.5~1.2 cells/g を添加した実験では、37°C、5 時間培養後、10 倍濃縮により全検体から TDH 遺伝子を検出した。本検査法は感度と特異性が高く、検査時間も約 7 時間と短い。え、増菌培養の前後における成績の陽転により食品中の TDH⁺ *V. p* 生菌の確認も可能となるので、*V. p* 食中毒の原因究明に有用と考える。

キーワード：*Vibrio parahaemolyticus*、thermostable direct hemolysin (TDH)、loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法、迅速検出法、海産魚介類

序 文

コレラ菌とともにビブリオ科ビブリオ属に属する通性嫌気性グラム陰性細菌の腸炎ビブリオ *Vibrio parahaemolyticus* (*V. p*) は沿岸部に広く分布し、ヒトには主に海産魚介類等の生食を介して感染し下痢を起こす^{1,2)}。下痢患者から分離される *V. p* の大多数は神奈川現象と呼ばれる溶血反応を示す点が環

境中に生息するビブリオとは異なっており、溶血活性を担う thermostable direct hemolysin (TDH) が *V. p* の最も重要な病原因子であることが明らかにされている^{1,2)}。しかし、*V. p* 食中毒の原因調査において刺身等の海産魚介類から TDH 産生性の *V. p* (以下、TDH⁺ *V. p*) を検出するには増菌培養と PCR 法による遺伝子検査等を組合せて長時間にわ

たる煩雑な手技を実施する必要がある^{3,4)}。

近年、Notomi ら⁵⁾により開発された loop-mediated isothermal amplification (LAMP)法は、4種類のオリゴヌクレオチド primer と鎖置換型 DNA polymerase により、60~65℃の恒温で反応を行う新しい遺伝子増幅法である。本 LAMP 法は特異性が高く、また、PCR 法に比べても反応から判定までが約1時間と短いことに大きな利点がある。さらに loop primer を加えることにより増幅効率を高め、より微量の標的遺伝子を検出することが可能となる。

そこで著者らは、*V. p* 食中毒の推定原因食品中に僅かに存在する TDH 遺伝子を標的とする高感度の LAMP 法プロトコルを作成するとともに、生菌 TDH⁺*V. p* の存在の簡単な確認方法も考案したので報告する。

材料と方法

供試株は、特異性及び他菌混在の検討を除き、TDH⁺*V. p* である 1052A 株 (血清型 O3:K6) を用いた。テンプレートに用いた菌液は、2%食塩加アルカリペプトン (以下 AP 培地) で 37℃、18 時間培養後の増菌液を、最終濃度 2% となるよう食塩を加えた Dulbecco' s PBS (-) pH7.45 (日水製薬株) (以下 PBS) で希釈した菌液を用いた。生菌数 (単位: cells) 測定は平板塗沫培地上に

発育したコロニー数 (CFU) を計測して行った。ただし、感度評価及び食品への接種実験においては 95% 信頼限界が得られる最確数 (MPN) 法 3 管法により行い、MPN 法で行った測定はその旨示した。

1 LAMP 反応の条件

LAMP 反应用の primer セット (FIP, BIP, F3, B3) には岩出らの primer (表 1) を用い、loop primer は primer 設計支援ソフト (Primer Explorer) を用いて 2 組の Loop-F (LF1, LF2) と Loop-B (LB1, LB2) を設計した。primer は全て HPLC 精製グレードを Sigma 社に委託作製した。TDH 遺伝子検出用試薬は Loopamp DNA 増幅試薬キット (栄研化学株) の説明書に従い調製した。テンプレートには熱アルカリ抽出物 2 μL を用いた。LAMP 反応はリアルタイム濁度測定装置 (RT-160C) を用いて 60℃で 100 分まで測定した。

2 loop primer の検討

テンプレートには TDH⁺*V. p* 1052A 株培養液を供試した。4 種類の primer セット (FIP: 40 pmol, BIP: 40 pmol, F3: 5 pmol, B3: 5 pmol) に対し、Loop-F 及び Loop-B を反応チューブ当たり 0、10、20 及び 30 pmol 添加し、LAMP 反応の立ち上がり時間への影響を調べた。

表1 LAMP反应用のprimerセット (岩出ら)

Primer名	添加量/反応チューブ	塩基数	塩基配列
FIP 2005-4	40 pmol	44	5' CTGACGTTGTGAATACTGATTGAC-CGGTCTCTGACTTTTGGACA3'
BIP 2005-75	40 pmol	40	5' ATGGCTGACATCCTACATGACTTG-CTTATAGCCAGACACC3'
F3 2005-75	5 pmol	18	5' CAATGCACCGGTCAATGT3'
B3 2005-75	5 pmol	19	5' ACGAACACAGCAGAATGAC3'
Loop-F LF1	20 pmol	15	5' TGGCATGTTTCTACA3'
Loop-B LB1	20 pmol	19	5' AAGACTATACAATGCCAGC3'

3 特異性の検討

1052A 株を含め、TDH⁺ *V. p* は下痢症に由来する 15 株 (血清型 (株数) は 01:K1 (1), 01:K25 (2), 01:K69 (1), 01:KUT (2), 03:K6 (3), 03:K72 (2), 04:K8 (1), 06:K18 (2), 010:KUT (1)) を用いた。TDH⁻ *V. p* は下痢症に由来する 5 株 (03:K6) と海産魚介類に由来する 5 株 (*V. p* 409F 03:K6 1 株を除き、型別未実施) を用いた。*V. p* 以外に *Vibrio* 属 23 株 [*V. alginolyticus* (6), *V. cholerae* non-01 (2), *V. mimicus* (1), *V. fluvialis* (6), *V. furnissii* (2), *V. vulnificus* (2), *V. hollisae* (1), *V. metschnikovii* (1), *V. costicola* (1), *V. cincinnatiensis* (1)], そして *Vibrio* 属類縁菌 6 株 [*Listonalla anguillarum* (1), *Photobacterium damsela* (1), *Aeromonas hydrophila* (1), *A. sobria* (1), *A. caviae* (1), *Plesiomonas shigelloides* (1)] の合計 16 菌種 29 株を用いた。菌株をそれぞれ反応チューブ当たり約 10^4 cells 加えて LAMP 法を行った。TDH 遺伝子を確認するための PCR 法は Nishibuchi ら⁶⁾ の Primer セットを用い、熱変性 94°C 1 分、アニーリング 55°C 1 分、伸長反応 72°C 1 分で 35 回増幅を行った。

4 検出感度の検討

1) 検出限界

テンプレートには TDH⁺ *V. p* 1052A 株培養液に由来する熱アルカリ抽出物 2 μ L を供試した。検出限界 (cells/反応チューブ) は、LAMP 法の一般的な判定時間である反応開始 60 分後に陽性率が 100% となる菌数 (MPN) とした。

2) PCR 法との比較

テンプレートには TDH⁺ *V. p* 1052A 株培養液の 10^{-3} ~ 10^{-7} 段階希釈液由来の熱アルカリ抽出物 2 μ L を各々 PCR 法と LAMP 法に供試した。陽性となる最高希釈倍率を用いて

感度を比較した。PCR 法は Nishibuchi ら⁶⁾ の方法で行った。

5 他菌が混在する場合の影響

1) *Vibrio alginolyticus* の検討

TDH⁺ *V. p* と *V. alginolyticus* が混在する場合の LAMP 反応による TDH 遺伝子検出感度を調べるために、TDH⁺ *V. p* 1052A 株を 10^3 又は 10^4 cells/mL 含む AP 培地と、*V. alginolyticus* C-13 株を 10^6 又は 10^7 cells/mL 含む AP 培地を等量混合の後アルカリ熱抽出を行い LAMP 法に供した。

2) TDH⁻ *V. p* の検討

TDH⁺ *V. p* と TDH⁻ *V. p* が混在する場合の LAMP 反応の感度を調べるために、TDH⁺ *V. p* 1052A 株を 10^3 又は 10^4 cells/mL 含む AP 培地と *V. p* 409F 株 (TDH⁻, 03:K6) を 10^6 又は 10^7 cells/mL を含む AP 培地を等量混合の後アルカリ熱抽出を行い LAMP 法に供した。

6 増菌培養時間の検討

LAMP 法の検出限界を超える菌数に増殖させるための培養時間を調べた。2 本の AP 培地 250 mL に TDH⁺ *V. p* 1052A 株を少数菌量 (0.1 cells/mL, 0.25 cells/mL) 接種し、37°C 3 時間及び 5 時間培養後の菌数を測定して描いた増殖曲線に基づいて推定した。

7 食品への TDH⁺ *V. p* 1052A 株の添加試験

エビ等 7 種類の海産魚介類食品 10 検体を用いた。細切した各 25 g に 1052A 株を 12~30 cells (約 0.5~1.2 cells/g) 接種後、225 mL の AP 培地を添加してストマックで 1 分間粉碎混和後、37°C で、方法 6 で決定した時間培養した。増菌培養の直前 (培養 0 時間) と培養後に AP 培地を 100 μ L と 1 mL を採取した。培養 0 時間の AP 培地は増菌培養中氷冷で保存した。採取した 100 μ L の試料はそのままテンプレートにし、1 mL の試料は 12,000 rpm 10 分間遠心後の沈渣 100 μ L (10 倍濃縮液) をテンプレートにして LAMP 法を行った。

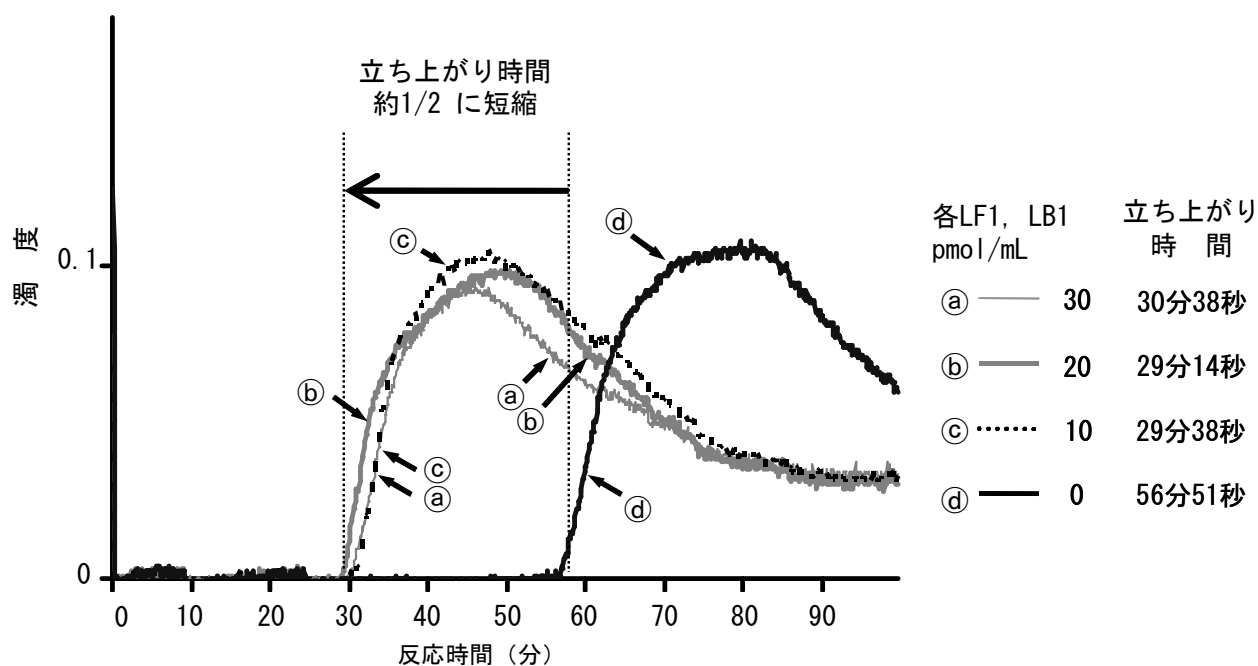


図1 loop primer を添加した場合のLAMP反応時間の短縮効果

結果

1 loop primer 添加による LAMP 反応時間の短縮効果

図1に、primer セット (FIP, BIP, F3, B3) に loop primer (LF1, LB1) を添加した場合の反応時間の短縮効果を示した。反応チューブ当たりの TDH⁺ *V. p* 菌数は約 200 cells (MPN) であった。立ち上がり時間は loop primer を加えない場合が約 57 分であったのに対し、10、20 及び 30 pmol の loop primer LF1 と LB1 を等モル添加した場合は、約 2 分の 1 (29~31 分) に短縮された。本結果から、LAMP 反応には primer セットに loop primer (LF1 と LB1 各 20 pmol) を添加することとした。以後 LAMP 法の実施にあたっては、表1の全ての primer を用いた。

2 LAMP 法の特異性

loop primer を添加した LAMP 法の TDH 検出特異性を調べた (表2)。TDH⁺ *V. p* 15 株は全て LAMP 法陽性であったのに対し、TDH⁻ *V. p* 10 株と *V. p* 以外の 29 株は全株陰性であった。従って、TDH⁺ *V. p* に対する LAMP 法の特異性は非常に高かった。

表2 LAMP法のTDH遺伝子検出特異性

菌種	供試株数	LAMP法陽性株数
<i>V. parahaemolyticus</i> TDH ⁺	15	15
<i>V. parahaemolyticus</i> TDH ⁻	10	0
<i>V. alginolyticus</i>	6	0
<i>V. cholerae non-01</i>	2	0
<i>V. mimicus</i>	1	0
<i>V. fluvialis</i>	6	0
<i>V. furnissii</i>	2	0
<i>V. vulnificus</i>	2	0
<i>V. hollisae</i>	1	0
<i>V. metschnikovii</i>	1	0
<i>V. costicola</i>	1	0
<i>V. cincinnatiensis</i>	1	0
<i>Listonalla anguillarum</i>	1	0
<i>Photobacterium damsela</i>	1	0
<i>Aeromonas hydrophila</i>	1	0
<i>Aeromonas sobria</i>	1	0
<i>Aeromonas caviae</i>	1	0
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	1	0

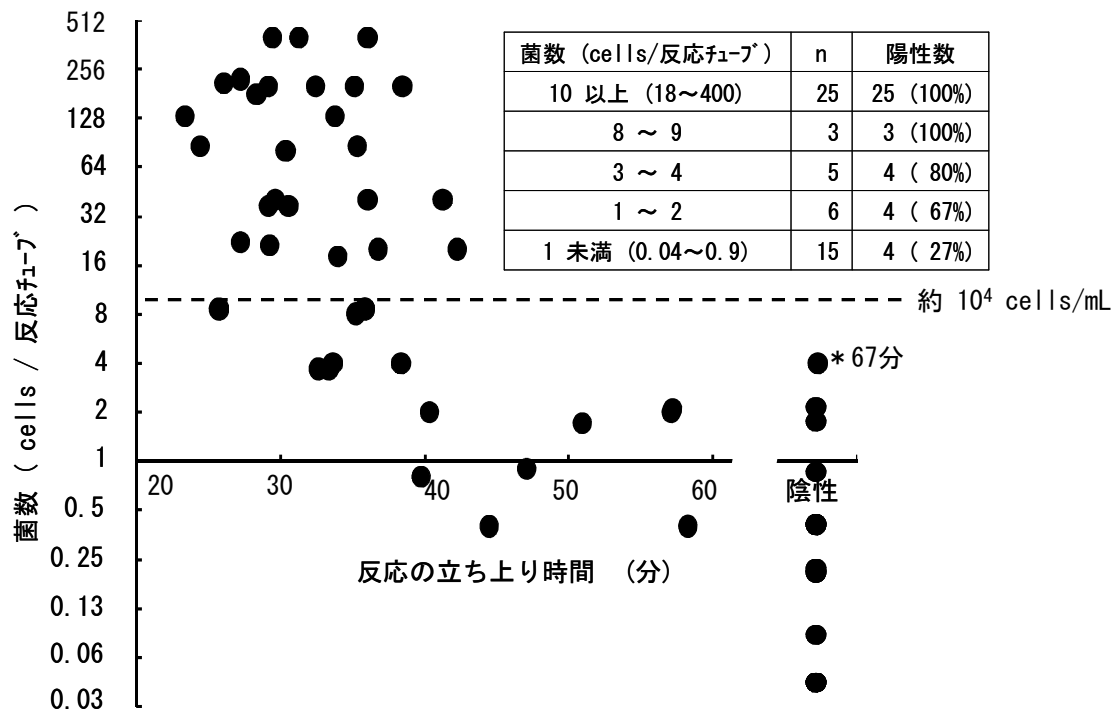


図2 loop primerを添加した場合のLAMP法の検出限界

3 LAMP法の感度

1) LAMP法の検出限界

loop primerを添加したLAMP法の反応チューブ当たりの検出限界を検討した(図2)。LAMP法の陽性率はTDH⁺*V. p* 1052A株の菌数増加と共に上昇し、1 cells未満27%(4件/15件)、1~2 cells 67%(4件/6件)、3~4 cells 80%(4件/5件)、8~9 cells 100%(3件/3件)であった。陰性例のうち4 cellsの1例は60分を僅かに超える67分であった。また、4 cellsと8 cellsの95%信頼限界下限は各々0.1 cellsと1.7 cellsであり、下限が1 cellsを超える8 cellsが本LAMP法の検出限界と判断された。この検出限界を増菌培養液の菌数に換算すると約10⁴ cells/mLとなった。

2) PCR法との比較

TDH⁺*V. p* 1052A株培養液の10⁻³~10⁻⁷段階希釈したテンプレートをを用いてLAMP法とPCR法の感度を比較した(図3)。LAMP法は10⁻⁵(1.5 cells/反応チューブ、MPN)まで陽性であり、PCR法は10⁻²までに留まった。

10⁻⁵では当該LAMP法陰性を示したこともあるので、本LAMP法は検討したPCR法より100~1,000倍高い感度を示した。

4 他菌混在の影響

1) *Vibrio alginolyticus*を添加した場合の影響

TDH⁺*V. p* 1052A株(1.0×10⁴ cells/mL)に約10⁴倍量(8.0×10⁷ cells/mL)の*V. alginolyticus* C-13株を混ぜた場合の立ち上がり時間の変化を調べた(表3)。その結果、1052A株単独36分に対し、C-13株を混ぜた場合も35分とほぼ変化がなく、菌数比を変えても同様の結果であった。従って、*V. alginolyticus*の存在はTDH遺伝子の検出を阻害しなかった。

2) TDH⁻*V. p*を添加した場合の影響

TDH⁺*V. p* 1052A(1.0×10⁴ cells/mL)に約10⁴倍量(1.2×10⁸ cells/mL)のTDH⁻*V. p* 409F株を混ぜた場合のLAMP反応の立ち上がり時間の変化を調べた(表4)。その結果、1052A株単独の場合も409F株を混ぜた場合も42分と変わりなく、菌数比を変えても同様であった。

従って、TDH⁻*V. p* 混在は LAMP 法による TDH 遺伝子検出に影響を与えなかった。

5 増菌培養時間の検討

図 4 に、培養液中における TDH⁺*V. p* 1052A 株の増殖曲線を示した。2 本の AP 培地中に 1052A 株を 0.1 cells/mL と 0.25 cells/mL (食品 1.0 cells/g, 2.5 cells/g 相当) 接種

後 3~5 時間培養したところ、5 時間培養で LAMP 法の検出限界 (約 10^4 cells/mL) を超える各 2.1×10^5 cells/mL と 1.5×10^6 cells/mL に増殖した。グラフから 4 時間後には検出限界に到達したと推測されたので、菌検出に必要な培養時間は 5 時間と判断された。

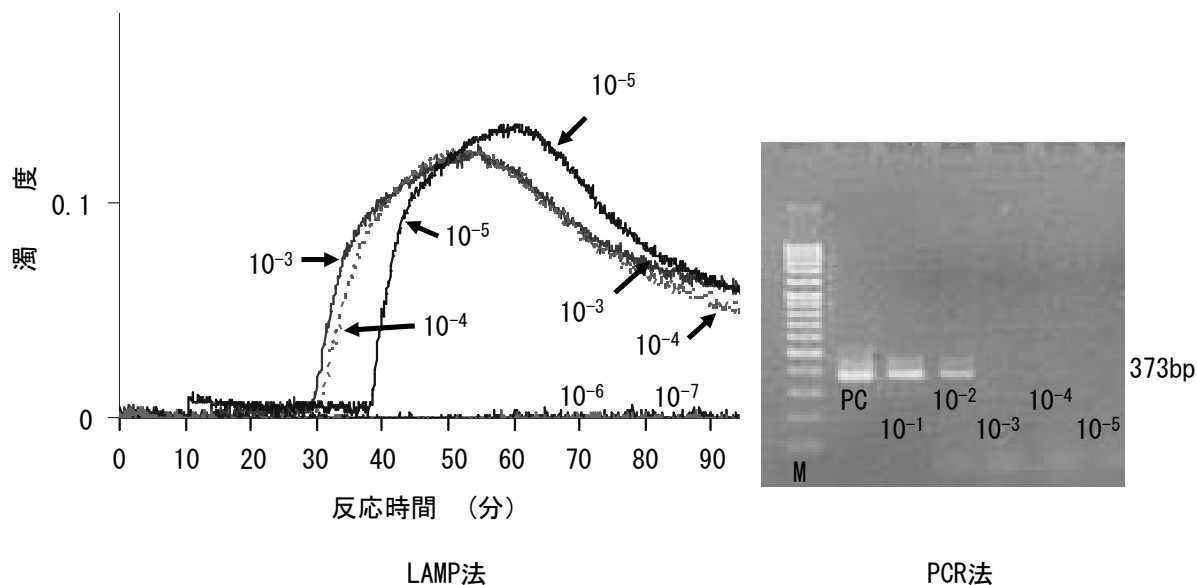


図3 LAMP法とPCR法の感度の比較

注：図中の乗数は菌液の希釈倍数を示す。

表3 *V. alginolyticus* を添加した場合の影響

菌数 (cells/mL)			LAMP法	
<i>V. parahaemolyticus</i> 1052A株	<i>V. alginolyticus</i> C-13株	比	立ち上がり時間	判定
1.0×10^5	-	-	29分04秒	+
1.0×10^5	8.0×10^6	1:80	29分21秒	+
1.0×10^5	8.0×10^7	1:800	30分14秒	+
1.0×10^4	-	-	36分06秒	+
1.0×10^4	8.0×10^6	1:800	30分05秒	+
1.0×10^4	8.0×10^7	1:8000	34分59秒	+
-	8.0×10^7	-	-	-
1.3×10^5	-	-	29分44秒	+
1.3×10^5	8.0×10^6	1:61	28分33秒	+
1.3×10^5	8.0×10^7	1:610	29分52秒	+
1.3×10^4	-	-	31分49秒	+
1.3×10^4	8.0×10^6	1:610	33分08秒	+
1.3×10^4	8.0×10^7	1:6100	30分54秒	+
-	8.0×10^7	-	-	-

