

愛知県衛生研究所報

第 63 号 平成 25 年 3 月

目 次

調査研究

愛知県で 2000 年～2011 年に検出されたエンテロウイルス 71 型の遺伝子解析	1
伊藤 雅、山下照夫、廣瀬絵美、安達啓一、平松礼司、皆川洋子	
クロモアガーSTEC による志賀毒素産生性大腸菌の発育性の検討	9
井畑亜仁、山田和弘、鈴木匡弘、松本昌門、平松礼司、皆川洋子	
培養細胞を用いたシガトキシン毒性試験法の検討	17
中村(林) 瑞那、長谷川晶子、林留美子、秦 眞美、平松礼司、皆川洋子	
2-アルキルシクロブタノン を指標とした放射線照射食品の検知法の検討	25
上野英二、井上知美、大野春香、渡邊美奈恵、猪飼誉友、森下智雄	
愛知県における可燃性温泉付随ガスの賦存状況について	33
小池恭子、松田達也、山本優子、伊藤徹 ¹⁾ 、森下智雄、林留美子、大沼章子 ²⁾	
¹⁾ 衣浦東部保健所、 ²⁾ 中部大学	
他誌掲載論文抄録	41
愛知県衛生研究所報作成要領	50

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

Volume 63, March 2013

Contents

Original Papers

Genetic analysis of Enterovirus 71(EV-71) detected from surveillance in Aichi Prefecture, 2000-2011	1
Miyabi Ito, Teruo Yamashita, Emi Hirose, Hirokazu Adachi, Reiji Hiramatsu, Hiroko Minagawa	
Usefulness of CHROMagar STEC medium to select Shiga toxin-producing <i>Escherichia coli</i> (STEC)	9
Ami Ibata, Kazuhiro Yamada, Masahiro Suzuki, Masakado Matsumoto, Reiji Hiramatsu, Hiroko Minagawa	
A cytolytic assay for the measurement of ciguatoxin	17
Mizuna Nakamura-Hayashi, Akiko Hasegawa, Rumiko Hayashi, Mami Hata, Reiji Hiramatsu, Hiroko Minagawa	
Detection of irradiated foods using 2-alkylcyclobutanones as markers	25
Eiji Ueno, Tomomi Inoue, Haruka Ohno, Minae Watanabe, Yoshitomo Ikai, Toshio Morishita	
Regional distribution of inflammable natural gas incidental to hot spring water in Aichi prefecture	33
Yasuko Koike, Tatsuya Matsuda, Yuko Yamamoto, Toru Ito ¹⁾ , Toshio Morishita, Rumiko Hayashi, Shoko Ohnuma ²⁾ ¹⁾ Kinuura-Tobu health center, ²⁾ Chubu University	
Summaries of papers accepted to other journals	41
Instructions to authors	50

調 査 研 究

愛知県で 2000 年～2011 年に検出された エンテロウイルス 71 型の遺伝子解析

伊藤 雅、山下照夫、廣瀬絵美、安達啓一、平松礼司、皆川洋子

要 旨

エンテロウイルス 71 型 (EV-71) は手足口病を含む発疹症や重篤な中枢神経感染症の原因ウイルスである。近年、アジア太平洋地域で EV-71 を原因とする大規模な手足口病の流行や致命的な脳炎が報告されている。2000 年から 2011 年の 12 年間に、愛知県感染症発生動向調査事業において 31 定点医療機関で採取された 14,904 名の感染症患者のウイルス検査を実施した。このうち 929 名が手足口病、936 名が無菌性髄膜炎、1,246 名が上気道炎、241 名が髄膜炎と診断され、EV-71 は手足口病 183 名、無菌性髄膜炎 18 名、上気道炎 5 名、その他 12 名、計 218 名の患者から分離された。細胞株別分離陽性数は Vero 細胞 203 件 (93.1%)、RD 細胞 119 件 (54.6%)、HeLa 細胞 69 件 (31.7%) であった。EV-71 分離株は VP1 領域遺伝子塩基配列に基づく分子系統樹解析では 5 subgroup (B4, B5, C1, C2, C4) に分類され、C4 株が最も多く検出された。本研究により最近の本県における EV-71 の流行は異なる subgenogroup により 3～4 年おきに繰り返されていることが推測された。

キーワード：エンテロウイルス 71 型、遺伝子解析、手足口病、中枢神経感染症

序 文

エンテロウイルス 71 型 (EV-71) は、ピコルナウイルス科エンテロウイルス属 Enterovirus A に分類されるヒトの病原ウイルスであり、1969 年にアメリカ合衆国で最初に分離された¹⁾。我が国では 1973 年から 78 年の手足口病の流行で初めての分離が確認され、愛知県内では 1978 年に初めて確認されている²⁾。