6 食品への TDH⁺ *V. p* 1052A 株添加試験

表5に添加試験の結果を示した。培養5時間後では、培養液100 μ Lに由来するテンプレートを用いた場合は10検体中9検体が陽性であった。反応チューブ当りの菌数(MPN)をみると陽性9例は2.1~40 cellsであった。陰性1例の生菌数は検出限界(8

cells)以下の4.0 cellsであった。培養液1mL由来の10倍濃縮テンプレートでは10検体全てが陽性(21~400 cells)となった。一方、培養0時間では供試した10検体全てがLAMP法陰性であり、全検体で増菌培養に伴う成績の陽転が認められた。

表4 TDH⁻ *V. parahaemolyticus* を添加した場合の影響

菌数 (cells/mL)			LAMP法	
TDH ⁺ <i>V. p</i> 1052A株	TDH ⁻ <i>V. p</i> 409F株	比	立ち上がり時間	判定
2.1×10^5	-	-	32分36秒	+
2.1×10^5	1.5×10^7	1:71	30分30秒	+
2.1×10^5	1.5×10^8	1:710	30分39秒	+
2.1×10^4	-	-	35分04秒	+
2.1×10^4	1.5×10^7	1:710	32分31秒	+
2.1×10^4	1.5×10^8	1:7100	34分59秒	+
-	1.5×10^8	-	-	-
1.0×10^5	-	-	31分05秒	+
1.0×10^5	1.2×10^7	1:120	30分18秒	+
1.0×10^5	1.2×10^8	1:1200	30分20秒	+
1.0×10^4	-	-	42分15秒	+
1.0×10^4	1.2×10^7	1:1200	33分49秒	+
1.0×10^4	1.2×10^8	1:12000	42分20秒	+
-	1.2×10^8	-	-	-

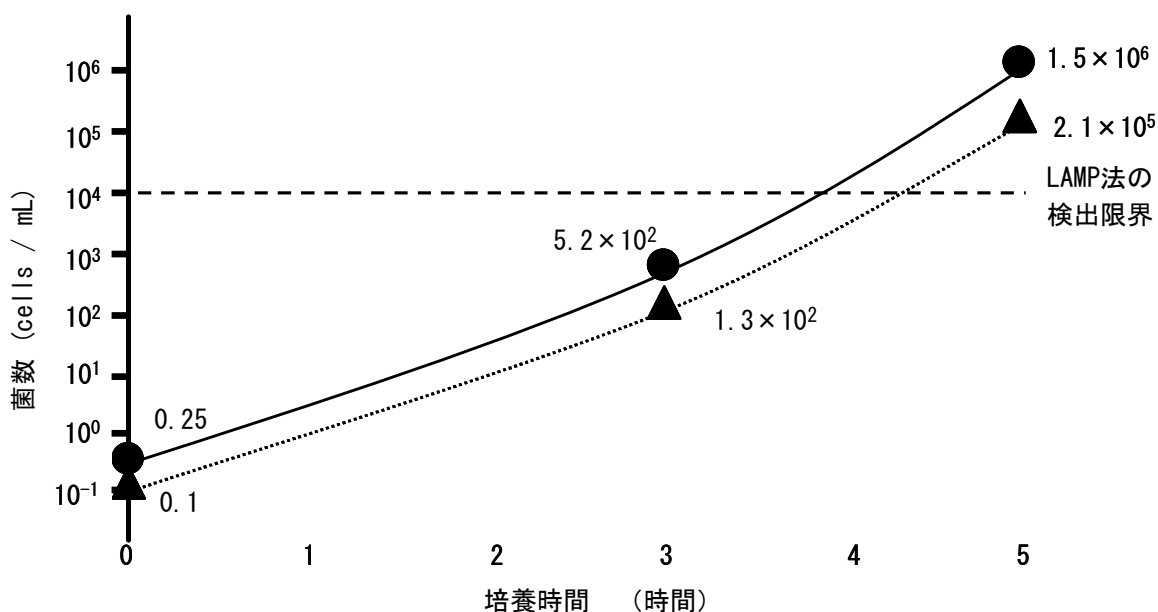


図4 2%食塩加アルカリペプトン中のTDH⁺ *V. p* 1052A株の増殖曲線

表5 食品へのTDH⁺V. p1052A株添加試験

検体	菌数測定		LAMP法				LAMP法 (10倍濃縮テンプレート)			
	0時間	5時間	0時間		5時間		0時間		5時間	
	cells /25g (CFU)*	cells /25g (MPN)	判定	判定	cells /反応チューブ (MPN)	立ち上がり時間	判定	判定	cells /反応チューブ (MPN)	立ち上がり時間
スルメイカ	13	5.8×10^5	-	+	2.1	40分40秒	-	+	21	29分30秒
スルメイカ	13	1.1×10^6	-	+	4.0	37分57秒	-	+	40	30分36秒
スルメイカ	12	2.3×10^6	-	+	8.6	36分00秒	-	+	86	32分53秒
スルメイカ	19	2.3×10^6	-	+	8.6	32分38秒	-	+	86	27分23秒
大正エビ	15	1.1×10^6	-	-	4.0	-	-	+	40	28分28秒
ブラックタイガー	15	2.3×10^6	-	+	8.6	34分08秒	-	+	86	33分57秒
生かき	30	1.0×10^6	-	+	4.0	35分47秒	-	+	40	28分25秒
ホタテ貝柱	28	5.3×10^6	-	+	19	36分39秒	-	+	190	33分21秒
タラバガニ	19	6.0×10^6	-	+	22	37分47秒	-	+	220	26分06秒
マグロ	28	1.0×10^7	-	+	40	28分14秒	-	+	400	25分03秒

*接種菌量

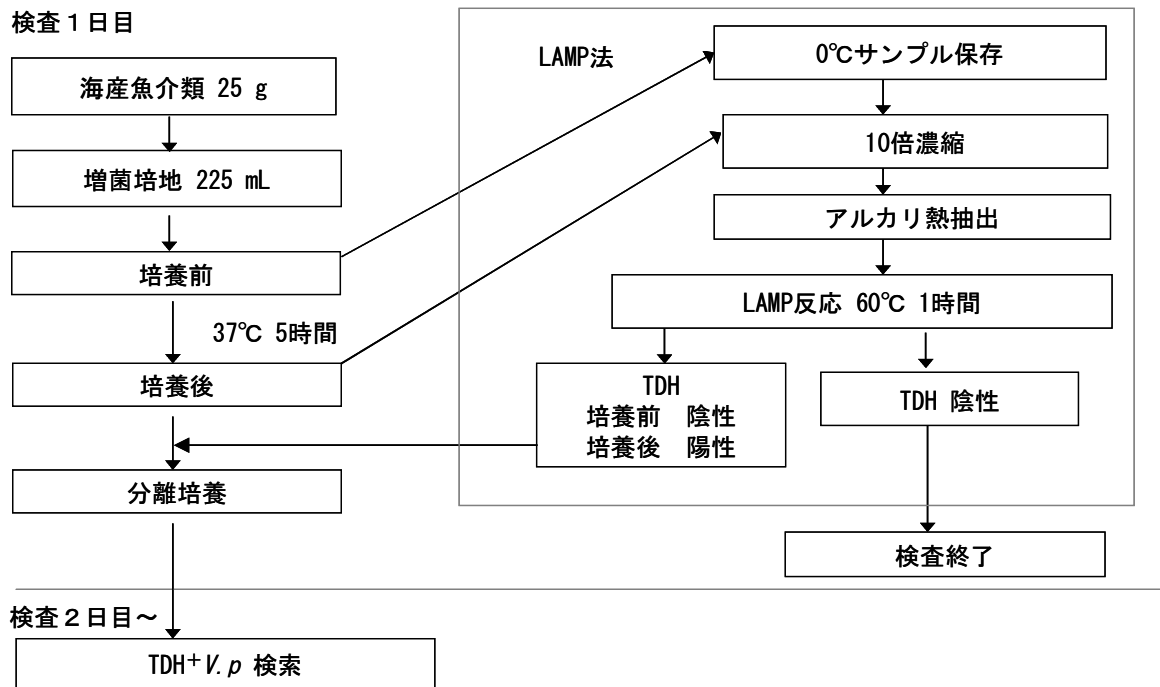


図5 海産魚介類からのTDH⁺V. p の検出フロー

考 察

食品衛生検査指針 (2004年)³⁾によれば、魚介類等からPCR法を用いてTDH⁺V. pを検出する場合の増菌培養時間は、18時間とされている。また、東京都によるV. p食中毒事例の調査⁴⁾でも18時間の増菌培養を行っており、検査には2日を要していた。こ

れに対し、今回開発したLAMP法は、上記PCR法に比べ100~1,000倍感度が高いので、増菌時間を5時間に短縮できる。図5に、TDH⁺V. p検出法の流れ図を示した。本方法では、増菌培養、LAMP反応、検体処理及び試薬調製に要する時間を含めて、検査開始から約7時間でTDH⁺V. p遺伝子を検出可能

であり、検出した場合は増菌液から引き続き TDH⁺*V. p* の分離培養を行うことができる。特に検出限界付近の生菌数の場合、LAMP 法陽性でも培養法陰性となることが考えられる。従って、LAMP 法はあくまでスクリーニングとし、最終報告は培養法の結果を待つて行うことが必要である。

遺伝子診断法を応用した生菌・死菌の鑑別法として、近年、光反応性核酸架橋剤の一種である Ethidium monoazide (EMA) や propidium bromide monoazide (PMA) を用いた方法^{7,8)}が考案されている。この鑑別法は PCR 反応を阻害する薬剤が死菌の細胞膜は通過するが生菌では通過しないことを利用したものであるが、薬剤処理を遮光下で行うこと及び菌体外の薬剤不活化のために光照射が必要であるうえ、損傷菌が含まれる可能性が高い食中毒食品残品の検査では、EMA や PMA が毒性を示すことも考えられる。一方、今回著者らが検討した生菌の確認方法は、増菌培養開始直前に氷冷保存した培養液と 5 時間培養後の液を同時に検査して成績の陽転から判定するため、簡便である。なお、5 時間氷冷後と氷冷直前とで LAMP 反応の立ち上がり時間に差がないことを確認している。

以上から、今回作成した LAMP 法は *V. p* 食中毒の推定原因食品中に僅かに存在する TDH⁺*V. p* を従来法より短時間に検出できるばかりでなく、生菌の存否も確認できるので、*V. p* 食中毒の原因解明につながる有用な検査法と期待される。

本研究の内容の一部は第 41 回腸炎ビブリオシンポジウム、神戸、2007. 11. 21 にて発表した。

供試株のうち 18 株 (*V. alginolyticus*, *V. mimicus*, *V. fluvialis*, *V. furnissii*, *V. vulnificus*, *V. hollisae*, *V. metschnikovii*, *V. costicola*, *V. cincinnatiensis*, *L. anguillarum*, *P. damsela* 各 1 株及び *V.*

parahaemolyticus 7 株)は国立感染症研究所から分与を受けた。本研究の一部は、平成 19 年度厚生労働科学研究費補助金(食品の安心・安全確保推進研究事業「食品における微生物迅速検査法の開発及びその精度評価システムに関する研究」分担研究者 荒川英二)の助成を受けた。

謝 辞

菌の分与を頂いた国立感染症研究所に深謝致します。

文 献

- 1) Iida T, Park KS, Honda T: *Vibrio parahaemolyticus*, *The Biology of Vibrios*, ASM Press, 340-348, 2006
- 2) 本田武司: *Vibrio parahaemolyticus* (腸炎ビブリオ), 食品由来感染症と食品微生物, 中央法規, 中西寿男・丸山務監修, 東京, 2009, 207-215
- 3) 食品衛生検査指針微生物編:201-224, (社)日本食品衛生協会, 厚生労働省監修, 東京, 2004
- 4) 尾畑浩魅, 下島優香子, 小西典子, 門間千枝, 矢野一好, 甲斐明美, 諸角 聖, 福山正文: 腸炎ビブリオ食中毒事例における PCR 法を用いた食品からの耐熱性溶血毒 (TDH) 産生菌の分離, 感染症学雑誌, 80, 383-390, 2006
- 5) Notomi T, Okayama H, Masubuchi H., Yonekawa T, Watanabe N, Amino N, Hase T.: Loop-mediated isothermal amplification of DNA, *Nucleic Acids Research* 15: E63, 2000
- 6) Nishibuchi M, Kaper JB: Minireview, Thermostable direct hemolysin gene of *Vibrio parahaemolyticus*, *Infection and Immunity* 63, 2093-2099, 1995
- 7) Soejima T, Iida K, Qin T, Tani H, Seki

M, Yoshida S: Method to detect only live Bacteria during PCR Amplification, Journal of Clinical Microbiology 46, 2305-2324, 2008

8) Nocker A, Sossa-Fernandez P, Burr MD,

Camper AK. : Use of propidium monoazide for live/dead distinction in microbial ecology, Applied and Environmental Microbiology 73, 5111-5117, 2007

Development of a loop-mediated isothermal amplification
assay for sensitive and rapid detection of the
thermostable direct hemolysin-producing
Vibrio parahaemolyticus strain in seafoods

Mitsugu Yamazaki¹, Hidemi Aoki¹, Sadaji Yamada¹, Satoru Hattori¹,
Yoshito Iwade², Eiji Arakawa³, Masakado Matsumoto, Reiji Hiramatsu,
Hiroko Minagawa

Aichi Prefectural Institute of Public health, ¹Aichi Prefectural Kinuura-Tobu Health
Center, ² Mie Prefectural Health and Environment Research Institute, ³ National
Institute of Infectious Diseases

We developed a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay to detect thermostable direct hemolysin (TDH)-producing *Vibrio parahaemolyticus* strain in seafoods. The detection limit of the LAMP assay was eight cells per LAMP reaction tube. As for the specificity, all of 15 TDH-producing *V. parahaemolyticus* strains were LAMP reaction-positive, while 10 TDH-nonproducing *V. parahaemolyticus* and 29 non-*parahaemolyticus* *Vibrio* strains were negative. In addition, detection of viable TDH-producing *V. parahaemolyticus* strains was possible within 7hrs. In spiked seafood experiments, all of 10 samples that had been added with TDH-producing *V. parahaemolyticus* at 0.5~1.2 cells/g, were positive after enrichment at 37°C for 5 hrs and the 10-fold concentration of the templates.

In conclusion, the above mentioned LAMP assay is highly sensitive, and is expected to detect the foods contaminated with *V. parahaemolyticus* thus resulting prevention of the food poisoning.

Keywords: *Vibrio parahaemolyticus*, thermostable direct hemolysin (TDH), loop-mediated isothermal amplification (LAMP), rapid assay, seafoods

調 査 研 究

培養細胞を用いたパリトキシン毒性試験法の検討

林 瑞那、秦 眞美、舘井浄子、長谷川晶子、藤浦 明、皆川洋子

要 旨

パリトキシンはアオブダイ等の食用魚に含まれる自然毒であり、その強い毒性から食品衛生上問題視されている。一般にパリトキシンの検出にはマウス試験が用いられているが、検出感度の低さや倫理的な観点から、代替法の開発が望まれている。

そこで今回、培養細胞を用いたパリトキシン毒性試験法の構築を試みた。細胞株、培地、曝露時間等を検討した結果、H9C2細胞を用いた場合、曝露開始から最短3時間で十分な感度(IC₅₀: 121 ng/mL)で検出できた。今後、更なる検討を加えることによって、パリトキシンを特異的に検出する方法の開発が期待される。

キーワード：パリトキシン、細胞毒性試験、食中毒

序 文

海洋性自然毒(マリントキシン: marine toxin)による食中毒は一般的に致死率が高く、直近10年間(2001~2010年)の日本におけるマリントキシン食中毒による死者数は、全食中毒による死者数の約40%を占めている¹⁾。代表的なマリントキシン食中毒を引き起こすフグは、販売・提供にあたり各都道府県の条例による取締りを受けている。

近年、日本において、マリントキシンの1種であるパリトキシン(palytoxin: PTX)様毒による中毒被害が増大しており、関心が高まっている²⁾。PTX様毒中毒の致死率は4~5%程度とフグ中毒に匹敵する高さとなっている³⁾。

PTXを含む毒魚には、アオブダイやソウシハギ等が知られているが、これら魚類は自

らPTXを産生するのではなく、植物プランクトンである渦鞭毛藻*Ostreopsis*属の産生する毒素が食物連鎖による生物濃縮の結果、魚類の体内に蓄積するものと考えられている。地球温暖化による海水温上昇などの影響から、元来熱帯や亜熱帯海域に生息する*Ostreopsis*属が日本沿岸にも広く分布するようになったことが、日本でのPTX様毒被害の増大原因であると推察される²⁾。

ところで魚介類の含むマリントキシンの毒力測定は、マウスを用いた試験により行うことが多く、フグ毒や麻痺性貝毒では公定法に採用されている。PTXにおいても、30年以上も前からマウス試験法による毒力測定が行われ、現在においても日本食品衛生協会の推奨する唯一の方法となっている^{4),5)}。しかしマリントキシンのマウス試験法には、特異性の低さ、マウスの感受性

の低さ、マウスの個体差等による検査結果の不安定さ⁶⁾、そして倫理的な問題等の難点が指摘されている。PTXは他のマリントキシンに比べてマウスの感受性が低いため²⁾、マウス試験法に替わる検出法の早急な開発が望まれる。

一方マリントキシンの化学的若しくは免疫学的検出法として、液体クロマトグラフィー蛍光検出法(HPLC-FLD)等の機器分析法や酵素免疫測定法(ELISA)の開発が進められており、PTXへの応用報告もなされている^{7),8)}。これらの分析法は感度や特異性の点で優れているが、生体活性を確認するという観点からは、マウス試験法に替わるものとはいえない。

生体活性を反映しながら実験動物を用いない試験法として、培養細胞を用いるマリントキシン検出法が注目されている^{9),10)}。当所でも、麻痺性貝毒、maitotoxin(シガテラ毒)、tetrodotoxin(フグ毒)において培養細胞を用いる試験法の実用化に取り組み^{11)~13)}、試験に要する時間や検出感度が実用に堪えることを確認し、マウス試験法に替わる生物試験法としての有用性を検討してきた。

今回、培養細胞を用いたPTX検出法の実用性評価のため、いくつかの検討を行った。

材料と方法

1. トキシン

PTX標準品(161-15131, 和光純薬)を蒸留滅菌水(Deionized Sterile Distilled Water、ニッポンジーン)に溶解してストック溶液(10 μ g/mL)を作成のうえ小分けし、-20 $^{\circ}$ Cで凍結保存した。使用時には必要量のみを融解して12段階の2倍希釈系列を作成し、後述する毒性試験における最終濃度(ng/mL)が0.244、0.488、0.977、1.95、3.91、7.81、15.6、31.3、62.5、125、250、500となるように調製した。

2. 細胞

培養細胞株として、ラット心臓横紋筋由来H9C2細胞(ECACC:88092904)およびマウス神経芽細胞腫由来Neuro2a細胞(ECACC:89121404)を検討した。CO₂インキュベーターを用いて、5%CO₂ 37 $^{\circ}$ Cの条件下に培養した。

3. 培地

培地、血清、培地添加試薬は、いずれもInvitrogen社製品を用いた。

継代培養用には、Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640に各々最終濃度が10% fetal bovine serum、100 U/mL penicillin、100 μ g/mL streptomycin、1 mM Sodium Pyruvateとなるよう添加した培地を用いた。

毒性試験用の培地として、RPMI1640、Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) High Glucose、DMEM Low Glucoseのいずれかを、血清及び添加試薬を加えない状態で用いた。

4. トキシンの毒性試験(図1)

培養細胞を用いたPTXの毒性試験は、当所において麻痺性貝毒等で実施経験のある方法^{11)~13)}およびPTXを用いた報告⁹⁾に倣い、以下の系で行った。なお、同一の実験を3ウェル並行で行い、各ウェルの実測値の算術平均を測定値とした。

I 前培養

96ウェル平底マイクロプレート(353072、Falcon)に細胞を播種し、継代培養用の培地100 μ Lで24時間培養した。なお特に断り書きのない場合は、24時間培養後にsubconfluentとなる生細胞数(H9C2細胞は2.5 \times 10⁴/ウェル、Neuro2a細胞は5 \times 10⁴/ウェル)を播種した。生細胞の計数は色素排除法により行い、0.4% Trypan Blue Stain(15250-061、GIBCO)を細胞液と1:1の割合で混合して計測した。

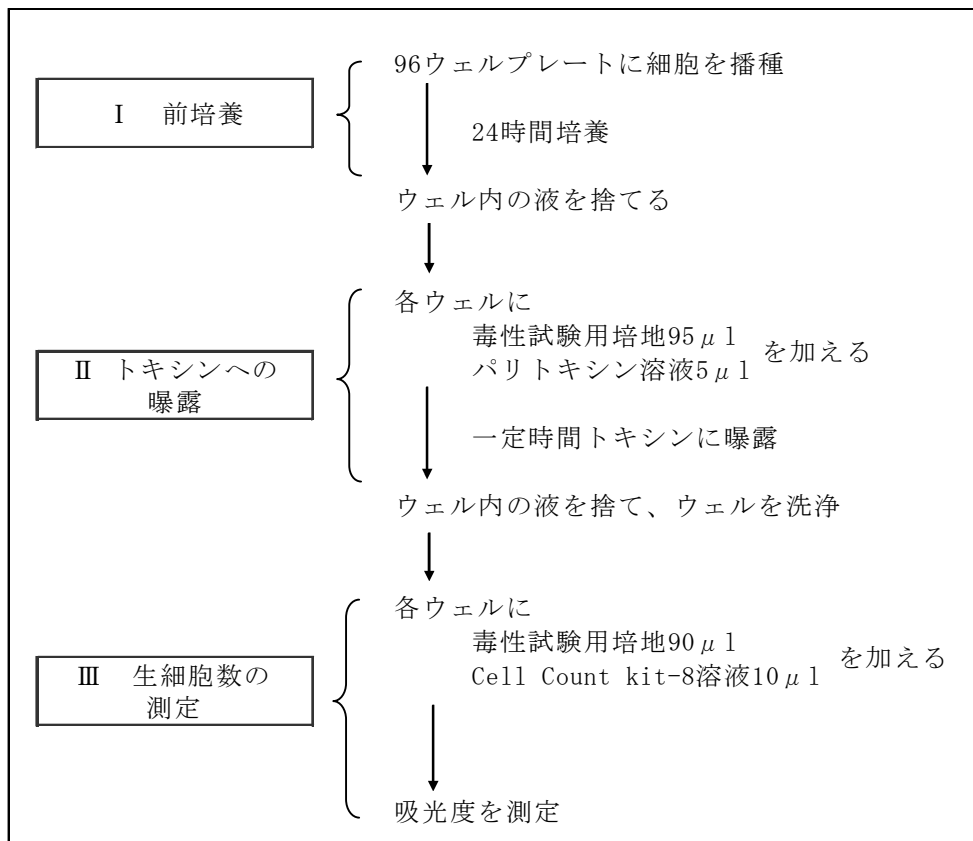


図1 培養細胞を用いた毒性試験の概略

II トキシンへの曝露

前培養で用いた培地を捨てた後、各ウェルに試験用培地 95 μ L と、PTX 溶液または蒸留滅菌水を 5 μ L 加えた。マイクロプレートミキサー (NS-P、井内盛栄堂) 上で 3 ~ 5 秒攪拌してから、5 % CO₂ 37°C の条件下で一定時間 PTX への曝露を行った。なお特に断り書きのない場合は、試験用培地には RPMI1640 を用いた。

III 生細胞数の測定

各ウェルの細胞の生存率の測定は、細胞内脱水素酵素活性に基づいて生細胞数を測定する Cell Counting Kit-8 (CK04、同仁化学) を用いて行った。II の操作の後ウェル内の液を捨てて、50 μ L の試験用培地でウェルを 2 回洗浄した後、試験用培地 90 μ L と Cell Counting Kit-8 溶液 10 μ L を各ウェルに加えて、5 % CO₂ 37°C の条件下で 1 時間培養して呈色反応を行った。その後、マイクロプレートリーダー (Model 680、

Bio-Rad) にて測定波長 450 nm、参照波長 620 nm での吸光度を測定した。

IV 解析

各ウェルの吸光度は、そのウェル内の生存細胞数にほぼ比例する。そこで、II において PTX 溶液 5 μ L の代わりに水 5 μ L を加えたウェルでの吸光度を 100% として、各ウェルの吸光度のパーセンテージを求め、これをそのウェルでの細胞の生存率とした。

また、細胞の生存率を PTX 濃度 (log) に対してプロットした半対数グラフから、細胞生存率が 50% になる濃度を IC₅₀ (50% 細胞障害率) として算出した。

結果と考察

1. 培養細胞株の検討 (図 2)

当所で経験のある H9C2 細胞および Neuro2a 細胞を用いたマリントキシンの毒性試験の検討^{11)~13)} 成果を参考に、今回も H9C2 細胞と Neuro2a 細胞を用いて PTX への

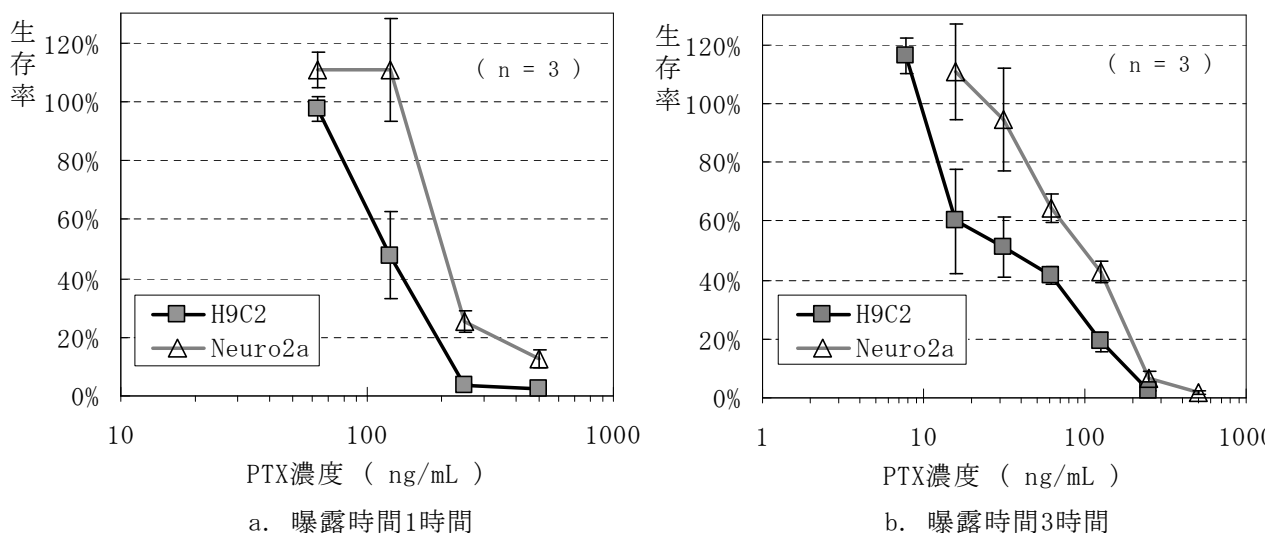


図2 培養細胞株の比較

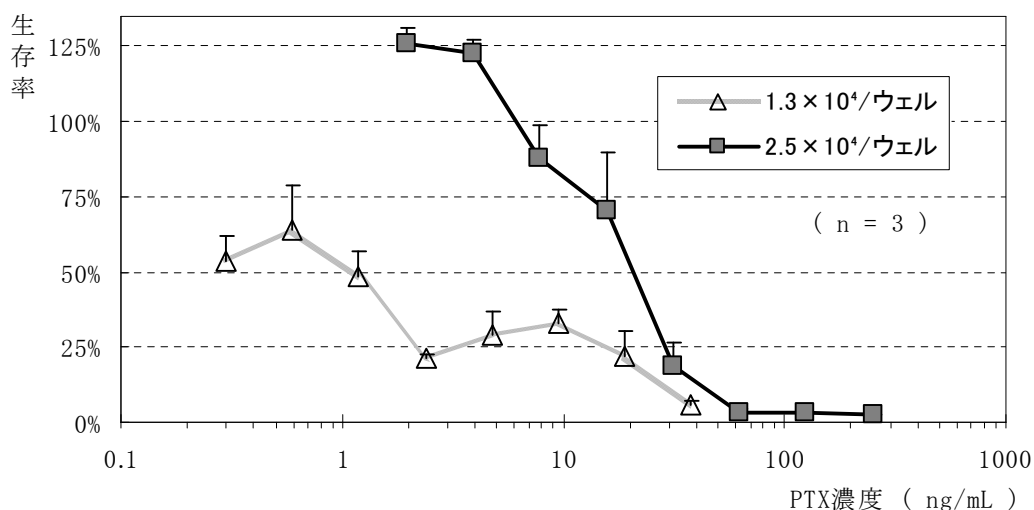


図3 細胞密度の比較

感受性の比較を行った。PTX への曝露時間は1時間および3時間を検討した。

H9C2 細胞の IC₅₀ 値 (ng/mL) は 1 時間 : 121、3 時間 : 33.8 であり、Neuro2a 細胞では 1 時間 : 204、3 時間 : 99.1 であった。H9C2 細胞の方が Neuro2a 細胞よりも感受性が高く、以後の実験は H9C2 細胞を用いた。

2. 播種細胞密度の検討 (図3)

前培養で播種する H9C2 細胞数について、1.3 × 10⁴/ウェルと 2.5 × 10⁴/ウェルとで比較を行った (曝露時間 : 6 時間)。前培養で 1.3 × 10⁴/ウェルの播種では PTX に高い感

受性を示したが、生存率のグラフが安定しないため定量的検出には不向きであると思われる。

2.5 × 10⁴/ウェルの播種では前培養終了後に subconfluent (約 80% confluent) となるが、1.3 × 10⁴/ウェルの播種では前培養終了後に約 50% confluent となる。50% confluent 程度では細胞の状態が不安定であるために、1.3 × 10⁴/ウェルの播種では生存率のグラフが安定しないものと推測された。再現性の高い PTX の定量には、前培養後に subconfluent となる程度の播種が適

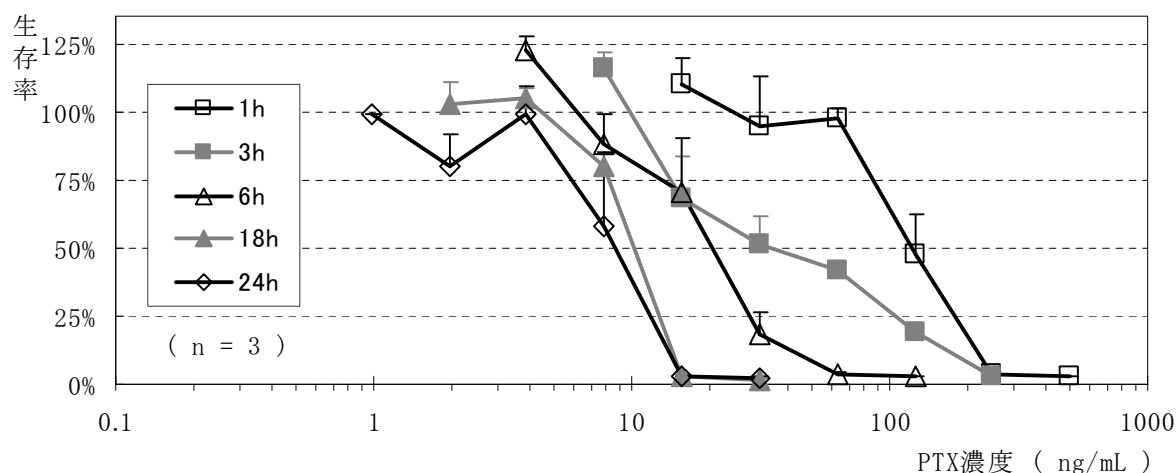


図4 曝露時間の比較

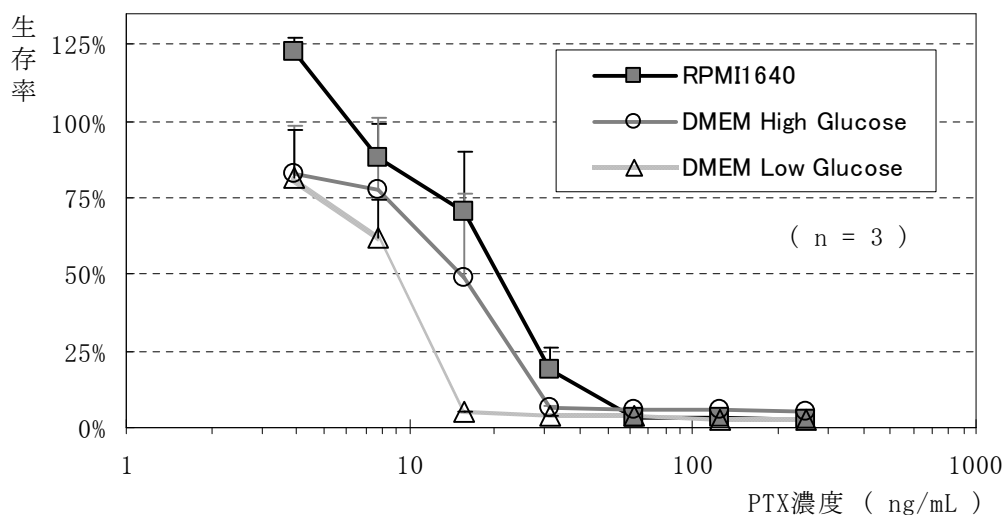


図5 培地の比較

当であると考えられた。以後の実験は 2.5×10^4 /ウェルの播種で行った。

3. トキシンへの曝露時間の検討(図4)

H9C2細胞における、PTXへの曝露時間(1、3、6、18、24時間)を比較した。IC₅₀値(ng/mL)は1時間:121、3時間:33.8、6時間:20.5、18時間:10.2、24時間:8.6であった。曝露時間を長くするほど検出感度は高まるといえる。ただし曝露時間を24時間以上に延長した場合、トキシンを加えないウェルにおいても細胞が過密となり生存率が安定しない危険性があるため、24時間の曝露が最も感度良くPTXを検出できる

と考えられた。曝露時間が1時間の場合のIC₅₀値は121 ng/mLであったが、ヒトが中毒症状を起こすのはおよそ4 μg以上のPTXを摂取した場合との報告に基づけば¹⁴⁾、曝露時間1時間で検出感度に不足はないと思われた。

なお、この試験法を検体に実用する際には必ずしも開始時に曝露時間を設定する必要はなく、検体への1時間の曝露の後に実体顕微鏡で細胞の生存率を観察した上で、より検出感度を高めるために曝露時間を延長するか、生細胞数の測定に移るかを選択することが可能である。

表 1 DMEM High Glucose と DMEM Low Glucose の組成の違い

	DMEM High Glucose	DMEM Low Glucose	RPMI1640(参考)
D-Glucose (g/L)	4.5	1.0	2.0
Sodium Pyruvate (g/L)	0	0.11	0

4. 試験用培地の検討(図5)

RPMI1640、DMEM High Glucose、DMEM Low Glucose の3種類の処方と比較検討した(曝露時間:6時間)。IC₅₀値はRPMI1640で20.5 ng/mLであるのに対し、DMEM High Glucoseでは15.2 ng/mL、DMEM Low Glucoseでは9.0 ng/mLであった。

表1に示すとおり、DMEM High GlucoseとDMEM Low Glucoseの組成¹⁵⁾の主要な違いはD-Glucose濃度である。H9C2細胞においては、DMEM Low GlucoseよりもDMEM High Glucoseで培養した場合の方が、低酸素刺激に対して抵抗性を示すとの報告がある¹⁶⁾。今回のPTX試験に用いたH9C2細胞も、グルコースの豊富な環境の方が抵抗性を示したと推察された。

試験用培地としてはRPMI1640を使用できるが、DMEM Low GlucoseのIC₅₀値はRPMI1640のおよそ半値であったため、より検出感度を必要とする場合にはDMEM Low Glucoseを用いるのが良いと考えられた。

5. まとめと今後の課題

H9C2細胞を用いた細胞毒性試験を応用してPTX検出を試みた結果、既報の貝毒^{11)~13)}と同程度に実施可能と考えられた。H9C2細胞は前培養後にsubconfluentとなる2.5×10⁴/ウェルの播種が適当であり、試験用培地には細胞の継代にも用いるRPMI1640の使用が適当であった。PTXへの曝露時間は1時間で十分な感度(IC₅₀:121 ng/mL)で検出できたため、本試験は前培養開始から最短27時間(前培養24時間、曝露時間1時間、呈色反応1時間、培地の除去や吸光度の測定・解析等1時間)で結果が得られる。

HPLC-FLD等の機器分析法やELISA法と比較すると、培養細胞を用いる検出法は生体活性のスクリーニング機能を有する点や、緊急検査に対しても培養細胞と標準品を備えていれば当日中に開始できる点、さらに高価な機器や抗体の準備を必要としない点で優れている。一方、特異性の面では劣っているため、今後ELISA法などPTX特異的な検出法との並行実施等を検討する必要がある。

文 献

- 1)厚生労働省:食中毒統計資料(2011年2月10日現在);<http://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/04.html>
- 2)谷山茂人:パリトキシン様毒.食品衛生研究,59(8):45-51,2009.
- 3)厚生労働省:自然毒のリスクプロファイル(2011年2月10日現在);<http://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/poison/index.html>
- 4)Teh YF, Gardiner JE: Partial purification of *Lophozozymus pictor* toxin. *Toxicon*, 12(6):603-610, 1974.
- 5)社団法人 日本食品衛生協会:食品衛生検査指針 理化学編 2005.
- 6)Sauer UG: Animal vs. non-animal tests for the monitoring of marine biotoxins in the EU. *ALTEX*, 22(1):19-24, 2005.
- 7)Bignami GS, Raybould TJ, Sachinvala ND, Grothaus PG, Simpson SB, Lazo CB, Byrnes JB, Moore RE, Vann DC: Monoclonal antibody-based enzyme-linked

- immunoassays for the measurement of palytoxin in biological samples. *Toxicon*, 30(7): 687-700, 1992.
- 8) Riobóa P, Paza B, Franco JM: Analysis of palytoxin-like in *Ostreopsis* cultures by liquid chromatography with precolumn derivatization and fluorescence detection. *Analytica Chimica Acta*, 566(2): 217-223, 2006.
- 9) Cañete E, Diogène J: Comparative study of the use of neuroblastoma cells (Neuro-2a) and neuroblastoma×glioma hybrid cells (NG108-15) for the toxic effect quantification of marine toxins. *Toxicon*, 52(4): 541-550, 2008.
- 10) Caillaud A, Yasumoto T, Diogène J: Detection and quantification of maitotoxin-like compounds using a neuroblastoma (Neuro-2a) cell based assay. Application to the screening of maitotoxin-like compounds in *Gambierdiscus* spp. *Toxicon*, 56(1): 36-44, 2010.
- 11) Okumura M, Tsuzuki H, Tomita B: A rapid detection method for paralytic shellfish poisoning toxins by cell bioassay. *Toxicon*, 46(1): 93-98, 2005.
- 12) Okumura M, Hasegawa A, Tohyama A: Simple and rapid cell-bioassay for maitotoxin, a natural marine toxin as a ciguatera fish poisoning toxin. A0AC International Annual Meeting, 2008.
- 13) 長谷川晶子: 培養細胞を用いた海洋性自然毒検出法. *ぶんせき*, 11: 627-628, 2009.
- 14) Taniyama S, Mahmud Y, Terada M, Takatani T, Arakawa O, Noguchi T: Occurrence of a food poisoning incident by palytoxin from a serranid *Epinephelus* sp. in Japan. *Journal of Natural Toxins*, 11(4), 277-282, 2002.
- 15) invitrogen: 基本培地-哺乳類細胞培養基本培地. http://www.invitrogen.jp/gibco/basal_media.shtml.
- 16) Kim MH, Jung YS, Moon CH, Jeong EM, Lee SH, Baik EJ, Moon CK: Isoform-specific induction of PKC-epsilon by high glucose protects heart-derived H9c2 cells against hypoxic injury, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 309(1), 1-6, 2003.

A cytolytic assay for the measurement of palytoxin

Mizuna Hayashi, Mami Hata, Kiyoko Tachii,
Akiko Hasegawa, Akira Fujiura, Hiroko Minagawa

Marine toxins present in seafood are potential hazard for human through foodborne intoxication, frequently with lethal consequences. Palytoxin is one of the most potent marine toxins. Recently, the number of patient reports intoxicated with palytoxin increased in Japan. For effective public health practice, proper monitoring of palytoxin in seafood and its risk assessment are required.

The mouse bioassay is generally used for the quantification of palytoxin. However, this method is far from ideal, because of its low sensitivity, and the lack of specificity. The ethical problem regarding the use of experimental animals also exists. Therefore, alternative methods for the detection of palytoxin in seafood are now being sought.

Under these circumstances, we developed a cell-based assay for the detection and quantification of palytoxin by modifying one originally developed for maitotoxin. Our data demonstrated here indicated that the cytolytic assay using H9C2 cell line can detect palytoxin within 3 hours after exposure with sufficient sensitivity, and, if combined with another assay with higher specificity, may replace the mouse assay.

Key words: palytoxin, cell-based assay, food poisoning

調査研究

Scheduled MRM を用いた LC-MS/MS による 食品中の多成分残留農薬分析法の検討

渡邊美奈恵、上野英二、棚橋高志、大野春香、猪飼誉友、大島晴美、三上栄一

要 旨

各農薬成分の予測される溶出時間帯のみをモニターする Scheduled MRM を用いた LC-MS/MS による食品中の多成分残留農薬分析法を作成して、日常の残留分析への適用について検討した。試料からアセトニトリルで抽出し、塩析により水層を分離後、GPC/グラファイトカーボン SPE、次いでシリカゲル/PSA カートリッジ連結 SPE により精製して LC-MS/MS で測定した。代表的な 40 種類の農薬成分を用いて検証したところ、10 回繰り返し測定における保持時間とピーク面積の相対標準偏差 (RSD) は、それぞれ 0.04~0.71% (平均 0.17%)、2.2~12.7% (平均 3.9%)、検量線の直線範囲は 3 オーダー以上 ($r^2 \geq 0.998$)、検出限界はシラフルオフエン、フェノブカルブを除いて 0.1~3.7 ng/g と良好であった。また、ハウレンソウおよび玄米での添加回収率は、スピノシン A およびスピノシン D を除いた 38 種類の農薬成分で 80.2~113.6% ($RSD \leq 10.5\%$) と良好であった。

キーワード：残留農薬、食品、LC-MS/MS、scheduled MRM

序 文

近年、輸入野菜からの残留農薬の検出、無登録農薬問題、さらに冷凍餃子事件と残留農薬に対する関心は非常に高まっており、それに伴って食品の安全性を確保するための規制が強化されている。農薬、飼料添加物及び動物用医薬品が一定の量を超えて残留する食品の販売等を原則禁止するというポジティブリスト制度 (平成 18 年 5 月 29 日施行)¹⁾ の導入に伴い、様々な性質の農薬に柔軟に対応でき、かつ信頼性の高い多成分分析法が求められている。このため、GC (ガスクロマトグラフィー) への適用が困難な難揮発性あるいは熱分解性の農薬について、LC-MS/MS (液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法) を用いた一斉分析法が数多く報告されている^{2~4)}。著者らは、GC あるいは LC 適用の農薬について抽出と精製を一連の操作で実施できる効率的な試料調製法が必要であると考え、アセトニト

リル抽出・水層分離法、酢酸エチル溶解・脱水法、GPC (gel permeation chromatography、ゲル浸透クロマトグラフィー) / グラファイトカーボン SPE (solid-phase extraction、固相抽出) およびシリカゲル/PSA (primary secondary amine、エチレンジアミン-N-プロピルシリル化シリカゲル) カートリッジ連結 SPE による精製法などを検討し、GC、LC、GC-MS および LC-MS を用いた多成分系統分析法を報告してきた^{5~10)}。今回、本系統分析法について、さらに広範の農薬に対応するために Scheduled MRM (以下、sMRM) を用いた LC-MS/MS による多成分一斉測定法を作成し、日常の食品中残留農薬分析への適用性について検証したので、その結果を報告する。

方 法

1. 試料

試料は愛知県内の小売店で購入した。

2. 試薬および標準品

試薬は和光純薬工業(株)または関東化学(株)の残留農薬試験用、水は脱イオン水を蒸留したものを用いた。

標準品は和光純薬工業(株)および林純薬工業(株)の残留農薬試験用を用い、原則としてメタノールに溶解して1 mg/mL標準原液とした。この標準原液をアセトンで希釈して添加回収試験用の混合標準溶液とした。また、メタノールで適宜希釈して検量線作成用の混合標準溶液とした。

グラファイトカーボンカラムは、ポリプロピレン製リザーバー(Varian社製、6 mL)にグラファイトカーボン(Supelco社製ENVI-Carb II)-微結晶セルロース(Merck社製Avicel)(1:2)500 mg、次いで無水硫酸ナトリウム500 mgを充填したものをGPC装置のコレクター部に装着して用いた。また、シリカゲル/PSAカートリッジカラムは、Varian社製Bond Elut Jr-PSA(500 mg)の手前にWaters社製Sep-Pak Plus Silica(690 mg)を連結して用いた⁶⁾。