EV-71 発見当初の位置づけは手足口病や中枢神経系感染症を起こすウイルスの一つに過ぎなかったが、1990 年代後半以降、東アジア地域における大規模な手足口病流行時に小児の急性死亡例の報告が蓄積され

³⁻⁶⁾、その多くが脳幹脳炎及び神経原性肺水腫による死亡とされている点がポリオと類似している^{4,7)}。強い神経病原性を有する特定の遺伝子型の EV-71 流行の可能性を検討するため EV-71 感染症に対するサーベイランスが強化され、様々な地域から多様な遺伝子型の解析結果が報告されるようになった^{8,9)}。1970 年代以降、東アジア地域を含む世界各地で分離された EV-71 は、1970 年にアメリカ合衆国で分離された標準株 BrCr 株 (genogroup A) とは異なる 2 種類の遺伝子群 (genogroup B と genogroup C) に分類される。各遺伝子群はさらに subgenogroup に分類され、genogroup B は

B1～B5、genogroup C は C1～C5 に分かれています。

感染症発生動向調査事業は 1981 年(昭和 56 年)に厚生労働省および国立感染症研究所が主体となり正式に始まり、1999 年以降は感染症法に基づき感染症の発生情報の正確な把握と分析、その結果の的確な提供・公開が感染症対策の基本となることを目的に行われている。愛知県では 1970 年代より同事業の基礎となる流行病原体の調査をはじめ、現在は同事業による 5 類定点把握対象疾患患者を中心に病原ウイルスの検査を実施、結果報告している。無菌性髄膜炎患者からのエンテロウイルス分離について検討した結果、EV-71 による手足口病が流行した 2006 年に無菌性髄膜炎患者から EV-71 が分離されたことを報告した¹⁰⁾。また、2006 年～2010 年に県内の浄化センター(下水処理場)の協力を得て採取された流入下水からウイルスを検出し、患者からの分離結果と比較したところ EV-71 は流行期に患者から検出されるが環境水からは検出されず、環境水の調査がヒトでの流行を反映しにくいウイルスであることを報告した¹¹⁾。

本稿では 2000 年 4 月から 2011 年 3 月までの 12 年間に、同事業の病原体定点(名古屋市を除き中核市病原体定点を含む)より採取・搬入された検体から検出された EV-71 の遺伝子解析を行ったので報告する。

材料と方法

1. 検査検体

2000 年 4 月から 2011 年 3 月までに感染症発生動向調査事業において名古屋市を除く県内全保健所管内から 31 医療機関の協力を得て採取された感染症患者 14,904 名の糞便 6,096 検体、咽頭ぬぐい液 8,203 検体、髄液 1,380 検体、その他(尿、血液等) 1,548 検体、計 17,227 検体を用いた。

2. 検査方法

2.1 細胞培養法

糞便は抗生物質(ペニシリン、ストレプトマイシン、アンフォテリシン B、ゲンタマイシン)及び 2% BSA(牛血清)を添加した

Veal infusion broth で 10% 乳剤とした後 10,000 rpm で、咽頭ぬぐい液及び尿は撹拌後 3000 rpm で 20 分間遠心した。分離上清 200 μ L を試験管培養した Vero 細胞、HeLa 細胞、RD 細胞 1 mL に接種し、3～4 日毎に抗生物質及び 2% FCS(牛胎児血清)を添加した MEM 培地を交換し、37℃ で 2 週間観察培養した。3 回凍結融解後、新しく培養した細胞に接種し、さらに 2 週間観察培養して、エンテロウイルス様の細胞変性効果(CPE: cytopathic effect)が観察された場合をウイルス分離陽性とした。ウイルス分離陽性の場合、国立感染症研究所分与の EV-71 抗血清を用い 96 穴マイクロプレート法による中和試験¹²⁾により同定した。

2.2 遺伝子検査法

分離ウイルス中 187 件から High Pure Viral RNA Kit (Roche, Germany) を用いてウイルス RNA を抽出した。EV-71 の VP1 遺伝子領域の解析には 189-222 プライマー¹³⁾を用いた One-step RT-PCR (Reverse transcription-polymerase chain reaction: 逆転写ポリメラーゼ連鎖反応)法(Promega, USA)により遺伝子を増幅した。1.5%アガロースゲル電気泳動後、ethidium bromide 染色下に検出した PCR 産物を pGEM-T ベクターに組み込みクローニング後、塩基配列を決定した。検出された EV-71 については、データベース上に登録されている海外分離株の遺伝子配列をもとに NJ(Neighbor-Joining)法を用いた分子系統樹解析を行い、subgenogroup を決定し解析した。

結果

1. 細胞別の EV-71 検出結果(表 1)