3. 装置および測定条件

GPC装置：島津製作所製GPCクリーンナップシステムに、昭和電工(株)製CLNpak EV-2000カラム(内径20 mm、長さ30 cm)およびCLNpak EV-Gガードカラム(内径20 mm、長さ10 cm)を装着して用いた。GPC条件は、カラム温度40℃、移動相アセトン-シクロヘキサン(1:4)、流速5 mL/min、モニター波長254 nmに設定した⁶⁾。

LC装置：(株)島津製作所製Prominenceに、(株)資生堂製Capcell Pak C18 AQカラム(内径2 mm、長さ150 mm、粒子径3 μm)およびCapcell Pak C18 AQガードカラム(内径2 mm、長さ10 mm、粒子径3 μm)を装着して用いた。測定条件は、移動相アセトンニトリル-10 mmol 酢酸アンモニウム水溶液 [(10:90)→(95:5)]25 min+(95:5)10 min + [(95:5)→(10:90)]0.01 min+(10:90)15 min、カラム温度40℃、サンプル注入量3 μLに設定した。

MS/MS装置：Applied Biosystems社製API4000(Analyst version 1.5ソフトウェア付)を使用し、以下の条件に設定した。イオン化モードESIポジティブ、イオンスプレー電圧5.5 kV、ターボガス温度600℃、MRMデータ取得幅180 sec(中央時間 各農

薬成分の保持時間+30 sec)、サイクル時間1.6 sec/スキャン、対象農薬成分およびMRM条件はTable 1に示した。

4. 分析操作

(1) 試験溶液の調製

細切試料50 gから既報⁶⁾に準じてアセトンニトリル抽出・水層分離法、次いで酢酸エチル溶解・脱水法により粗抽出液10 mL(試料濃度2.5 g/mL)を得た。これを3,000回転/minで15分間遠心分離後、上清4 mL(試料10 g相当)をGPC/グラファイトカーボンSPEにより精製した。次いで、シリカゲル/PSAカートリッジ連結SPEにより精製し、アセトン-ヘキサン(1:1)で2 mLに定容してGC用の試料溶液(試料濃度5 g/mL)とした。この試料溶液20 μLを分取し、窒素気流下で穏やかに乾固させたのち、メタノールで1 mLに定容してLC-MS/MS用の試料溶液(試料濃度0.1 g/mL)とした。

(2) 定性および定量

Analystのデータ解析画面上で保持時間およびピーク形状を確認し、必要により手動で波形処理を行ったのち、ピーク面積を用いる絶対検量線法により定量した。

結果および考察

1. MS/MS条件

定法に従いMRM条件を最適化したのち、sMRM条件を検討した。sMRMは、各成分の予測される溶出時間帯のみをMRMでモニターする方法であり、理論上、成分数が多くなってもデータ取り込み時間(dwell time)を極端に短くすることなく、各成分ピークのデータポイント数を十分に確保することができるかとされている。そこで、著者らが用いているMRM(268MRM、dwell time 5 msec、pause time 5 msec)と比較したところ、sMRMではS/N比が最大で約8倍向上し、相対標準偏差(RSD)も約4倍改善され、多くの農薬成分をより高感度に精度良く定量することができると考えられた。Fig 1にメタミドホス、イミダクロプリドのMRMクロマトグラムおよびsMRMクロマトグラムを示した。なお、シアベンダゾールなどピークが後方へとテーリングしやすい農薬成分に対しても、モニター時間に十分な余裕を持たせるためにMRMのデータ取得幅を比較的長い180 secに設定し、さ

Table 1. Pesticide-specific ESI (+) mode LC-MS/MS parameters

Compound	RT (min)	Quantifier MRM						Qualifier MRM							
		Q1 ^{a)}	>	Q3 ^{b)}	DP ^{c)}	EP ^{d)}	CE ^{e)}	CXP ^{f)}	Q1 ^{a)}	>	Q3 ^{b)}	DP ^{c)}	EP ^{d)}	CE ^{e)}	CXP ^{f)}
		(m/z)		(m/z)	(V)	(V)	(V)	(V)	(m/z)		(m/z)	(V)	(V)	(V)	(V)
Methamidophos	3.41	142.0	>	112.0	56	10	19	8	142.0	>	94.2	56	10	21	6
Acephate	3.97	184.0	>	142.8	46	10	13	8	184.0	>	113.0	46	10	33	8
Oxamyl	7.15	237.0	>	72.2	31	10	27	6	237.0	>	90.2	31	10	13	6
Methomyl	7.79	163.1	>	106.0	46	10	15	8	163.1	>	88.2	46	10	13	6
Imidacloprid	10.29	256.1	>	208.8	56	10	23	14	256.1	>	175.0	56	10	27	12
Dimethoate	10.72	230.0	>	198.8	51	10	15	12	230.0	>	170.9	51	10	21	12
Acetamiprid	10.92	223.0	>	126.0	61	10	31	8	223.0	>	73.1	61	10	77	6
Tricyclazole	11.00	190.1	>	162.9	71	10	33	12	190.1	>	135.9	71	10	41	10
Thiabendazole	11.58	202.0	>	175.0	86	10	37	12	202.0	>	131.0	86	10	47	10
Pyroquilon	12.26	174.0	>	132.0	81	10	33	8	174.0	>	117.0	81	10	47	8
Thiacloprid	12.39	253.1	>	126.0	71	10	31	8	253.1	>	99.1	71	10	59	8
Oxadixyl	13.25	279.2	>	219.0	66	10	17	14	279.2	>	132.0	66	10	47	8
Carbaryl	15.47	202.1	>	145.0	56	10	15	10	202.1	>	127.0	56	10	41	10
Fosthiazate 1,2	15.57	284.1	>	228.0	61	10	15	14	284.1	>	104.0	61	10	31	8
Metominostrobin E type	16.48	285.2	>	195.9	56	10	21	12	285.2	>	193.9	56	10	29	14
Metominostrobin Z type	17.20	285.1	>	195.9	56	10	19	12	285.1	>	77.1	56	10	55	14
Triadimenol	17.55	296.2	>	70.2	36	10	33	12	296.2	>	226.9	36	10	15	14
Pyrimethanil	18.06	200.1	>	107.0	86	10	35	8	200.1	>	77.1	86	10	59	6
Fenobucarb	18.09	208.1	>	152.0	61	10	13	10	208.1	>	95.2	61	10	21	6
Azoxystrobin	19.01	404.2	>	371.9	61	10	21	12	404.2	>	344.0	61	10	35	10
Triadimefon	19.12	294.1	>	197.0	61	10	23	12	294.1	>	69.3	61	10	33	12
Tetraconazole	19.40	372.1	>	158.8	76	10	45	10	372.1	>	70.2	76	10	53	12
Imazalil	19.57	297.1	>	201.0	71	10	27	14	297.1	>	158.9	36	10	29	8
Flusilazole	19.70	316.1	>	165.0	71	10	37	12	316.1	>	246.9	71	10	27	16
Bitertanol 1,2	19.92	338.2	>	268.9	36	10	15	16	338.2	>	70.3	36	10	31	12
Iprobenphos	19.99	289.1	>	91.2	56	10	35	6	289.1	>	204.9	56	10	17	14
Isoprothiolane	20.17	291.1	>	230.8	36	10	17	14	291.1	>	188.8	36	10	31	12
Triazophos	20.31	314.1	>	161.9	61	10	29	12	314.1	>	119.1	61	10	49	8
Flutolanil	20.37	324.1	>	261.8	71	10	27	8	324.1	>	241.8	71	10	37	16
Cyprodinil	20.87	226.1	>	93.3	91	10	53	6	226.1	>	77.2	91	10	65	6
Difenoconazole	21.27	406.1	>	250.8	81	10	39	16	406.1	>	187.8	81	10	65	14
Carpropamid	21.68	333.8	>	138.8	71	10	29	10	333.8	>	195.7	71	10	19	12
Isoxathion	22.86	314.0	>	105.0	61	10	23	8	314.0	>	97.1	61	10	57	8
Fenpyroximate E type	23.74	422.2	>	366.0	71	10	27	12	422.2	>	135.0	71	10	45	8
Fenpyroximate Z type	24.67	422.2	>	366.1	61	10	21	12	422.2	>	137.9	61	10	47	10
Propargite	24.87	368.2	>	231.1	51	10	15	6	368.2	>	175.0	51	10	23	12
Etofenprox	26.52	394.3	>	176.9	41	10	23	12	394.3	>	359.1	41	10	17	12
Spinosyn A	26.91	732.5	>	142.1	101	10	39	10	732.5	>	98.2	101	10	97	8
Spinosyn D	27.80	746.5	>	142.1	116	10	41	10	746.5	>	98.1	116	10	101	8
Silafluofen	27.86	426.1	>	286.9	36	10	15	8	426.1	>	167.9	36	10	49	12

^{a)} Precursor ion, ^{b)} Product ion, ^{c)} Declustering potential, ^{d)} Entrance potential, ^{e)} Collision energy, ^{f)} Collision cell exit potential

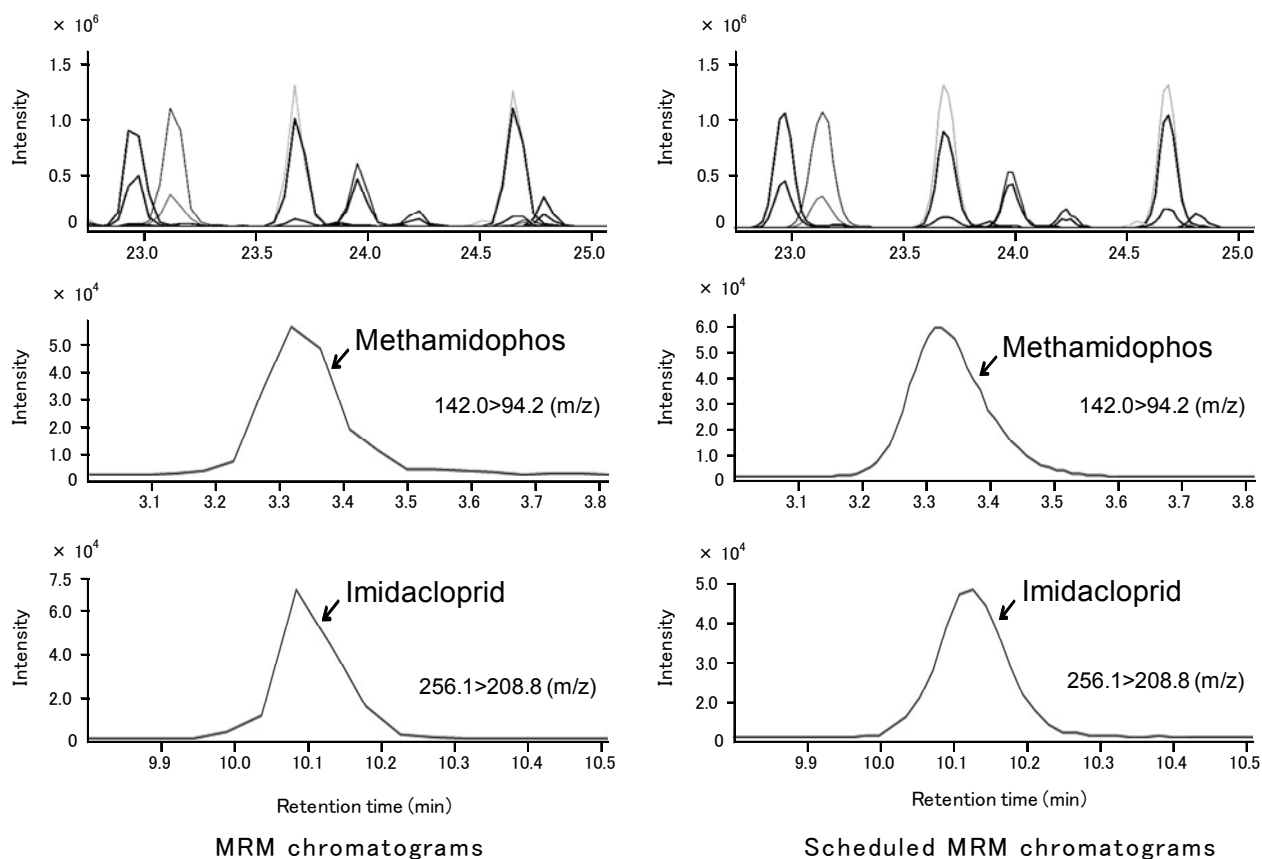


Fig.1 Comparisons of MRM chromatograms and scheduled MRM chromatograms

らにその中央時間を各農薬成分の保持時間（ピークトップ時間）よりも 30 sec 遅く設定することにした。すなわち、各農薬成分の保持時間の前 60 sec、後 120 sec をモニターすることにした。

本 sMRM を用いた LC-MS/MS の再現性を検証するために、10 ng/mL 混合標準溶液を 10 回連続して測定する性能評価試験を実施し、その結果を Table 2 に示した。保持時間の RSD は 0.04~0.71%（平均 0.17%）であり、カラム保持の弱いメタミドホスおよびアセフェート¹⁰⁾を除いて良好であった。また、ピーク面積の RSD は 2.2~12.7%（平均 3.9%）であり、シラフルオフエンを除いて良好であった。検量線については、5~5,000 ng/g の範囲で寄与率 (r^2) 0.998~1.000 と 3 オーダー以上の優れた直線性が確認された。また、検出限界値 ($S/N=3$) は、シラフルオフエン、フェノブカルブを除いて 0.1~3.7 ng/g と良好であった。

2. 精製法

前報⁹⁾と同様に葉菜類、特にクロロフィル、 β -カロテンなどの色素成分を多量に

含有するハウレンソウでは、試料溶液に着色が見られるものがあつたことから、GPC の分取開始時間を 11.4 min（アクリナトリンのピークトップ）から 11.8 min（アクリナトリンとフルバリネートのピークトップ中央）へと若干遅らせることにした。また、ESI イオン化モード LC-MS/MS では、色素成分などの夾雑物が共存すると農薬成分のイオン化が抑制され、ピーク強度が低下することが知られている⁸⁾。これに対して畠山らは、試料溶液を希釈することでイオン化抑制を緩和できると報告している³⁾。そこで、sMRM の採用による LC-MS/MS の高感度化もあつて、10 倍希釈の試料溶液（試料濃度 0.1 g/mL）を測定することにした。本法により調製したハウレンソウのブランク試料溶液に各農薬標準品を 10 ng/mL 添加して確認したところ、ピーク強度の低下は数%以内とイオン化抑制はほとんど認められなかった。このことから本試料調製法は、LC-MS/MS において非常に有効な方法と考えられた。

Table 2. Repeatability, linearity, and detection limit of compounds by LC-MS/MS using scheduled MRM

Compound	Repeatability (n=10)		Linearity (5-5,000 ng/g)			Detection limit (ng/g)
	RT(min) RSD(%)	Area RSD(%)	Slope ($\times 10^3$)	Intercept ($\times 10^3$)	r^2	
Methamidophos	0.51	6.3	4.7	-1.5	0.999	2.3
Acephate	0.71	5.2	41.1	60.7	1.000	2.4
Oxamyl	0.32	4.7	28.9	16.4	1.000	0.5
Methomyl	0.36	8.0	16.1	13.5	0.999	1.0
Imidacloprid	0.28	3.2	30.9	45.6	0.999	0.3
Dimethoate	0.27	3.4	51.6	48.1	1.000	0.5
Acetamiprid	0.25	4.0	68.8	101.1	0.999	0.2
Tricyclazole	0.25	3.3	53.1	56.7	1.000	0.3
Thiabendazole	0.31	4.0	99.1	69.4	1.000	0.2
Pyroquilon	0.23	2.2	23.1	18.2	1.000	1.6
Thiacloprid	0.21	3.0	80.7	45.1	1.000	0.1
Oxadixyl	0.20	2.7	64.0	35.1	1.000	0.9
Carbaryl	0.12	3.2	29.3	31.5	0.999	0.7
Fosthiazate 1,2	0.15	3.7	77.3	78.5	1.000	0.2
Metominostrobin E type	0.20	3.6	109.7	42.5	1.000	0.2
Metominostrobin Z type	0.13	2.7	94.7	71.8	1.000	0.3
Triadimenol	0.12	4.0	62.6	61.1	0.999	0.3
Pyrimethanil	0.18	2.6	9.4	7.6	1.000	3.7
Fenobucarb ^{a)}	0.11	3.3	6.5	6.1	0.999	8.2
Azoxystrobin	0.12	2.9	267.5	23.2	1.000	0.2
Triadimefon	0.08	3.4	47.0	42.5	1.000	0.5
Tetraconazole	0.11	2.5	30.0	22.8	1.000	0.9
Imazalil	0.11	4.8	18.1	4.2	1.000	1.6
Flusilazole	0.12	4.8	45.8	79.6	0.998	0.4
Bitertanol 1,2	0.09	3.5	89.8	97.1	0.999	0.3
Iprobenphos	0.11	2.6	88.2	87.3	0.998	0.3
Isoprothiolane	0.11	3.4	144.6	213.6	0.999	0.5
Triazophos	0.11	2.9	133.0	143.7	0.999	0.3
Flutolanil	0.10	3.9	40.4	77.6	0.999	0.4
Cyprodinil	0.10	2.7	75.1	62.4	0.998	0.3
Difenoconazole	0.08	2.2	113.2	118.7	0.999	0.3
Carpropamid	0.10	4.7	13.2	6.2	1.000	1.7
Isoxathion	0.07	4.9	43.9	24.8	1.000	0.4
Fenpyroximate E type	0.05	2.9	85.4	111.7	0.999	0.3
Fenpyroximate Z type	0.05	3.3	141.8	34.1	1.000	0.2
Propargite	0.04	3.6	31.5	1.7	1.000	0.5
Etofenprox	0.05	4.9	28.8	-15.9	1.000	1.3
Spinosyn A	0.04	2.2	371.5	246.5	1.000	0.1
Spinosyn D	0.04	3.1	360.4	129.6	1.000	0.1
Silafluofen ^{a)}	0.05	12.7	0.3	-1.6	0.999	13.0

^{a)} Linearities were tested at 50-5,000 ng/g.

Table 3. Recovery of spiked pesticides from spinach and brown rice

Compound	Recovery (%), n=5							
	Spinach				Brown rice			
	10 ng/g		100 ng/g		10 ng/g		100 ng/g	
Mean	RSD	Mean	RSD	Mean	RSD	Mean	RSD	
Methamidophos	80.2	5.1	81.1	5.3	81.7	7.9	84.5	5.4
Acephate	89.3	4.7	88.1	5.9	88.1	6.2	88.7	7.0
Oxamyl	97.7	6.7	99.1	6.0	96.0	3.1	100.6	4.9
Methomyl	98.5	7.3	99.3	3.6	94.1	7.3	98.2	4.6
Imidacloprid	104.6	2.8	102.1	1.6	82.8	7.9	113.6	2.5
Dimethoate	100.5	5.2	95.0	3.1	88.2	4.7	99.6	4.9
Acetamiprid	99.8	5.6	96.5	3.3	85.4	8.6	99.1	3.5
Tricyclazole	98.0	4.5	95.5	4.1	89.5	6.7	98.9	4.0
Thiabendazole	95.3	4.0	98.8	3.8	81.0	6.8	97.3	2.8
Pyroquilon	96.8	6.8	97.7	5.8	93.8	5.9	97.4	3.1
Thiacloprid	99.7	3.7	97.9	3.5	92.2	8.2	101.0	2.3
Oxadixyl	99.4	2.6	98.7	3.9	93.3	5.9	102.3	3.7
Carbaryl	98.7	5.2	97.4	3.5	93.8	6.8	99.8	7.3
Fosthiazate 1,2	98.3	5.5	98.6	5.0	98.2	5.8	101.0	1.8
Metominostrobin E type	97.5	6.9	99.2	5.1	96.1	4.9	97.8	2.0
Metominostrobin Z type	98.0	7.1	97.3	2.5	96.9	5.7	98.3	4.0
Triadimenol	97.2	7.7	96.1	6.5	91.2	10.5	96.4	5.5
Pyrimethanil	95.1	4.1	99.0	4.4	93.6	6.7	98.7	4.8
Fenobucarb	97.4	4.9	97.8	8.4	96.7	7.6	99.4	6.9
Azoxystrobin	96.5	5.3	99.4	3.7	97.3	4.3	99.2	2.4
Triadimefon	92.9	5.4	95.0	3.0	96.5	7.6	98.3	4.2
Tetraconazole	96.0	8.4	97.2	4.8	91.2	9.7	100.9	4.7
Imazalil	92.8	4.7	96.0	5.2	112.6	4.3	100.1	3.4
Flusilazole	96.8	4.0	99.2	3.1	91.7	7.2	98.6	4.2
Bitertanol 1,2	95.2	5.9	96.7	6.0	92.2	6.2	94.2	4.9
Iprobenphos	102.2	4.6	93.5	2.9	93.4	5.0	99.7	3.0
Isoprothiolane	98.9	4.5	98.6	4.8	97.2	6.0	98.1	2.8
Triazophos	99.2	3.6	96.1	4.4	95.4	5.3	101.9	3.7
Flutolanil	97.6	6.3	96.4	4.7	90.6	5.1	99.7	2.3
Cyprodinil	99.7	1.5	98.3	3.2	95.1	5.0	99.0	1.9
Difenoconazole	98.6	3.0	98.9	3.1	96.7	2.6	99.0	4.0
Carpropamid	96.5	7.7	98.5	6.3	85.0	9.6	96.2	6.5
Isoxathion	98.6	6.9	97.8	5.4	98.0	6.3	101.9	2.7
Fenpyroximate E type	98.8	3.5	99.1	3.4	93.9	5.2	98.9	4.3
Fenpyroximate Z type	99.2	4.3	96.6	3.9	96.9	2.7	100.8	4.0
Propargite	98.8	9.1	99.3	2.8	94.0	4.4	101.1	5.0
Etofenprox	94.4	4.9	95.5	3.5	84.1	7.7	96.9	2.4
Spinosyn A	47.6	9.2	47.0	3.8	47.4	5.3	47.2	3.4
Spinosyn D	41.0	4.6	39.8	5.6	41.9	5.7	42.6	2.9
Silafluofen ^{a)}	93.1	6.7	95.7	4.7	91.7	7.3	102.5	7.7

^{a)} Two different fortified levels were set at 100 ng/g and 1,000 ng/g.

3. 添加回収試験

LC 適用の代表的な 40 種類の農薬成分を選択し、ハウレンソウ、玄米を用いて試料中濃度 10 ng/g および 100 ng/g での添加回収試験 (n=5) を行った。その結果、分子サイズが大きいため GPC での溶出が極端に早いスピノシン A およびスピノシン D⁷⁾を除いた 38 種類の農薬成分で、回収率がハウレンソウでは 80.2~104.6% (RSD \leq 9.2%)、玄米では 81.7~113.6% (RSD \leq 10.5%) と満足すべき結果が得られた (Table 3)。

まとめ

多くの農薬成分の一斉測定において、sMRM を用いることにより LC-MS/MS の感度、再現性が大きく向上することを確認した。この LC-MS/MS に、色素などの夾雑物を効率良く除去できる GPC/グラファイトカーボン SPE、シリカゲル/PSA カートリッジ連結 SPE、および試料溶液を希釈する試料調製法を組み合わせることによって、日常の食品中残留農薬分析に適用可能と判断される検討結果が得られた。

本論文の概要は、第 47 回全国衛生化学技術協議会年会 (2010 年 11 月、神戸) において発表した。

文 献

- 1) 食品衛生法等の一部を改正する法律、平成 15 年法律第 55 号、平成 15 年 5 月 30 日公布
- 2) 谷澤春奈, 島 三記絵, 池原千枝子, 小畑雅一, 佐藤元昭: LC/MS/MS による農産物中残留農薬の多成分一斉スクリーニング分析, 食品衛生学雑誌, 46, 185-197, 2005.
- 3) 畠山えり子, 梶田弘子, 菅原隆志, 佐々木 陽, 高橋 悟, 小向隆志: 限外ろ過法を用いた LC/MS/MS による農産物中の残留農薬一斉分析, 食品衛生学雑誌, 47, 137-145, 2006.
- 4) 石井里枝, 高橋邦彦, 堀江正一: LC/MS/MS による農産物中の残留農薬一斉分析法, 食品衛生学雑誌, 47, 201-212, 2006.
- 5) Ueno E, Oshima H, Saito I, Matsumoto H: Determination of organophosphorus pesticide residues in onion and welsh onion by gas chromatography with pulsed flame photometric detector, Journal of Pesticide Science, 28, 422-428, 2003.
- 6) Ueno E, Oshima H, Saito I, Matsumoto H: Multiresidue analysis of pesticides in vegetables and fruits by gas chromatography/mass spectrometry after gel permeation chromatography and graphitized carbon column cleanup, Journal of AOAC International, 87, 1003-1015, 2004.
- 7) 上野英二, 梶島由佳, 大島晴美, 松本浩: LC/MS 等による玄米中の農薬実態調査 (第 2 報), 第 42 回全国衛生化学技術協議会年会講演集, 72-73, 2005.
- 8) 上野英二: サロゲート物質の食品中残留農薬分析への利用について, 食品衛生学雑誌, 49, J-309-J-313, 2008.
- 9) 上野英二, 大野春香, 棚橋高志, 大島晴美, 三上栄一: ブロス NPD 方式ガスクロマトグラフィーによる食品中の多成分残留農薬分析法の検討, 愛知県衛生研究所報, 60, 15-22, 2010.
- 10) 上野英二, 大野春香, 棚橋高志, 大島晴美, 三上栄一, 根本 了, 松田りえ子: LC-MS による畜水産物およびはちみつ中のアセフェート, メタミドホスおよびオメトエートの分析, 食品衛生学雑誌, 51, 122-127, 2010.

Multi-residue analysis of pesticides in foods by liquid chromatography with tandem mass spectrometry using scheduled MRM

Minae Watanabe, Eiji Ueno, Takashi Tanahashi, Haruka Ohno,
Yoshitomo Ikai, Harumi Oshima, Eiichi Mikami

We evaluated a multi-residue method of pesticides in foods by liquid chromatography with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) using scheduled MRM. The sample was extracted with acetonitrile, and the extract was cleaned up by a salting-out step. Co-extractives were removed by gel permeation chromatography (GPC)/graphitized carbon column solid-phase extraction (SPE) and tandem silica gel/PSA cartridge column SPE. The test solution was determined by LC-MS/MS using scheduled MRM. In all cases, the repeatability studies (n=10) of retention time and peak area yielded RSDs lower than 0.71% (average of 0.17%) and lower than 12.7% (average of 3.9%), respectively, and calibration curves (5-5,000 ng/g) were linear with correlation coefficients higher than 0.998. Good sensitivity of the method was obtained with limits of detection ranging from 0.1 to 3.7 ng/g, except for silafluofen and fenobucarb. Average recoveries of pesticides, except for spinosyn A and spinosyn D, from fortified spinach and brown rice sample ranged from 80.2 to 113.6% with RSDs of $\leq 10.5\%$.

Key words: pesticide residue, food, LC-MS/MS, scheduled MRM

調 査 研 究

一般住宅におけるホルムアルデヒド、アセトアルデヒド及び 揮発性有機化合物の実態調査

—平成 10 年度から 10 年間の調査結果—

林 留美子、垣添寛和¹、高橋 裕¹、松岡弘行¹、中島秀隆¹、
椛島由佳、小島美千代、三上栄一
¹愛知県健康福祉部健康担当局生活衛生課

要 旨

愛知県ではホルムアルデヒド、アセトアルデヒド及び揮発性有機化合物の室内濃度を把握するため、平成 10 年度から一般住宅における室内汚染実態調査を実施している。そこで、今後のシックハウス対策の推進に資するため、平成 10～19 年度の調査結果を解析した。

ホルムアルデヒドの年度別平均濃度は経年的に減少し、平成 15 年 7 月以降の新築住宅では、室内濃度指針値を超過した事例はなかった。アセトアルデヒドにおいても各年度の平均濃度は経年的に減少した。一方、総揮発性有機化合物では、年度別平均濃度に一定の傾向は認められず、多くの住宅で検出されたパラジクロロベンゼンにおいても、経年的な傾向はみられなかった。また、対象住宅において検出率が高かったパラジクロロベンゼン、トルエン及びテルペン類では、室内濃度指針値等を超過する事例が依然として散見されることから、今後も住まい方の相談・普及啓発事業を継続していく必要がある。

キーワード：シックハウス症候群、ホルムアルデヒド、揮発性有機化合物

序 文

「シックハウス症候群」^{1, 2)}とは、欧米諸国で 1970 年代に社会問題化した「シックビル症候群」からの和製英語である。欧米各地において、オフィスビルで勤務する人の中に粘膜刺激症状や不定愁訴等の非特異的症状を自覚する人が増加し、シックビル症候群と命名された³⁾。この原因は明らかではないが、省エネルギー化を目的として建物の気密性が高められ、外気導入量が減少したことに伴う室内空気の汚染が要因と考えられている⁴⁾。

日本においては、昭和 35(1960)年頃から不特定多数の人が出入りする建築物での不適切な温度調整や浮遊粉じんの増加等、建築物の維持管理に起因する健康障害が多数報告され、これを受けて昭和 45 年に、「建築物の衛生的環境の確保に関する法律」⁵⁾が制定された。法施行後は、特定建築物におけるシックビル症候群の問題は解消されたが、その一方で、昭和 55 年頃から一般家庭において同様の症状が発生し、社会問題化するのに伴って「シックハウス症候群」と呼ばれるようになった⁶⁾。

シックハウス症候群の主な発症関連因子の一つとしては、従来、建材や内装材などから放散するホルムアルデヒドや、トルエンをはじめとする揮発性有機化合物(以下 VOC; volatile organic compounds)の吸入があげられている。愛知県においては、昭和 60 年代から、一般住宅における二酸化窒素の室内汚染及び居住児童への暴露影響調査⁷⁾を実施し、平成 10 年度からは、保健所及び衛生研究所の職員を構成員とするワーキンググループを設置し、ホルムアルデヒド、トルエン等の室内汚染実態調査を本格化した。本研究では、平成 10 年度から 10 年間の県内一般住宅におけるホルムアルデヒド、アセトアルデヒド及び VOC の室内濃度調査結果について、10 年間の経年推移を中心に解析した結果を報告する。

方 法

1. 調査期間及び調査対象住宅

平成 10 年 6 月から平成 20 年 3 月にかけて調査を実施した。対象住宅は、愛知県内の一般住宅のうち、築後 3 ヶ月以内の 105 住宅(以下、新築住宅)を中心に 211 住宅を選定した。年度別調査住宅数を表 1 に、築後月数別住宅数を表 2 に示した。

2. 調査対象物質

アルデヒド類 2 物質、VOC 40 物質の計 42 物質(表 3)について調査を実施した。なお、平成 14 年度までは、調査年度の経過とともに調査対象物質を増加している(表 4)。また、VOC 40 物質の検出濃度の合計値である総揮発性有機化合物濃度(以下、TVOC; total VOC)を算出した。

3. 試料採取及び測定方法⁸⁾

採取場所は、部屋の中央の床上約 1.2 m の高さとした。

捕集管として、アルデヒド類の採取には DSD-DNPH カートリッジ(SUPELCO 製)を、VOC の採取には ORB091L と ORB0101(SUPELCO 製)を直列で接続したものをを用いた。試料採取は、アルデヒド類では捕集管を 24 時間室内に放置するパッシブ法⁹⁾により、VOC では捕集管をサンプリングポンプに接続し、100mL/分で 24 時間吸引するアクティブ法により行った。

アルデヒド類の測定は、アセトニトリル 5 mL を用いて捕集管から HCHO-2, 4-DNPH

及び CH₃CHO-2, 4-DNPH を溶出させ、その 20 μ L を高速液体クロマトグラフ(HPLC)に注入して行った。VOC の測定は、捕集管から捕集剤を取り出してバイアル瓶に移し、二硫化炭素 2 mL 及び内部標準溶液(100 μ g/L トルエン-d₈) 2 μ L を加えて密栓し、時々軽く振とうしながら 2 時間放置した試料溶液 1 μ L を、ガスクロマトグラフ/質量分析計(GC-MS)に注入して行った。

4. 分析条件

(1)HPLC 条件(ホルムアルデヒド、アセトアルデヒド)

ポンプ：島津製作所製 LC-6AD
検出器：島津製作所製 SPD-10A
カラム：Wakosil-II 5C8 RS 250 mm×4.6 mm I.D.
移動相：アセトニトリル：水 = 6 : 4
流速：1 mL/分
注入量：20 μ L
検出波長：360 nm

(2)GC/MS 条件(VOC 40 物質)

装置：島津製作所製 QP5050A
カラム：DB-1(0.25 mm×60 m、膜厚 1.0 μ m)
カラム温度：40°C で 5 分間保持し、150°C まで毎分 5°C で昇温。その後毎分 10°C で昇温後、250°C で 18 分間保持。
キャリアガス：He (カラム流量 1.1 mL/分)
注入口温度：250°C
試料注入法：スプリット
検出器温度：280°C
イオン化：EI
測定モード：選択イオン検出

5. 統計処理

統計処理は SPSS for Windows 11.5 を用い、検定は X²、Fisher 直接確率法及び Mann-Whitney の U-テストで行い、有意水準を 5% とした。

結 果

室内濃度指針値が定められている 8 物質(ホルムアルデヒド、アセトアルデヒド、パラジクロロベンゼン、トルエン、エチルベンゼン、キシレン、スチレン、テトラデカン)及び暫定目標値が定められている TVOC の調査結果を表 4 に示した。

1. ホルムアルデヒド

ホルムアルデヒドの平均濃度(n=211)は 74 μ g/m³、中央値は 43 μ g/m³であり、室内

表 1 年度別調査住宅数

年度	H10	H11	H12	H13	H14	H15	H16	H17	H18	H19	計
住宅数	25	25	15	32	15	16	23	17	18	25	211

表 2 築後月数別住宅数

築後月数	3ヶ月以内	3ヶ月～1年	1～3年	3年以上	計
住宅数	105	54	18	34	211

表 3 調査対象物質

分類		物質名
アルデヒド類(2)		ホルムアルデヒド*、アセトアルデヒド*
揮発性有機化合物(40)	脂肪族炭化水素(13)	ヘキサン、ヘプタン、オクタン、ノナン、2,2,4-トリメチルペンタン、デカン、ウンデカン、ドデカン、トリデカン、ヘキサデカン、ペンタデカン、2,4-ジメチルペンタン、テトラデカン*
	芳香族炭化水素(9)	ベンゼン、トルエン*、エチルベンゼン*、キシレン*、スチレン*、1,3,5-トリメチルベンゼン、1,2,4-トリメチルベンゼン、1,2,3-トリメチルベンゼン、1,2,4,5-テトラメチルベンゼン
	ハロゲン類(9)	トリクロロエチレン、テトラクロロエチレン、クロロホルム、1,1,1-トリクロロエタン、1,2-ジクロロエタン、1,2-ジクロロプロパン、パラジクロロベンゼン*、四塩化炭素、クロロジブロモメタン
	アルデヒド・ケトン類(4)	2-ブタノン(メチルエチルケトン)、メチルイソブチルケトン(MIBK)、ノナナール、デカナール
	テルペン類(2)	α -ピネン、リモネン
	エステル類(2)	酢酸エチル、酢酸ブチル
	アルコール類(1)	n-ブタノール

*：室内濃度指針値設定項目

表 4 8物質及びTVOCの調査結果

物質名	調査年度	件数	中央値 ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	平均値 ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	標準偏差 ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	最大値 ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	最小値 ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	室内濃度 指針値 ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	指針値等 超過件数 (超過率%)
ホルムアルデヒド	H10-19	211	43	74	136	1412	1	100	37(18)
アセトアルデヒド	H14-19	114	18	22	19	87	0	48	14(12)
パラジクロロベンゼン	H12-19	161	6	264	1,328	14,000	0	240	21(13)
トルエン	H10-19	211	23	82	406	5700	0	260	9(4)
エチルベンゼン	H13-19	146	5	9	15	121	0	3,800	0(0)
キシレン	H10-19	211	10	24	47	357	0	870	0(0)
スチレン	H14-19	114	0	4	14	120	0	220	0(0)
テトラデカン	H14-19	114	4	8	18	150	0	330	0(0)
TVOC	H14-19	114	210	559	1,504	14,000	14	400*	35(31)

*:暫定目標値

濃度指針値の $100 \mu\text{g}/\text{m}^3$ を超過していた住宅は 37 件 (17.5%) であった。各年度の平均濃度及び指針値超過率 (%) は、平成 10 年度には $200 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 及び 36% であったが、平成 19 年度には $25 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 及び 0% に減少した (図 1)。また、築後 3 ヶ月以内の新築住宅 (n=105) では、着工時期が新しいほどホルムアルデヒド濃度が低い傾向が明らかで、建築基準法改正 (平成 15 年 7 月) 以降に着工した住宅では、室内濃度指針値を超過する事例はなかった (図 2)。

2. アセトアルデヒド

アセトアルデヒドの平均濃度 (n=114) は $22 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 、中央値は $18 \mu\text{g}/\text{m}^3$ であり、14 件 (12.3%) で室内濃度指針値の $48 \mu\text{g}/\text{m}^3$ を超過していた。年度別の平均濃度は、経年的に減少する傾向がみられたが、指針値超過率は 13% 前後で推移し、減少傾向は見られなかった (図 3)。また、新築住宅における着工時期とアセトアルデヒド濃度の間にも関連は見られなかった (図 4)。

3. パラジクロロベンゼン

パラジクロロベンゼンの平均濃度 (n=161) は $264 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 、中央値は $6 \mu\text{g}/\text{m}^3$ であり、21 件 (13.0%) で室内濃度指針値 ($240 \mu\text{g}/\text{m}^3$) を超過しており、その最大値は $14,000 \mu\text{g}/\text{m}^3$ と、指針値の 50 倍以上の室内濃度を示す住宅がみられた。また、年度別の平均濃度及び指針値超過率に一定の傾向は見られなかった。 (図 5)

4. トルエン

トルエンの平均濃度 (n=211) は $82 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 、中央値は $23 \mu\text{g}/\text{m}^3$ であり、そのうち 9 件 (4.3%) で室内濃度指針値 ($260 \mu\text{g}/\text{m}^3$) を超過していた。

5. エチルベンゼン、キシレン、スチレン、テトラデカン、その他の物質

エチルベンゼン、キシレン、スチレン、テトラデカンの平均濃度は、いずれも $30 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 未満であり、各室内濃度指針値を超過していた住宅はなかった。その他の 34 物質のうち検出率の高かったテルペン類 (α -ピネン+リモネン) の平均濃度 (n=114) は $107 \mu\text{g}/\text{m}^3$ であり、そのうち 12 件 (10.5%) で TVOC の暫定目標値 ($400 \mu\text{g}/\text{m}^3$) を超過していた。テルペン類以外の 32 物質では検出率も低く、TVOC の暫定目標値 ($400 \mu\text{g}/\text{m}^3$) を超過する物質はみられなかった。

6. TVOC

TVOC の平均濃度 (n=114) は $559 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 、中央値は $210 \mu\text{g}/\text{m}^3$ であり、およそ 3 割の 35 件 (30.7%) で暫定目標値 ($400 \mu\text{g}/\text{m}^3$) を超過し、その最大値は $14,000 \mu\text{g}/\text{m}^3$ と、パラジクロロベンゼンが最も高い住宅であった。また、年度別の平均濃度及び暫定目標値超過率に一定の傾向は見られなかった (図 6)。室内濃度指針値が設定されている 8 物質及び検出率の高かったテルペン類 (α -ピネン+リモネン) の年度別濃度構成比率 (図 7) では、パラジクロロベンゼン、トルエン、テルペン類の占める割合がいずれの年度においても高かった。

7. 換気時間と濃度

室内の換気時間を一日あたり 3 時間以内、3~12 時間及び 12 時間以上の 3 グループに分け、それぞれのグループのホルムアルデヒド平均濃度及びトルエン平均濃度を比較した。

その結果、ホルムアルデヒド及びトルエンのいずれにおいても、換気時間の短いグループほど平均濃度が高い傾向がみられた (図 8)。

考 察

平成 15 年 7 月に施行された建築基準法改正^{10),11)}により、住宅建築時におけるシックハウス対策が急速に進み、本調査においても、ホルムアルデヒド及びアセトアルデヒドでは、調査開始の平成 10 年度から経年的に室内濃度が減少する傾向がみられた。特にホルムアルデヒドは、法改正により建築資材についても規制が強化されたことから、法改正後の着工住宅では、室内濃度指針値の $100 \mu\text{g}/\text{m}^3$ を超過した事例はみられず、法改正による明らかな効果が認められた。一方、アセトアルデヒドでは、新築住宅における着工時期と室内アセトアルデヒド濃度との間に法改正との関連は明らかではなかった。

衣類の防虫剤として一般的に使用されるパラジクロロベンゼンでは、着工時期や築後経過月数と室内濃度との間に関連はなく、一部の住宅においては指針値の 10 倍以上の高濃度を示す住宅 (最高値: $14,000 \mu\text{g}/\text{m}^3$) がみられた。聞き取り調査の結果、防虫剤の使用量や使用方法が適切でない等、入居