患者 14,904 名から採取された 17,227 検体中 218 件から EV-71 が分離された。接種細胞別では、Vero 細胞による検出数が最も多く 203 件(93.1%)、ついで RD 細胞、HeLa 細胞の順であった。

表1 細胞別の EV-71 検出数

患者数	(検体数)	検出数	検出数 (%)		
			Vero	RD	HeLa
14,904	(17,227)	218	203 (93.1)	119 (54.6)	69 (31.7)

2. 検体種類別の EV-71 検出結果 (表2)
 検査材料別の検出は、糞便 6,096 検体中 104 件 (1.7%)、咽頭ぬぐい液 8,203 検体中

129 件 (1.6%) 及び髄液 1,380 検体中 2 件 (0.1%) のみで、尿、血液など他の検体からは検出されなかった。

表2 検体別の EV-71 検出数

検体名	検査数	EV-71 検出数 (%)
糞便	6,096	104 (1.7)
咽頭ぬぐい液	8,203	129 (1.6)
髄液	1,380	2 (0.1)
その他 (尿、血液等)	1,548	0 (0.0)

3. EV-71 検出患者の臨床診断名 (表3)
 EV-71 が検出された 218 名の患者の臨床診断名は手足口病が最も多く 183 名

(83.9%) 次いで無菌性髄膜炎 18 名 (8.3%) であった。脳炎・脳症やその他神経症状を有する診断名の患者からの検出はなかった。

表3 EV-71 検出患者の臨床診断名

臨床診断名	患者数 (%)
手足口病	183 (83.9)
無菌性髄膜炎	18 (8.3)
上気道炎	5
不明発疹症	3
感染性胃腸炎	3
けいれん	2
ヘルパンギーナ	2
不明熱	2

4. 年別 EV-71 検出数および Subgenogroups 検出状況

表 4 年別及び subgenogroup 別 EV-71 検出数

年	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	計
EV-71 検出数	23	2		31	1	9	56		1	5	56	3	187
Subgenogroup													
B4	14	2											16
B5				10	1					1			12
C1				21									21
C2							2			2	17	3	24
C2-like											38		38
C4	9					9	54		1	2	1		76

EV-71 は 2000～2011 年の 12 年のうち 2002 年、2007 年を除く 10 年検出された。この間手足口病を中心とする EV-71 の流行が認められたのは 2000 年、2003 年、2006 年、2010 年であった。表 4 に VP1 領域の分子系統樹解析に基づく遺伝子群・亜群別結果を示す。2000 年に分離された 23 株は、14 株が subgenogroup B4 に 9 株が C4 に分類された。2003 年に分離された 31 株は、10 株が B5 に、21 株が C1 に分類された。2006 年に分離された 56 株は、2 株が C2 に、54 株が C4 に分類された。2010 年に分離された 56 株は、17 株が C2 に、38 株が C2-like に、1 株が C4 に分類された。

考察

ピコルナウイルスはインフルエンザウイルスやアデノウイルスとともに病原体サーベイランスの主な対象ウイルスである。なかでも EV-71 は近年のアジアにおける大規模な手足口病流行時の小児急性死亡例の原因ウイルスと報告されており³⁻⁷⁾、わが国における EV-71 による手足口病流行には患者に中枢神経症状を伴う可能性があること等の情報提供や流行ウイルスの遺伝子解析が必要と考えられる。本研究期間に名古屋市を除く愛知県において EV-71 が検出された患者は手足口病が主体で、無菌性髄膜炎を除いて脳炎・脳症等、中枢神経感染症が疑われる事例はなかった。髄液検体からの EV-71 検出例が少ないことが明らかとな

り、診断名に関わらず、重症例においては髄液検体とあわせて糞便、咽頭ぬぐい液検体の検査が重要であると考えられた。これまでに EV-71 によるウイルス感染の重症度とウイルス遺伝子の間には関連性が確認されていない³⁾。本研究においても、手足口病患者から検出された EV-71 とそれ以外の疾患患者から検出された EV-71 に遺伝子学的な特徴は認められなかった。しかし、EV-71 を原因とする手足口病流行時には中枢神経感染症が疑われる症例が国内でも報告される¹⁴⁾ため EV-71 感染による重篤な神経疾患の解明には、引き続き臨床例の詳細な観察と記録、臨床分離株の疫学的解析、迅速かつ信頼性の高いウイルス検出法など注意深いサーベイランスが必要である。

エンテロウイルスは伝播の過程でだいに変異を起こしやすいことが知られており、EV-71 分離株が HeLa 細胞に細胞変性効果を示さないという報告がある¹⁾。ウイルスは培養細胞の表面にあるレセプターを認識して感染し増殖する。本研究においても 3 種類の細胞で分離されているが、分離率の高かった Vero 細胞でも分離されず他の細胞で分離された株も存在する。ウイルス株の抗原性の変化等により、各種培養細胞による分離率が異なる可能性がある。