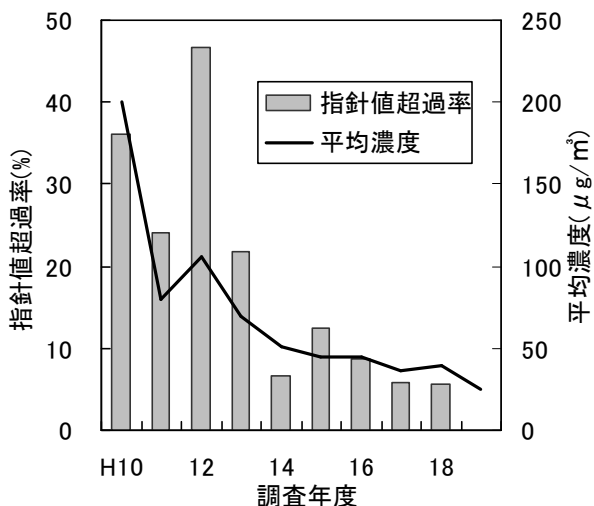


図1 ホルムアルデヒド濃度の推移

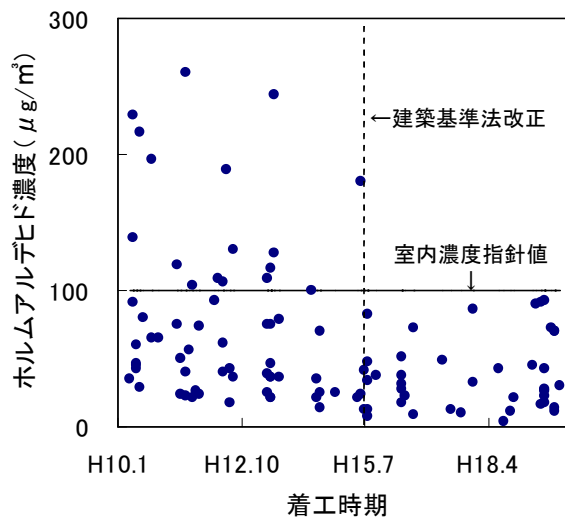


図2 新築住宅の着工時期とホルムアルデヒド濃度

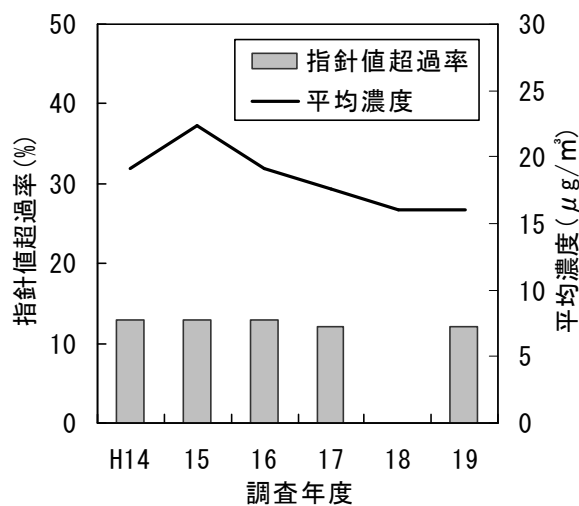


図3 アセトアルデヒド濃度の推移

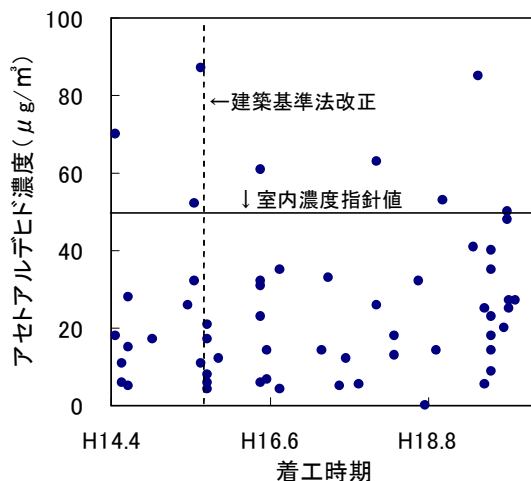


図4 新築住宅の着工時期とアセトアルデヒド濃度

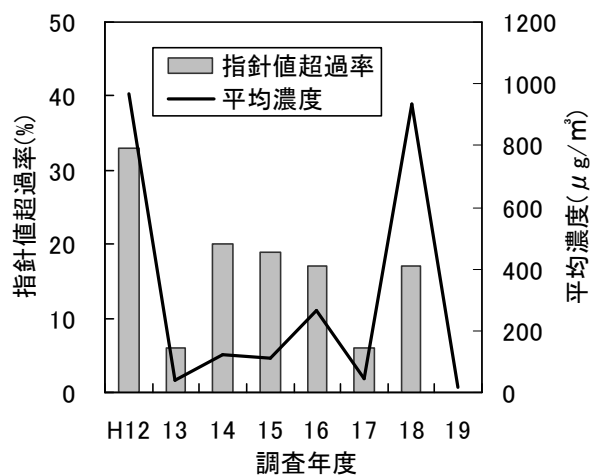


図5 パラジクロロベンゼン濃度の推移

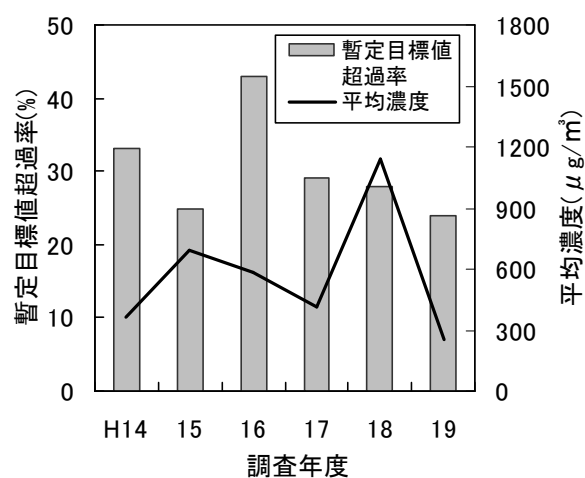


図6 TVOC濃度の推移

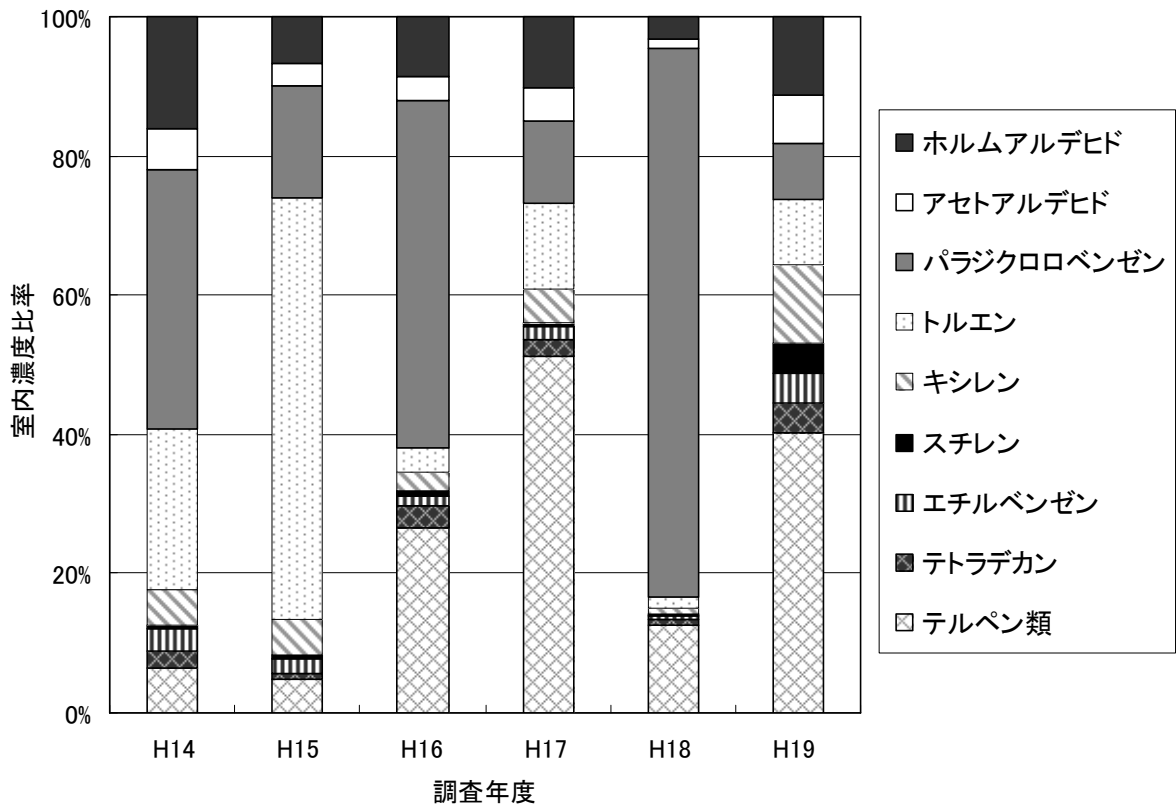


図7 主な物質の年度別室内濃度比率

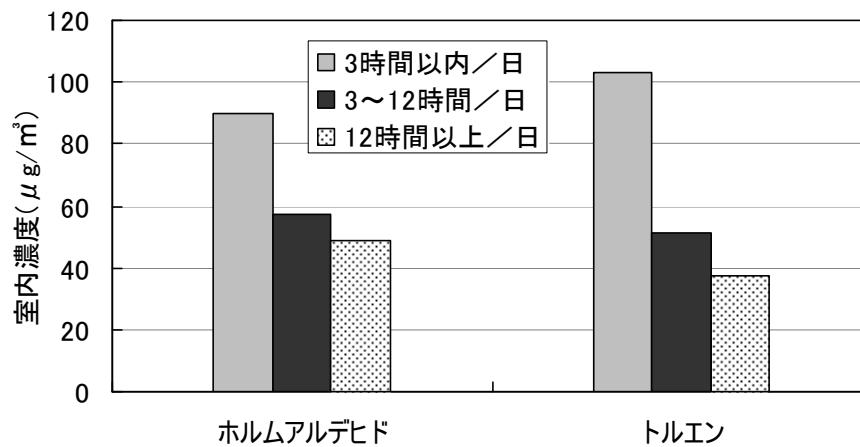


図8 換気時間とホルムアルデヒド及びトルエンの室内濃度

後の生活習慣や住まい方に要因があると考えられた。

室内濃度指針値が定められた8物質では、指針値を目標とした建材や換気の改善によって超過する住宅が減少する一方で、TVOC濃度の減少傾向は一向に認められず、その暫定目標値超過割合は、平成14年度以降3割程度で推移している。また、一般住宅内で主要な物質をその室内濃度比率で見ると、平成14年度からの結果では、パラジクロロベンゼン、トルエン、テルペン類(α

-ピネン+リモネン)の占める割合が多く、なかでもテルペン類は、平成16年度から濃度比率が高くなっている。テルペン類は、マツやヒノキ、スギ等の針葉樹に多く含まれる天然の精油成分で、それぞれ特有の芳香を持つことから、近年、自然嗜好と相まって、これら日本古来の天然木材を好んで使用する傾向があることが考えられた。

結語

県民のシックハウスに対する関心が高

まる中で、本研究で得られた県内一般住宅におけるホルムアルデヒド等の調査結果は、パンフレット等作成時の基礎データとして利用し、住まい方の相談・普及啓発事業の推進に活用している。一方、室内濃度指針値が定められた物質以外のテルペン類に代表される新たな物質による室内汚染の実態が明らかになったことから、今後も調査対象及び項目を広げた一般住宅における実態調査を継続していく必要があると考えられる。

本研究の内容は、第 52 回生活と環境全国大会、事例研究発表会(平成 20 年 10 月 29 日)において垣添が報告した。

謝 辞

本研究は、平成 10 年度から 19 年度における愛知県健康快適・居住環境検討ワーキンググループ構成員の多大なご支援、ご協力により実施したことを記し、各保健所環境衛生関係者の方々に心より感謝申し上げます。

文 献

- 1) 室内空気質健康影響研究会 (厚生労働省健康局) : 室内空気質健康影響研究会報告書、2004
- 2) 岸玲子、西條泰明、田中正敏、圓藤陽子、長谷川友紀、斎藤育江、柴田英治、森本兼曩、河合俊夫、瀧川智子、吉村健清 : シックハウス症候群に関する相談と対策マニュアル, 厚生労働科学研究費補助金(地域健康危機管理研究事業)「シックハウス症候群の実態解明及び具体的対応方策に関する研究」(2008 年 3 月), 2008.
- 3) 宮島江里子, 相澤好治 : シックハウス症候群の概念整理と病態, 臨床免疫・アレルギー科, 46(2), 161-164, 2006.
- 4) Hodgson, M: Indoor environmental exposures and symptoms, Environmental Health Perspectives, 110, 663-667, 2002.
- 5) 厚生労働省 : 建築物における衛生的環境の確保に関する法律(昭和 45 年 4 月 14 日法律第 20 号), 最終改正 ; 平成 18 年 6 月 2 日法律第 50 号.
- 6) 池田耕一 : シックハウス症候群. 生活と環境 43, 24-33, 1998.
- 7) 愛知県衛生部 : 呼吸器系調査報告書(昭和 63 年度～平成 8 年度), 平成 10 年 3 月発行.
- 8) 室内空气中化学物質の室内濃度指針値及び標準的測定方法等について(通知)厚生労働省医薬局長通知, 平成 14 年 2 月 7 日, 医薬発第 0207002 号.
- 9) 近藤文雄、山崎貢、林留美子、木村隆、鳥居新平 : パッシブサンプリング法を用いた揮発性有機化合物の測定, 愛知県衛生研究所報, 57, 13-23, 2007.
- 10) 国土交通省 : 平成 14 年告示第 1112 号～第 1115 号, 平成 15 年告示第 273 号, 第 274 号.
- 11) 国土交通省 : 建築基準法施行令第 20 条の 5 号～ 9 号, 平成 15 年 7 月 1 日.

An indoor air quality research in private houses in Aichi prefecture from 1998 to 2007 by measuring formaldehyde, acetaldehyde and volatile organic compounds concentrations

Rumiko Hayashi, Hirokazu Kakizoe¹, Yutaka Takahashi¹, Hiroyuki Matsuoka¹, Hidetaka Nakashima¹, Yuka Kabashima, Michiyo Kojima, Eiichi Mikami

¹ Environmental Health Division, Health Office, Aichi Prefectural Department of Health and Public Welfare

An indoor air quality research project was performed in private houses in Aichi prefecture from 1998 to 2007 by measuring formaldehyde, acetaldehyde and volatile organic compounds (VOCs) concentrations. The average formaldehyde concentrations gradually decreased with the passing of the years. In newly houses whose construction is regulated according to the new requirements of the amended Building Standard Law on Sick House Issues, enforced on July 1, 2003, the formaldehyde concentrations did not exceed the Japanese Government's guideline value (GLV) of 100 $\mu\text{g}/\text{m}^3$. The average acetaldehyde concentrations similarly decreased although the rate exceeding the GLV (48 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) was constant (approximately 10%) during a ten-year period. Among the measured VOCs *p*-dichlorobenzene, toluene and terpenes were detected by high frequency and high concentration ratio. In about 30% houses, the sum of each VOC exceeded the current provisional guideline value for total VOC (400 $\mu\text{g}/\text{m}^3$). Further investigations are needed to evaluate the indoor air quality.

Key words: sick-house syndrome, formaldehyde, volatile organic compound

調 査 研 究

愛知県における一般住宅室内空気中の 窒素酸化物の実態調査について

椛島由佳、小島美千代、林 留美子、三上栄一

要 旨

愛知県内の一般住宅 (n=50) について、非暖房期と暖房期における室内、屋外空気中の NO₂、NO、NO_x 濃度及び室内状況調査を実施した。

NO₂、NO、NO_x 濃度は、室内、屋外いずれも暖房期が非暖房期に比べ有意に高かった ($p < 0.001$)。また、室内 (I) / 屋外 (O) 濃度比 (I/O 比) は、NO₂、NO、NO_x いずれも暖房期が非暖房期に比べ有意に高く ($p < 0.001$)、暖房期における窒素酸化物の発生源が室内であることが示唆された。

暖房器具使用状況及び種類別に室内 NO₂、NO、NO_x 濃度を比較した結果、「燃焼室内排気型使用」群は、「使用していない」、「燃焼室外排気型使用」、「燃焼型以外のみ使用」の3群に比べ、NO₂、NO、NO_x 濃度のいずれも有意に高く ($p < 0.001$)、NO₂ 濃度については、学校環境衛生基準 (0.06 ppm) を超過した住宅の 86% (19/22) を占めた。このことから、暖房期における NO₂、NO、NO_x による室内空気汚染は、燃焼系の室内排気型暖房器具の使用が主な原因であることが示唆された。

燃焼室内排気型暖房器具使用住宅における室内 NO₂、NO、NO_x 濃度を 24 時間換気の有無別に比較した結果、NO、NO_x 濃度については「24 時間換気あり」群が「24 時間換気なし」群に比べて有意に低かった ($p < 0.05$)。このことから、24 時間換気は、NO、NO_x 濃度の低減化に有効であると考えられた。

キーワード：室内空気、窒素酸化物、暖房器具、換気

はじめに

大気中には NO、NO₂、N₂O、NO₃、N₂O₃、N₂O₄、N₂O₅ の 7 種類の窒素酸化物が存在する。このうち NO、NO₂ は下層対流圏で最も高濃度に存在し、2 種類を合わせて NO_x と総称さ

れる場合が多い¹⁾。NO_x の大部分は、燃焼時に空気中の窒素と酸素が反応して生成する。最初に NO の形で生成し、空気中で酸化されて NO₂ となる。また、居住室内において、燃焼に伴い発生する NO₂ は、呼吸器疾

患やアレルギー発症に関連する¹⁾ことから有害な化学物質である^{2),3)}。世界保健機関(WHO)欧州事務局は、室内空気質管理に関するガイドラインの作成に着手し⁴⁾、その中でNO₂は、個別な対策、すなわちガイドラインの作成が必要な化学物質(グループ1)に選定されている。我が国では、児童等の健康を考慮し、改正学校保健安全法⁵⁾に基づいた学校環境衛生基準⁶⁾が平成21年4月1日から施行され、教室内のNO₂濃度は「0.06 ppm 以下であることが望ましい」と定められた。一方、NO₂についての室内濃度指針値等は設定されていない。愛知県では、季節によって変化する居住者の住まい方(主に暖房器具の使用や換気行為)による室内空気中の窒素酸化物の実態を明らかにするために、平成20年度から同一住宅で非暖房期と暖房期の年2回の実態調査を実施している。そこで、平成21年度までの2年間の調査結果について、非暖房期と暖房期におけるNO₂、NO、NO_xの濃度比較、室内空気中窒素酸化物の増加及び低減化要因について検討を行ったので報告する。

方 法

1. 調査対象及び調査時期

愛知県内 50 住宅の居間及び屋外を対象に、平成20年度、21年度の非暖房期(9月下旬～10月)及び暖房期(12月～1月)に調査を実施した。

2. 測定項目

NO₂、NO、NO_x

3. 試料捕集方法

室内は部屋の中央付近の床から約 1.2 m の高さ、屋外は軒下等の地面から約 1.2 m の高さに捕集用フィルター(NO₂、NO_x 同時測定用サンプラー、小川商会)を24時間設置し、パッシブサンプリング法により捕集した。

4. 室内状況調査

居間平面図、暖房器具の種類、設置場所及び使用状況、換気設備の有無及び使用状況等

5. 試薬

スルファニル酸及び N-1-ナフチルエチレンジアミン二塩酸塩は和光純薬工業製窒素酸化物測定用、リン酸及び亜硝酸ナトリウムは和光純薬工業製特級、ジエチルエーテルは関東化学製残留農薬・PCB 試験用を使用した。

反応に用いるスルファニル溶液は、スルファニル酸 5 g をリン酸 50 mL と蒸留水約 700 mL を混合した溶液に溶かし、さらに蒸留水を加えて 1000 mL とした。N-1-ナフチルエチレンジアミン二塩酸塩溶液は N-1-ナフチルエチレンジアミン二塩酸塩 0.2 g を蒸留水に溶解して 100 mL とした。

NO₂ 標準原液は、亜硝酸ナトリウム 0.75 g を量り、蒸留水に溶かし、正確に 500 mL とし 1 mg/mL とした。これをスルファニル溶液で適宜希釈して、0.05、0.1、0.2、0.4 μg/mL の標準溶液を調製した。

6. 分析方法

捕集後のフィルターから NO₂、NO_x 捕集用ろ紙を取り出し、それぞれ試験管に入れ、スルファニル溶液 8 mL を加え、室温で 30 分間放置し溶出した。その後、NO_x 捕集用ろ紙については、ジエチルエーテル 2 mL を加え激しく混和し、発色反応妨害成分を含むジエチルエーテル層除去操作を2回繰り返した。溶出液を 10℃、3,000 回転/分、10 分間遠心分離した後、水層 3.8 mL を試験管に分取し、N-1-ナフチルエチレンジアミン二塩酸塩溶液を 0.2 mL 加え、4℃で30分間発色反応させた後、分光光度計(日立製作所製 U3010)を用いて波長 545 nm で吸光度を測定した。

7. 温度及び湿度の測定

最低最高温湿度計(CUSTOM CTH-202)により、調査室内及び屋外の温度、湿度を測定

した。パッシブサンプラーの設置時、回収時、捕集中の最高値、最低値の4つの温度、湿度の平均値をそれぞれ求め、NO₂、NO濃度の算出に用いた。

8. NO₂、NO、NO_x濃度

平野らの方法⁷⁾に従って、NO₂、NO濃度(ppm)を算出し、その合計値をNO_x濃度とした。また、定量下限値は0.003 ppmとした。

9. 統計解析

SPSS Statistics ver. 17.0を用い、検定は、McNemarカイ2乗検定、WilcoxonT検定、Kruskal-Wallis検定、Mann-WhitneyのU検定により行った。

結果及び考察

1. NO₂、NO、NO_xの調査結果(表1)

(1) 検出状況

非暖房期、暖房期における室内、屋外空气中的NO₂、NO、NO_x検出率は、非暖房期の室内NOを除き、いずれも95%以上であった。また、暖房期の室内NO検出率は98%と、非暖房期の62%に比べて有意に高く(p

< 0.001)、暖房器具の使用によることが考えられた。

(2) 濃度

室内及び屋外のNO₂、NO、NO_x濃度は、いずれも暖房期が非暖房期に比べ有意に高かった(p < 0.001)。発生源の目安となるI/O比は、非暖房期には、NO₂; 中央値0.96(範囲0.35~1.7)、NO; 0.57(0.083~13)、NO_x; 0.85(0.25~4.2)、暖房期にはNO₂; 1.4(0.21~19)、NO; 5.4(0.42~42)、NO_x; 2.6(0.32~28)となり、いずれも暖房期が非暖房期に比べて有意に高く(p < 0.001)、暖房期における窒素酸化物の発生源が室内であることが示唆された。

(3) 学校環境衛生基準による判定

学校環境衛生基準0.06 ppmに照らして室内NO₂濃度を判定した場合、非暖房期には基準を超過した住宅はなかったが、暖房期には22住宅(44%)が超過していた。このうち19住宅では石油及びガスファンヒーター等の燃焼室内排気型暖房器具を使用しており、これが超過の要因と考えられた。

表1 NO₂、NO、NO_xの調査結果

項目	調査時期	検出住宅		濃度 (ppm)			I/O比 (中央値)	参考 基準値等 (ppm)	超過 度数	
		度数	(%)	最小	最大	中央値				
室内	NO ₂	非暖房期	48	96	N. D.*	0.039	0.013	0.96	0	
		暖房期	50	100	0.004	0.300	0.028	1.4	22	
	NO	非暖房期	31	62	N. D.	0.059	0.005	0.57	—	
		暖房期	49	98	N. D.	0.980	0.071	5.4	—	
	NO _x	非暖房期	50	100	0.003	0.084	0.019	0.85	—	
		暖房期	50	100	0.009	1.280	0.110	2.6	—	
屋外	NO ₂	非暖房期	49	98	N. D.	0.003	0.014	—	0.06***	0
		暖房期	50	100	0.006	0.039	0.025	—	—	0
	NO	非暖房期	49	98	N. D.	0.023	0.009	—	—	—
		暖房期	50	100	0.004	0.048	0.016	—	—	—
	NO _x	非暖房期	50	100	0.004	0.053	0.023	—	—	—
		暖房期	50	100	0.012	0.079	0.040	—	—	—

* N. D. < 0.003 ppm ** 学校環境衛生基準 *** 大気環境基準上限値

残り3住宅の暖房器具使用状況については、2住宅は暖房器具を使用しておらず、1住宅はエアコンを使用していた(表2)。これらの3住宅はいずれも調理器具としてガスを使用していたことから、燃焼室内排気型暖房器具を使用していない場合でもガス調理器具や給湯器等のガス器具使用により、NO₂濃度が基準を超過することが明らかとなった。

2. 暖房期における測定中の暖房器具使用状況及び種類による室内NO₂、NO、NO_x濃度(表3)

50住宅の暖房器具使用状況及び種類別の内訳は①「使用していない」が6件、②「燃焼室内排気型(石油及びガスファンヒーター等)使用」が20件、③「燃焼室外排気型(FF式ファンヒーター等)使用」が2件、④「燃焼型以外(電気ストーブ、エアコン、床暖房等)のみ使用」が22件であった。

各群における室内NO₂、NO、NO_x濃度は以下のとおりであった。

室内NO₂濃度(ppm): ①中央値0.037(範囲0.004~0.071)、②0.150(0.034~0.300)、③0.011(0.007~0.014)、④0.015(0.005~0.120)

室内NO濃度(ppm): ①0.039(0.007~0.120)、②0.290(0.017~0.980)、③0.017(0.009~0.025)、④0.028(N.D.~0.320)

室内NO_x濃度(ppm): ①0.085(0.013~0.190)、②0.430(0.051~1.280)、③0.028(0.017~0.039)、④0.044(0.009~0.440)

各群の室内NO₂、NO、NO_x濃度を比較した結果、いずれも②群が①、③、④群に比べ有意に高かった($p < 0.001$)。このことから、暖房期に室内NO₂、NO、NO_x濃度が高くなるのは、燃焼系の室内排気型暖房器具の使用によると考えられた。

3. 燃焼室内排気型暖房器具使用住宅にお

表2 学校環境衛生基準超過住宅の詳細

超過 度数	暖房器具使用状況 種類別	室内NO ₂ 濃度(ppm)		
		最小	最大	中央値
19	使用	0.087	0.300	0.150
	燃焼室内排気型			
2	使用していない	0.069	0.071	-
	-			
1	使用	0.120		-
	燃焼型以外(エアコン)			

ける室内NO₂、NO、NO_x濃度の低減化要因

燃焼室内排気型暖房器具を使用した20住宅について、暖房使用時間と室内NO₂、NO濃度の散布図を図1に示した。20住宅のうち4住宅は、測定中24時間機械換気設備を常時作動させ、1住宅は欄窓による24時間自然換気を行っていた。これら24時間換気が行われていた5住宅を「換気あり」群、換気がほとんど行われていなかった15住宅(24時間機械換気設備を有していたが、作動させていなかった2住宅を含む)を「換気なし」群として、2群の室内NO₂、NO、NO_x濃度(表3)を比較した。その結果、室内NO₂濃度(ppm)では、「換気あり」群:中央値0.130(範囲0.034~0.190)の方が、「換気なし」群:0.150(0.087~0.300)より低値であったが、有意差は認められなかった。一方、室内NO濃度(ppm)は「換気あり」群:0.220(0.017~0.270)、「換気なし」群:0.350(0.190~0.980)、NO_x濃度(ppm)は「換気あり」群:0.340(0.051~0.450)、「換気なし」群:0.560(0.330~1.280)であり、いずれも「換気あり」群が「換気なし」群に比べて有意に低かった($p < 0.05$)。また、暖房器具使用時間は、「換気あり」群:中央値9.0(範囲5.0~16.0)、「換気なし」群:7.3(3.0~16.0)であり、両者に有意差は認められなかった。これらの結果から、「換気

表3 暖房期における測定中の暖房器具使用状況及び種類による室内NO₂、NO、NO_x濃度

暖房器具使用状況 種類別 内訳	度数 (内訳)	室内濃度 (ppm)								
		NO ₂			NO			NO _x		
		最小	最大	中央値	最小	最大	中央値	最小	最大	中央値
①使用していない	6	0.004	0.071	0.037	0.007	0.120	0.039	0.013	0.190	0.085
②使用 燃焼室内排気型	20	0.034	0.300	0.150	0.017	0.980	0.290	0.051	1.280	0.430
24時間換気あり	(5)	0.034	0.190	0.130	0.017	0.270	0.220	0.051	0.450	0.340
24時間換気なし	(15)	0.087	0.300	0.150	0.190	0.980	0.350	0.330	1.280	0.560
③使用 燃焼室外排気型	2	0.007	0.014	0.011	0.009	0.025	0.017	0.017	0.039	0.028
④使用 燃焼型以外	22	0.005	0.120	0.015	N.D.*	0.320	0.028	0.009	0.440	0.044

* N.D. < 0.003 ppm

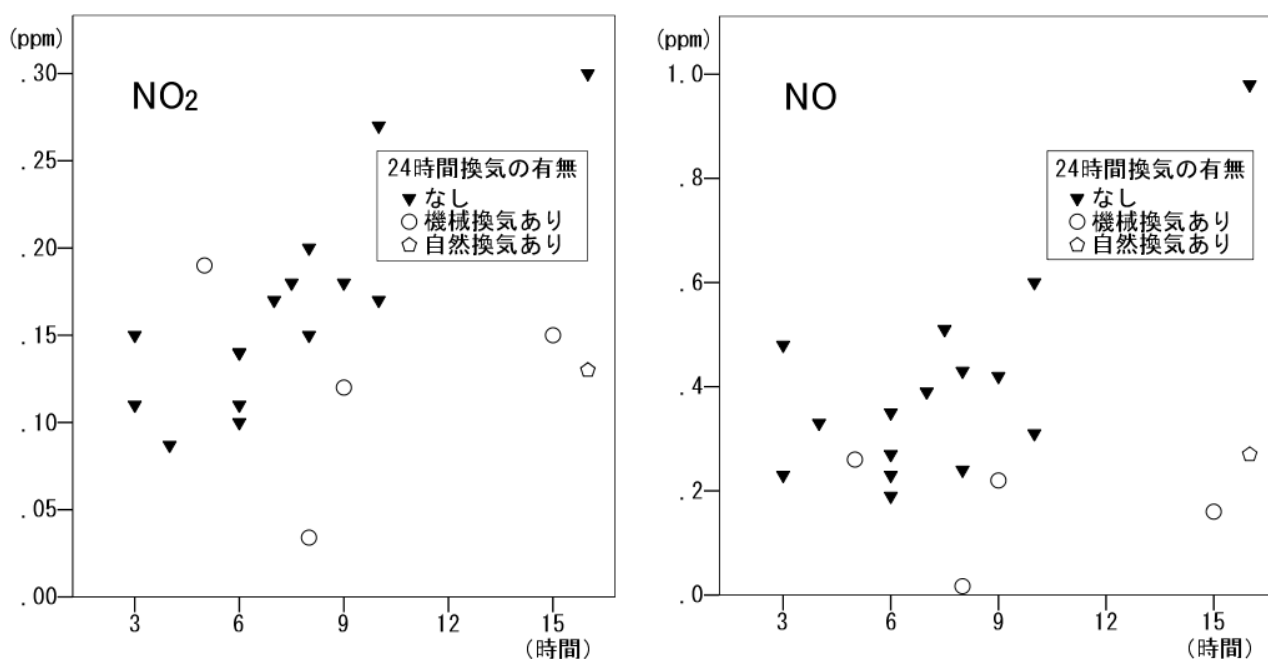


図1 暖房使用時間と室内NO₂、NO濃度

あり」群では、使用時間が長いにもかかわらず、NO、NO_x濃度は有意に低かったことから、24時間換気は、NO、NO_x濃度の低減化に有効であることが示唆された。

結 語

建築材料等から放散されるホルムアル

デヒド等の化学物質により、居住者に健康被害を引き起こすシックハウス症候群が1990年代後半に社会問題となった。この対策として、厚生労働省は、ホルムアルデヒド、トルエン等13物質の室内濃度指針値を設定し⁸⁾、国土交通省は建築基準法を改正し⁹⁾、建材等から放散される化学物質の低

減化対策が進められてきた。しかし、室内空気汚染の成因は、建材等だけでなく、暖房、換気など居住者の住まい方も関係する^{10), 11)}。また、愛知県内の一般住宅では燃焼室内排気型暖房器具の使用率が依然として高い¹²⁾。これには、気候条件が関連し、北海道のように冬季には常時暖房が必要な地域では、室外排気型の燃焼暖房器具が普及している。一方、本県では寒いと感じた時に暖房するため、すぐに暖まり、移動が可能な室内排気型暖房器具の使用が多いことが考えられる。そのため本県では、燃焼室内排気型暖房器具及びガス調理器具等の使用時には、第一に十分な換気を行い、室内排気型暖房器具の使用を控える等の啓発を行う必要がある。

また、改正建築基準法⁹⁾によって、平成15年以降の新築住宅には24時間機械換気の設置が義務づけられたが、常時作動させていない、暖房期になると作動を停止する、清掃等の管理がされていない住宅が見受けられ、機械換気の常時使用及び維持管理に関する指導を行う必要がある。また、欄窓による24時間自然換気によっても窒素酸化物濃度の低減化効果が認められており、これは、住宅建築の参考になる事例と考えられる。

最後に、今後も県内一般住宅における室内空気中の様々な化学物質についてデータを蓄積し、その結果を居住者の住まい方への提言として還元できるような実態調査を継続することが必要と考えられる。また、NO₂の室内濃度指針値設定といった法的な対策も期待される。

謝 辞

本調査は、愛知県健康・快適居住環境確保対策事業の一環として実施された「室内汚染実態調査」において行われた。

文 献

- 1) 室内空気質健康影響研究会(厚生労働省健康局): 室内空気質健康影響研究会報告書, 2004.
- 2) 財団法人日本環境衛生センター(環境省大気保全局委託業務結果報告書): 窒素酸化物個人暴露量等調査(文献調査), 1989.
- 3) 林 留美子, 早川清子, 石川直久, 伊藤正夫, 寺尾允宏: 学童の非暖房期、暖房期における NO₂ 暴露状況について, 愛知県衛生研究所報 40, 27-34, 1990.
- 4) WHO Europe: Development of WHO guidelines for indoor air quality ; report on a working group meeting. Bonn, Germany, 23-24 October, 2006.
- 5) 平成20年6月18日, 法律第73号, 2008.
- 6) 平成21年3月31日、文部科学省告示第60号, 2009.
- 7) 横浜市環境科学研究所: 短期暴露用拡散型サンプラーを用いた環境大気中の NO、NO₂、SO₂、O₃ および NH₃ 濃度の測定方法(平成22年3月改訂版, 2011年1月5日現在); <http://www.city.yokohama.lg.jp/kankyomamoru/kenkyu/shiryo/pub/d0001/d0001.pdf>
- 8) 平成14年2月7日、厚生労働省通知医薬発第0207002号: 室内空気中化学物質の室内濃度指針値及び標準的測定方法等について, 2002.
- 9) 平成14年7月12日, 法律第85号, 2002.
- 10) 東 賢一、内山巖雄: 室内環境汚染と健康リスク, 公衆衛生 74(4), 289-299, 2010.
- 11) 小林 浩, 堀内雅人: 山梨県の室内環境中化学物質の実態調査, 山梨県衛生公害研究所年報 50, 1-4, 2006.
- 12) 愛知県衛生部: 呼吸器系調査報告書(昭和63年度~平成8年度), 1998.

Nitrogen oxide concentrations in indoor air in Aichi prefecture

Yuka Kabashima, Michiyo Kojima, Rumiko Hayashi, Eiichi Mikami

We investigated NO₂, NO and NO_x concentrations in the indoor and outdoor air of fifty general houses in Aichi prefecture during the un-heating and heating periods. During the heating period, NO₂, NO and NO_x concentrations in the indoor and outdoor air were significantly higher than those during the un-heating period. The ratios of indoor concentration (I) to outdoor concentration (O) (I/O ratios) of NO₂, NO and NO_x during the heating period were larger than those during the un-heating period. According to the presence or type of heating instruments in use, NO₂, NO and NO_x concentrations obtained from the group of "combustion of indoor-exhaust-type in use" were significantly higher than those levels obtained from three other groups of "not in use", "combustion of outdoor-exhaust-type in use", and "only excluding the combustion type in use". As for the NO₂ concentration, 86% (19/22) of the houses that exceeded the School Environmental Hygiene Standard (0.06 ppm) in Japan belonged to the "combustion of indoor-exhaust-type in use" group. It was suggested that the use of the indoor-exhaust-type of combustible heating instrument be a major cause of indoor air pollution by NO₂, NO and NO_x. Furthermore, NO₂, NO and NO_x concentrations within the group of "indoor-exhaust-type in use" were compared between with and without ventilation for 24 hours. NO and NO_x levels obtained from the group of "ventilated for 24 hours" were significantly lower than the group of "not ventilated for 24 hours". Ventilation for 24 hours was effective for decreasing NO and NO_x concentrations.

Key words : indoor air, nitrogen oxide, NO_x, heating instrument, ventilation

 他誌掲載論文抄録

Association between dietary calcium and vitamin D intake and cervical carcinogenesis among Japanese women

Satoyo Hosono¹, Keitaro Matsuo¹, Hiroaki Kajiyama², Kaoru Hirose, Takeshi Suzuki¹, Takakazu Kawase¹, Kumiko Kidokoro¹, Toru Nakanishi³, Nobuyuki Hamajima⁴, Fumitaka Kikkawa², Kazuo Tajima⁵, Hideo Tanaka¹

¹Division of Epidemiology and Prevention, Aichi Cancer Center Research Institute, ²Department of Gynecology and Obstetrics, Nagoya University Graduate School of Medicine, ³Department of Gynecologic Oncology, Aichi Cancer Center Hospital, ⁴Department of Prevention Medicine/Biostatistics and Medical Decision Making, Nagoya University Graduate School of Medicine, ⁵Aichi Cancer Center Research Institute
 European Journal of Clinical Nutrition 64(4): 400-409, 2010

To examine the association between dietary calcium and vitamin D intake and cervical neoplasia risk, a case-control study was conducted. We selected 405 incident cervical neoplasias and 2025 age-matched non-cancer controls. The effect on cervical neoplasia risk was evaluated using conditional logistic regression models. Compared with the lowest quartile of

calcium intake, adjusted odds ratio of the highest quartile on invasive carcinoma risk was 0.68 (95%CI: 0.48-0.97). Vitamin D intake showed a similar inverse association. We found an inverse association between dietary calcium and vitamin D intake and cervical neoplasia risk among a group of Japanese women.

HLA-A alleles and cervical squamous cell carcinoma risk in Japanese women

Satoyo Hosono¹, Takakazu Kawase¹, Keitaro Matsuo¹, Miki Watanabe¹, Hiroaki Kajiyama², Kaoru Hirose, Takeshi Suzuki³, Kumiko Kidokoro², Hidemi Ito¹, Toru Nakanishi⁴, Yasushi Yatabe⁵, Nobuyuki Hamajima⁶, Fumitaka Kikkawa², Kazuo Tajima⁷, Hideo Tanaka¹

¹Division of Epidemiology and Prevention, Aichi Cancer Center Research Institute, ²Department of Gynecology and Obstetrics, Nagoya University Graduate School of Medicine, ³Department of Medical Oncology and Immunology, Naogya City University Graduate School of Medical Science, ⁴Department of Gynecologic Oncology, Aichi Cancer Center Hospital, ⁵Department of Molecular Diagnosis, Aichi Cancer Center Hospital, ⁶Department of

Prevention Medicine/Biostatistics and Medical Decision Making, Nagoya University Graduate School of Medicine, ⁷Aichi Cancer Center Research Institute
Journal of Epidemiology 20(4): 295-301, 2010

We conducted a case-control study to examine the relationship between human leukocyte antigen-A (HLA-A) allele polymorphism and the pathogenesis of cervical neoplasia among Japanese women. A total of 119 patients with invasive cervical squamous cell carcinoma were compared to 119 age- and menopausal status-matched non-cancer controls. The estimated impact of HLA-A alleles on cervical cancer risk was

evaluated by unconditional logistic regression models. After correction for multiple comparisons, A*0206 was significantly associated with reduced cervical cancer risk. There was an inverse association between HLA-A*0206 and cervical cancer risk among Japanese women, which suggests that HLA-A polymorphism influences cervical cancer risk.

Association between vitamin D and calcium intake and breast cancer risk according to menopausal status and receptor status in Japan

Takakazu Kawase¹, Keitaro Matsuo¹, Takeshi Suzuki², Kaoru Hirose, Satoyo Hosono¹, Miki Watanabe¹, Masaki Inagaki³, Hiroji Iwata⁴, Hideo Tanaka¹, Kazuo Tajima⁵

¹Division of Epidemiology and Prevention, Aichi Cancer Center Research Institute, ²Department of Medical Oncology and Immunology, Nagoya City University Graduate School of Medical Science, ³Division of Biochemistry, Aichi Cancer Center Research Institute, ⁴Department of Breast Oncology, Aichi Cancer Center Hospital, ⁵Aichi Cancer Center Research Institute
Cancer Science 101(5): 1234-1240, 2010

Although several studies have investigated the possible association between elevated vitamin D and calcium intake and low breast cancer risk, findings have been inconsistent. We conducted a case-control study to clarify the association between vitamin D and calcium intake and breast cancer risk among pre- and postmenopausal women in Japan. We examined 1803 breast cancer patients and 3606 age- and menopausal status-matched non-cancer control. A significant inverse association was observed between vitamin D

and calcium intake and breast cancer risk. In analyses stratified by menopausal status, a significant association between risk and vitamin D was only among premenopausal women, whereas that between risk and calcium intake was seen only among postmenopausal women. This association was modified by tumor receptor status. These findings suggest that the protective effects of vitamin D and calcium intake against breast cancer risk may differ by menopausal status and receptor status.

愛知県の高齢者入所施設におけるインフルエンザワクチンの接種状況に関する調査研究

広瀬かおる、鈴木幹三¹、鷲尾昌一²

¹名古屋市緑保健所、²聖マリア学院大学

臨床と研究 87(5): 702-706, 2010

施設入所高齢者は閉鎖的な環境で密接な集団生活を営むため、施設内にインフルエンザウイルスが持ち込まれると集団発生する可能性があり、その予防対策は重要である。そこで、愛知県内の高齢者入所施設（646施設）を対象として入所者のインフルエンザワクチン接種状況などの調査を実施した。対象施設の72.6%から回答が得られ、389施設（84.0%）で入所者の90%以上にインフルエンザワクチン接種を行っていた。また、399施設（86.2%）において看護・介護職員のインフルエンザワクチン接種率が90%以上であり、54.0%の施設でその費用を施設が全額補助していた。職員にインフルエンザ様罹患が認められた施設は44.4%であったのに対し、入所者に罹患が認められた施設は14.5%に抑えられており、施設における感染症対策が普及し効果が認められた結果と推察される。

施設入所高齢者は閉鎖的な環境で密接な集団生活を営むため、施設内にインフルエンザウイルスが持ち込まれると集団発生する可能性があり、その予防対策は重要である。そこで、愛知県内の高齢者入所施設（646施設）を対象として入所者のインフルエンザワクチン接種状況などの調査を実施した。対象施設の72.6%から回答が得られ、389施設（84.0%）で入所者の90%以上にインフルエンザワクチン接種を行っていた。また、399施設（86.2%）において看護・介護職員のインフルエンザワクチン接種率が90%以上であり、54.0%の施設でその費用を施設が全額補助していた。職員にインフルエンザ様罹患が認められた施設は44.4%であったのに対し、入所者に罹患が認められた施設は14.5%に抑えられており、施設における感染症対策が普及し効果が認められた結果と推察される。

愛知県におけるスギ・ヒノキ科花粉の2009年飛散結果と2010年飛散予測について

竹島雅之、續木雅子、広瀬かおる、判治岳史

東海花粉症研究会誌 21: 7-14, 2010

愛知県花粉情報システムにおいて名古屋、一宮、刈谷、豊川、設楽の5か所の観測定点でスギ・ヒノキ科花粉飛散数の測定を実施したところ、愛知県全体の2009年総飛散数は88,473個/cm²と1989年以降の21年で3番目に多い飛散数であり、前年(13,850個/cm²)の6.4倍、過去21年の幾何平均27,827個/cm²の3.2倍であった。これは、前年に推定した予測総飛散数43,800個/cm²の2.0倍であり、尾張部(名古屋、一宮)、西三河平野部(刈谷)、東三河平野部(豊川)及び三河山間部(設楽)の全ての地域で実測飛散数が予測飛散数を上回った。2000年から

行っている長期予測の予測値と翌年の実測値から求まる回帰式・寄与率はそれぞれ $y=1.238x-6992.8$ 、 $r^2=0.9332$ であり、高い相関を示し9年を通して概ね良好な予測であったと考えられる。

2010年の予測飛散数は愛知県全体で38,300個/cm²と過去21年の実測飛散数の幾何平均27,827個/cm²の1.4倍であると予測した。地域別では尾張部、東三河平野部及び三河山間部において2009年の飛散数より減少し、西三河平野部では2009年の飛散数と同程度であると予測した。

Molecular identification of enteroviruses including two new types (EV-98 and EV-107) isolated from Japanese travelers from Asian countries

Teruo Yamashita, Miyabi Ito, Hideaki Tsuzuki, Kenji Sakae, Hiroko Minagawa

Journal of General Virology 91(4): 1063-1066, 2010

Of 58 enterovirus strains isolated from Japanese travellers returning from Asian countries, eight were non-serotypable with existing antisera. By sequencing a part of the VP1 region, six of these strains were typed as echovirus 9, enterovirus (EV)-73, EV-79 or EV-97. The nucleotide identity of the VP1 region of isolate T92-1499 to all enterovirus prototypes was <70 %. The VP1 sequence of isolate TN94-0349 was closely related to coxsackievirus (CV)-A9 (73.3 % nucleotide identity), but the virus could not be neutralized with a serum raised against

the prototype CV-A9 strain. On the basis of complete molecular comparisons, T92-1499 and TN94-0349 were identified as EV-98 and EV-107, respectively, by the ICTV Picornavirus Study Group. Serum neutralization tests of Japanese individuals revealed a seroprevalence rate of 11 % for EV-73, and even lower seroprevalence rates, 1.0–3.8 %, were found for the other new enteroviruses, suggesting that prior circulation of these viruses in Japan was unlikely.

Detection of Human Parechoviruses from clinical stool samples in Aichi, Japan

Miyabi Ito, Teruo Yamashita, Hideaki Tsuzuki, Yuka Kabashima, Akiko Hasegawa, Satoko Nagaya, Mariko Kawaguchi, Shinichi Kobayashi, Akira Fujiura, Kenji Sakae, Hiroko Minagawa
Journal of Clinical Microbiology 48(8): 2683-2688, 2010

Between April 1999 and March 2008, a total of 4,976 stool specimens collected from patients with suspected viral infection through infectious agent surveillance in Aichi, Japan, were tested for the presence of human parechoviruses (HPeVs). We detected HPeVs in 110 samples by either cell culture, reverse transcriptase PCR (RT-PCR), or both. Serotyping either by neutralization test or by nucleotide sequence determination and phylogenetic analysis of the VP1 region and 5'untranslated region (5'UTR) regions revealed that 63 were HPeV type 1 (HPeV-1), followed by 44 HPeV-3 strains, 2 HPeV-4 strains, and 1 HPeV-6 strain. The high nucleotide and amino acid sequence identities of the Japanese HPeV-3 isolates in 2006 to the strains previously

reported from Canada and Netherlands confirmed the worldwide prevalence of HPeV-3 infection. Ninety-seven percent of the HPeV-positive patients were younger than 3 years, and 86.2 % younger than 12 months. The clinical diagnoses of HPeV-positive patients were gastroenteritis, respiratory illness, febrile illness, exanthema, "hand, foot and mouth disease", aseptic meningitis, and herpangina. Among 49 HPeV-positive patients with gastroenteritis, 35 were positive with HPeV-1 and 12 with HPeV-3, and out of 25 with respiratory illness, 11 were positive with HPeV-1 and 14 with HPeV-3. HPeV-3 seemed to be an important etiological agent of respiratory infection of children. While HPeV-1 was detected predominantly during

fall and winter, the majority of the HPeV-3 cases were detected during summer and fall. A different pattern of clinical manifestations

as well as seasonality suggested that there are different mechanisms of pathogenesis between HPeV-1 and HPeV-3 infections.

神経系感染症の特徴 日和見感染の機序

皆川洋子

Clinical Neuroscience 28(3): 260-262, 2010

単純ヘルペスウイルスの属するアルファヘルペスウイルスの潜伏感染及び再活性化メカニズムについて、宿主免疫機構とウイルスの相

互作用を中心に概説し、ウイルス再活性化を伴う日和見感染とその制御について述べた。

狂牛病

皆川洋子

治療 92(12): 2651-2656, 2010

狂牛病プリオン感染に伴うヒトプリオン病(変異型クロイツフェルト・ヤコブ病 vCJD)の

推定感染経路や vCJD 発生がもたらしたプリオン病対応等への影響について述べた。

Divergent evolution of Norovirus GII/4 by genome recombination from May 2006 to February 2009 in Japan

Kazushi Motomura¹, Masaru Yokoyama¹, Hirotaka Ode¹, Hiromi Nakamura¹, Hiromi Mori¹, Tadahito Kanda¹, Tomoichiro Oka¹, Kazuhiko Katayama¹, Mamoru Noda², Tomoyuki Tanaka³, Naokazu Takeda¹, Hironori Sato¹, Shima Yoshizumi⁴, Toshiyuki Mikami⁴, Hiroyuki Saito⁴, You Ueki⁴, Akemi Takahashi⁴, Tetuo Hebiguchi⁴, Kuniko Shinozaki⁴, Tetsuya Yoshida⁴, Tsutomu Tamura⁴, Takenori Takizawa⁴, Miho Toho⁴, Shinichi Kobayashi⁴, Kiyoko Uchino⁴, Nobuhiro Iritani⁴, Setsuko Iizuka⁴, Fumiaki Itoh⁴, Shinji Fukuda⁴, Reiko Kondo⁴, Yasutaka Yamashita⁴, Sadayuki Funatsumaru⁴, Yumiko Matsuoka⁴, Akira Iwakiri⁴.

¹National Institute of Infectious Diseases, ²National Institute of Health Sciences, ³Sakai City Institute of Public Health, ⁴the Norovirus Surveillance Group of Japan

Journal of Virology 84(16): 8085-8097, 2010

Norovirus GII/4 is a leading cause of acute viral gastroenteritis in humans. We examined here how the GII/4 virus evolves

to generate and sustain new epidemics in humans, using 199 near-full-length GII/4 genome sequences and 11 genome segment

clones from human stool specimens collected at 19 sites in Japan between May 2006 and February 2009. Phylogenetic studies demonstrated outbreaks of 7 monophyletic GII/4 subtypes, among which a single subtype, termed 2006b, had continually predominated. Phylogenetic-tree, boot scanning plot, and informative-site analyses revealed that 4 of the 7 GII/4 subtypes were mosaics of recently prevalent GII/4 subtypes and 1 was made up of the GII/4 and GII/12 genotypes. Notably, single putative recombination breakpoints with the highest statistical significance were constantly located around the border of open reading frame 1 (ORF1) and ORF2 ($P < 0.000001$), suggesting outgrowth of specific

recombinant viruses in the outbreaks. The GII/4 subtypes had many unique amino acids at the time of their outbreaks, especially in the N-term, 3A-like, and capsid proteins. Unique amino acids in the capsids were preferentially positioned on the outer surface loops of the protruding P2 domain and more abundant in the dominant subtypes. These findings suggest that intersubtype genome recombination at the ORF1/2 boundary region is a common mechanism that realizes independent and concurrent changes on the virion surface and in viral replication proteins for the persistence of norovirus GII/4 in human populations.

Oseltamivir-resistant influenza viruses A (H1N1) during 2007-2009 influenza Seasons, Japan

Makoto Ujike¹, Kozue Shimabukuro¹, Kiku Mochizuki¹, Masatsugu Obuchi¹, Tsutomu Kageyama¹, Masayuki Shirakura¹, Noriko Kishida¹, Kazuyo Yamashita¹, Hiroshi Horikawa², Yumiko Kato², Nobuyuki Fujita², Masato Tashiro¹, Takato Odagiri¹, the Working Group for Influenza Virus Surveillance in Japan (including Mami Hata)

¹National Institute of Infectious Diseases, ²National Institute of Technology and Evaluation
Emerging Infectious Diseases 16(6): 926-934, 2010

To monitor oseltamivir-resistant influenza viruses A(H1N1) (ORVs) with H275Y in neuraminidase (NA) in Japan during 2 influenza seasons, we analyzed 3,216 clinical samples by NA sequencing and/or NA inhibition assay. The total frequency of ORVs was 2.6% (45/1,734) during the 2007–08 season and 99.7% (1,477/1,482) during the 2008–09 season, indicating a marked increase in ORVs in Japan during 1 influenza season. The NA gene of ORVs in the 2007–08 season fell into 2 distinct lineages by D354G

substitution, whereas that of ORVs in the 2008–09 season fell into 1 lineage. NA inhibition assay and M2 sequencing showed that almost all the ORVs were sensitive to zanamivir and amantadine. The hemagglutination inhibition test showed that ORVs were antigenetically similar to the 2008–09 vaccine strain A/Brisbane/59/2007. Our data indicate that the current vaccine or zanamivir and amantadine are effective against recent ORVs, but continuous surveillance remains necessary.

アデノウイルス41型による感染性胃腸炎の一乳幼児施設内流行

志水哲也¹、志水麻実子¹、皆川洋子、山下照夫

小児科診療 73(4):668-672, 2010

¹志水こどもクリニック

腸管アデノウイルスによる集団感染の報告は少ない。2008年5月にわれわれは、一乳児施設において感染性胃腸炎の流行を経験した。胃腸炎症状は在園児18名中15名と4名の職員にみられ、乳児室から幼児室へ、さらに職員へ

と波及した。8名の糞便から検出されたアデノウイルス41型の施設内流行で、潜伏期は2~6日、ヒト-ヒト感染が推測された。下痢は水様性から泥状、白色~黄白色を呈するものが多く、乳児は幼児に比し症状が重い傾向がみられた。

First outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 harboring the Panton-Valentine leukocidin genes among Japanese health care workers and hospitalized patients

Miki Nagao^{1,2}, Yoshitsugu Inuma^{1,2}, Masahiro Suzuki, Aki Matsushima^{1,2}, Shunji Takakura^{1,2}, Yutaka Ito^{1,3}, Satoshi Ichiyama^{1,2}

¹Department of Infection Control and Prevention, Kyoto University Hospital, ²Department of Clinical Laboratory Medicine, Kyoto University Graduate School of Medicine, ³Department of Respiratory Medicine, Kyoto University Graduate School of Medicine

American Journal of Infection Control, 38: e37- e39, 2010

This report describes the first outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 in a general hospital ward in Japan, involving 6 health care workers and 4 patients. This report emphasizes the

need for health care personnel to be alert that methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* harboring Panton-Valentine leukocidin gene poses a threat for both nosocomial and occupational infection.

Detection of invasive protein profile of *Streptococcus pyogenes* M1 isolates from pharyngitis patients.

Tadao Hasegawa¹, Akira Okamoto², Takuya Kamimura², Ichiro Tatsuno¹, Sin-Nosuke Hashikawa², Mitsutaka Yabutani³, Masakado Matsumoto, Keiko Yamada², Masanori Isaka¹, Masaaki Minami¹, Michio Ohta⁴

¹Department of Bacteriology, Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences, ²Department of Bacteriology, Nagoya University Graduate School of Medicine, ³Nagoya City Public Health Research Institute, ⁴Department of Nursing, Sugiyama Jogakuen University

Acta Pathologica Microbiologica et Immunologica Scandinavica 118(3): 167-178, 2010

Streptococcal toxic shock syndrome (STSS) is a re-emerging infectious disease in Japan and many other developed countries. Epidemiological studies have revealed that the M1 serotype of *Streptococcus pyogenes* is the most dominant causative isolate of STSS. Recent characterization of M1 isolates revealed that the mutation of *covS*, one of the two-component regulatory systems, plays an important role in STSS by altering protein expression. We analyzed the M1 *S. pyogenes* clinical isolates before or after 1990 in Japan, using two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) and pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). PFGE profiles were different between the isolates before and

after 1990. Markedly different profiles among isolates after 1990 from STSS and pharyngitis patients were detected. Sequence analysis of two-component regulatory systems showed that *covS* mutations were detected not only in STSS but also in three pharyngitis isolates, in which proteins from the culture supernatant displayed the invasive type. The mutated CovS detected in the pharyngitis isolates had impaired function on the production of streptococcal pyrogenic exotoxin B (SpeB) analyzed by 2-DE. These results suggest that several *covS* mutations that lead to the malfunction of the CovS protein occurred even in pharyngeal infection.

Characterization of *Streptococcus pyogenes* isolated from balanoposthitis patients presumably transmitted by penile-oral sexual intercourse

Masaaki Minami¹, Yukio Wakimoto¹, Masakado Matsumoto, Hideyuki Matsui¹, Yasue Kubota¹, Atsushi Okada¹, Masanori Isaka¹, Ichiro Tatsuno¹, Yasuhito Tanaka¹, Tadao Hasegawa¹.

¹Department of Bacteriology, Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences
Current Microbiology 61(2): 101-105, 2010

Streptococcus pyogenes is indigenous to the human pharynx and causes acute pharyngitis. Balanoposthitis is an inflammatory disease of the glans and the foreskin. However, balanoposthitis caused by *S. pyogenes* is not widely recognized as a sexually transmitted disease. In addition, bacteriological features of the isolates causing balanoposthitis are unclear. The four *S. pyogenes* strains isolated from adult balanoposthitis were examined. We performed emm typing, T antigen typing, RAPD assay, PCR assay for the streptococcal

pyrogenic exotoxin-related genes and antibiotic-resistant genes, and antibiotic susceptibility assay. All four strains were suspected to be transmitted by penile-oral sexual intercourse, were found to be different by genetic analysis, and also harbored some antibiotic-resistant factors. We propose that *S. pyogenes* should be considered as a causative agent of sexually transmitted disease. The drug resistant *S. pyogenes* must be taken into account when balanoposthitis patients are treated with antibiotic.

Classification of *perA* sequences and their correlation with autoaggregation in typical enteropathogenic *Escherichia coli* isolates collected in Japan and Thailand

Mariko Iida^{1,2}, Noboru Okamura¹, Mitsugu Yamazaki, Jun Yatsuyanagi³, Takayuki Kurazono⁴, Rieko Suzuki⁵, Noriaki Hiruta⁶, Junko Isobe⁷, Kazuko Seto⁸, Kimiko Kawano⁹, Hiroshi Narimatsu¹⁰, Orn-Anong Ratchtrachenchai¹¹, Nobuhiko Okabe², Kenitiro Ito²

¹Graduate School of Health Care Sciences, Tokyo Medical and Dental University, ²Infectious Diseases Surveillance Center, National Institute of Infectious Diseases, ³Akita Prefectural Institute of Public Health, ⁴Saitama Institute of Public Health, ⁵Kanagawa Prefectural Public Health Laboratory, ⁶Yokosuka Institute of Public Health, ⁷Toyama Institute of Health, ⁸Osaka prefectural Institute of Public Health, ⁹Miyazaki Prefectural Insitute of Public Health and Environment, ¹⁰Oita Prefectural Insitute of Health and Environment, ¹¹Department of Medical Sciences, National Institute of Health, Nonthaburi, Thailand

Microbiology and Immunology 54(4): 184-195, 2010

Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) strains produce a bundle-forming pilus (BFP) that mediates localized adherence (LA) to intestinal epithelial cells. The major structural subunit of the BFP is bundlin, which is encoded by the *bfpA* gene located on a large EAF plasmid. The *perA* gene has been shown to activate genes within the *bfp* operon. We analyzed *perA* gene polymorphism among typical (*eae*- and *bfpA*-positive) EPEC strains isolated from healthy and diarrheal persons in Japan (n=27) and Thailand (n=26) during the period 1995 to 2007 and compared this with virulence and phenotypic characteristics.

Eight genotypes of *perA* were identified by heteroduplex mobility assay (HMA). The strains isolated in Thailand showed strong autoaggregation and had an intact *perA*, while most of those isolated in Japan showed weak or no autoaggregation, and had a truncated *perA* due to frameshift mutation. The degree of autoaggregation was well correlated with adherence to HEp-2 cells, contact hemolysis and BFP expression. Our results showed that functional deficiency due to frameshift mutation and subsequent nonsense mutation in *perA* reduced BFP expression in typical EPEC strains isolated in Japan.

Rapid genotypic assay for detection of oseltamivir-resistant influenza A (H1N1) viruses

Mami Hata, Seidai Tanaka, Yoshihiro Yasui, Noriko Fujiwara, Shinichi Kobayashi, Hiroko Minagawa

Journal of Clinical Microbiology, 48(5): 1983-1984, 2010

We developed a rapid and convenient assay for the detection of oseltamivir-

resistant influenza A (H1N1) viruses. The assay is based on mismatch amplification mutation assay - polymerase chain reaction (MAMA-PCR), using which a mutation can

be detected at residue 275 of the neuraminidase in oseltamivir-resistant viruses, and is useful for not only seasonal viruses but also pandemic 2009 strains.

チョウセンアサガオによる食中毒

藤浦 明

食品衛生学雑誌 51(2): 216-217, 2010

平成 21 年 3 月に愛知県大府市在住の家族 2 名が、瞳孔散大、口渇、眩暈、意識混濁等の症状を呈して入院した。家庭菜園でゴボウを栽培した場所の近傍から採取した根をゴボウと誤認して食したとのことであった。調理品及び誤

認した根を愛知県衛生研究所で検査した結果、アトロピン、スコポラミンを検出した。病因物質の検出および当該根の形状から原因食品はチョウセンアサガオと特定した。

培養細胞を用いた海洋性自然毒検出法

長谷川晶子

ぶんせき 11: 627-628, 2009

フグ毒、麻痺性貝毒、シガテラ毒等の海洋性自然毒を検出する方法には、①マウス法、②機器分析法、③免疫抗体法がある。①のマウス法が公定法に定められており最も一般であるが、動物を用いるため、動物愛護の観点、および検査には体重を厳密に管理したマウスが必要になるため緊急事態に迅速に対応できにくい等の問題がある。②と③の方法では、通常複数の

成分からなる自然毒のすべての成分には対応し難い等の問題がある。これらの問題を解決する方法として培養細胞を用いる検出法が検討されている。この方法は、多検体を高感度かつ迅速に検査することができ、また検査費用も安価である。本稿では培養細胞を用いたフグ毒検査法の概要を述べた。

LC-MSによる畜水産物およびはちみつ中アセフェート、メタミドホスおよびオメトエートの分析

上野英二、大野春香、棚橋高志、大島晴美、三上栄一、根本 了¹、松田りえ子¹

¹ 国立医薬品食品衛生研究所

食品衛生学雑誌 51(3): 122-127, 2010

畜水産物およびはちみつ中のアセフェート、メタミドホスおよびオメトエートを定量するための同時分析法を開発した。牛筋肉、豚ギョーザ、はちみつなど12種類の試料（5～10g）から、無水硫酸ナトリウムで脱水しながら酢酸エチルで抽出し、GPCおよびPSAカラムクロマトグラフィーにより脱脂・精製したのち、カラ

ムスイッチング付きESI-SIMモードLC-MSで測定した。回収率（2併行×5日）は、はちみつを除いて71.4～98.4%（併行精度 \leq 12.5%、室内精度 \leq 14.1%）と良好であった。なお、はちみつに高純度のサロゲート物質を用いる内標準法を適用したところ、回収率が97.6～98.6%と大きく改善された。

食品中に含まれる微量農薬の分析法と精度管理体制の構築に関する研究

小島幸一¹、尾花裕孝²、畠山えり子³、土田由里子⁴、上野英二、田中健⁵、上田泰人⁶、佐々木珠生⁷、堤 泰造⁸、山口理香⁹

¹（財）食品薬品安全センター、²大阪府立公衆衛生研究所、³岩手県環境保健研究センター、⁴新潟県保健環境科学研究所、⁵奈良県保健環境研究センター、⁶神戸市環境保健研究所、⁷広島市衛生研究所、⁸徳島県保健環境センター、⁹北九州市環境科学研究所

厚生労働科学研究補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）「検査機関の信頼性確保に関する研究」小島幸一〈主任研究者〉、尾花裕孝〈分担研究者〉

平成21年度分担研究報告書：21-91, 2010

平成20年1月に発覚した中国製冷凍ギョーザへのメタミドホス混入事件を受けて、加工食品に対する農薬分析の需要が喚起された。加工食品といってもその種類は多種多様であり、生鮮食品に準じた検査法により農薬分析が行える範囲は限定的である。そこで、前年度に引き続き、加工食品を用いた外部精度管理試験を実施し、加工食品中の残留農薬分析への適応状況を検証した。精度管理試料には、小麦粉、牛乳及び鶏卵を含有するパンケーキを用い、添加農薬としては、平成20年度よりも多様性を持たせるために水溶性の高い農薬も含め、合計10種類

とした。品質管理などに用いられているXbar-R管理図や、Zスコアによる評価を行った結果、全ての農薬で全評価項目が適正範囲に入ったのは3機関であった。また、各機関でパンケーキの粉碎均一化を行うサンプリング試験も行った。この試験を外部精度管理試験と同様に評価したところ、全ての農薬で全評価項目が適正範囲に入ったのは5機関であった。前年度の試験で好成績が得られた分析法を採用する機関数が増加し、また各機関が加工食品の分析に対して経験を積んだことによって、前年度と比較して適正範囲に入る項目が大きく増加した。

食品中の残留化学物質の理化学的分析法に関する研究

—カーバメート系農薬の迅速分析法について—

後藤智美

薬学雑誌 130 (8) : 999-1010, 2010

食品衛生行政においては、農薬や動物用医薬品の食品中への残留をチェックし、残留基準値を超えたものは速やかに排除する必要がある。そこで、食品中のカーバメート系農薬の迅速かつ簡便な分析法を確立した。ジュース等の液状食品は、超純水による希釈のみで試験溶液を調製し、試験溶液を濃縮するための長さ 10 mm のショートカラムを備えた ESI LC/MS/MS を検出に使用した。また、この分析法を発展させ、

野菜・果実等に応用した。すなわち、酢酸エチルを用いて抽出したのち、濃縮乾固、超純水に再溶解した試験溶液を、確立したショートカラム ESI LC/MS/MS により分析した。また、測定妨害物質である脂質を多く含む食品については、脂質の除去に効果的な Dual-CCC を用いて精製した後、野菜・果実等と同様に分析した。この分析法は、従来の方法と比較して、分析に要する時間が大幅に短縮された。

水道水中の非イオン界面活性剤測定法の改良

猪飼誉友、中橋千春、本多幸康、川瀬まさ子、三上栄一
水道協会雑誌 79 (5):15-21, 2010

水道水中の非イオン界面活性剤 (NIS) をより高感度に測定することを目的に、HPLC を用いる新たな測定条件を確立するとともに告示法の前処理を改良した。HPLC 測定条件については、カラムに X-Bridge C18 を、移動相にホウ酸緩衝液とメタノールの混液を用いることにより、目的化合物をクロマトグラム上で良好に分離し、十分な感度で検出することが可能となった。前処

理に関しては、トルエン溶液中の NIS をコバルト錯体化する処理過程で、ガラス製容器を用いると、NIS が容器に吸着し十分な回収率が得られないという問題が明らかとなった。そこで、同容器にポリプロピレン製を使用するなどの改良を加えたところ、回収率が向上し、定量下限値を基準値の 1/10 である 0.002 mg/L にまで引き下げられる可能性が示唆された。

Determination of Five Phthalate Monoesters in Human Urine Using Gas Chromatography-Mass Spectrometry

Fumio Kondo¹, Yoshitomo Ikai, Rumiko Hayashi, Masanao Okumura¹, Satoshi Takatori², Hiroyuki Nakazawa³, Shun-ichiro Izumi⁴, Tsunehisa Makino⁴

¹Department of Pharmacology, School of Medicine, Aichi Medical University, ²Division of Food Chemistry, Osaka Prefectural Institute of Public Health, ³Department of Analytical Chemistry, Hoshi University, ⁴Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine, Tokai University

Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 85: 92-96, DOI: 10.1007/s00128-010-0051-8, 2010

We have developed a gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) method to determine five phthalate monoesters [monoethyl phthalate (MEP), mono-*n*-butyl phthalate (MBP), mono-(2-ethylhexyl) phthalate

(MEHP), monoisononyl phthalate (MINP) and monobenzyl phthalate (MBz)] in human urine. Human urine samples were subjected to enzymatic deconjugation of the glucuronides followed by extraction with hexane. The extracted phthalate monoesters were methylated with diazomethane, purified on a Florisil column and then subjected to GC-MS analysis. The recoveries from urine spiked with five phthalate monoesters were 86.3%-119% with coefficients of variation of 0.6%-6.1%. We measured phthalate monoester levels in human urine by analyzing 36 samples from

volunteers. MBP and MEP were detected in all samples, and their median concentrations were 60.0 and 10.7 ng/mL, respectively. MBzP and MEHP were found in 75% and 56% of samples, and their median concentrations were 10.9 and 5.75 ng/mL, respectively. MINPs were not detected in most samples (6% detectable). Women had significantly ($p<0.05$) higher mean concentrations of MBP and MEP than men. The estimated daily exposure levels for the four parent phthalates excluding diisononylphthalate ranged from 0.27 to 5.69 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ (median).

編集情報運営委員会

委員長 : 判治 岳史 (企画情報部)
委員 : 石田 勝寿 (総務課)
広瀬 かおる・續木 雅子 (企画情報部・健康科学情報室)
山下 照夫 (生物学部・ウイルス研究室)
松本 昌門 (生物学部・細菌研究室)
秦 眞美 (生物学部・医動物研究室)
棚橋 高志 (衛生化学部・医薬食品研究室)
中橋 千春 (衛生化学部・生活科学研究室)

愛知県衛生研究所報

第 61 号

平成 23 年 3 月 発行

〒462-8576 名古屋市北区辻町字流 7 番 6

愛知県衛生研究所

所長 皆川洋子

愛知県衛生研究所ウェブサイト：<http://www.pref.aichi.jp/eiseiken>

電話：ダイヤルイン

所長	052-910-5604
次長	052-910-5683
研究監	052-910-5684
総務課	052-910-5618
企画情報部長 健康科学情報室	052-910-5619
生物学部長 ウイルス研究室	052-910-5654
細菌研究室	052-910-5674
医動物研究室	052-910-5669
衛生化学部長 医薬食品研究室	052-910-5654
生活科学研究室・水道水質担当	052-910-5638

FAX：052-913-3641

e-mail: eiseiken@pref.aichi.lg.jp

Published by
AICHI PREFECTURAL INSTITUTE OF PUBLIC HEALTH
7-6 Nagare, Tsuji-machi, Kita-ku, Nagoya, 462-8576 Japan

(この刊行物は再生紙を使用しています)