近年、東アジアでは、genogroup B および C の EV-71 が同時に伝播している。さらに subgenogroup の解析では 1990 年代後半以降、B3, B4 及び C1, C2 が、東アジアの多

くの地域で分離されている。1997年のマレーシア、1998年の台湾におけるEV-71による脳炎をともなう手足口病流行においては、それぞれ、B3及びC2が主要な流行株であった^{5,6)}。2000年以降、国内で分離される遺伝子型はB4,B5及びC2,C4に変化している¹⁵⁻¹⁷⁾。本研究により愛知県でも2003年にB5が、2006年以降はC2,C4が流行の主流であることが明らかとなった。同時期もしくは直前に東アジア地域から国内に持ち込まれたEV-71が、本県においても流行したことが推測された。一方、2003年に愛知県で分離されたC1株の系統樹解析からは2001~06年にかけてヨーロッパで分離された株に近縁であることが判明し、ヨーロッパから持ち込まれた可能性も推測された。EV-71のVP1遺伝子領域塩基配列に基づく系統樹解析ではsubgenogroupが決定できる。今後も分子疫学解析の継続により、流行の拡大や遺伝子群の変遷を追跡するばかりでなく、病原性とsubgenogroupの関連性解明も不可能ではないと考えられた。

謝辞

愛知県内の定点医療機関、愛知県並びに豊田市、豊橋市、岡崎市保健所、愛知県健康福祉部健康担当局健康対策課、生活衛生課の皆様には深謝いたします。

参考文献

- 1) Schmidt NJ, Lennette EH, Ho, HH: An apparently new enterovirus isolated from patients with disease of central nervous system, *Journal of Infectious Diseases*, 129, 304-309, 1974.
- 2) 西尾治, 久野有文, 石原佑弐, 三宅恭司, 栄賢司, 藤浦明, 井上裕正, 愛知県衛生部: 1978年に愛知県下で流行したEnterovirus type71による手足口病について, *愛知県衛生研究所報*, 30, 15-19, 1980.
- 3) 清水博之: 東アジアにおけるエンテロウイルス71型感染症の流行, *病原微生物検出情報*, 30, 9-10, 2009.
- 4) WHO: Outbreak news-Enterovirus, China, *Weekly Epidemiological Record*, 83, 169-170, 2008.
- 5) McMinn P, Lindsay K, Perera D, Chan HM, Chan KP, Cardosa MJ: Phylogenetic analysis of enterovirus 71 strains isolated during linked epidemics in Malaysia, Singapore, and Western Australia, *J Virol*, 75(16), 7732-7738, 2001.
- 6) 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.
- 7) Ooi MH, Wong SC, Lewthwaite P, Cardosa MJ, Solomon T: Clinical features, diagnosis, and management of enterovirus 71, *Lancet Neurology*, 9, 1097-1105, 2010.
- 8) WHO/WPRO, A Guide to Clinical Management and Public Health Response for Hand, Foot and Mouth disease (HFMD) (http://www.wpro.who.int/publications/PUB_9789290615255/en/), 2011.
- 9) 清水博之: 東アジア地域で分離されるエンテロウイルス71型の分子疫学, *病原微生物検出情報*, 25, 228-229, 2004.
- 10) 山下照夫, 伊藤雅, 水谷絵美, 藤原範子, 皆川洋子: 無菌性髄膜炎からのエンテロウイルス検出状況、2004~2008年 - 愛知県, *病原微生物検出情報*, 30, 6-8, 2009.
- 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: 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, *愛知県衛生研究所報*, 61, 11-18, 2011.
- 12) 板持雅恵, 飯塚節子, 山下照夫, 中田恵子, 石橋哲也, 清水博之, 西村順裕, 吉田弘: 手足口病病原体検出マニュアル (<http://www.nih.go.jp/niid/ja/labo-manual.html#class5>), 2012.

- 13) Oberste MS, Maher K, Flemister MR, Marchetti G, Kilpatrick DR, Pallansch MA: Comparison of classic and molecular approaches for the identification of untypeable enterovirus, *J Clin Microbiol*, 38(3), 1170-1174, 2000.
- 14) 多屋馨子, 早川丘芳, 北本理恵, 逸見佳美, 新井智, 大山卓昭, 岡部信彦, 岩崎琢也: 本邦におけるエンテロウイルス感染症の疫学、重症化例の発生動向調査, 病原微生物検出情報, 25, 226-227, 2004.
- 15) Mizuta K, Abiko C, Murata T, Matsuzaki Y, Itagaki T, Sanjoh K, Sakamoto M, Hongo S, Murayama S, Hayasaka K: Frequent importation of enterovirus 71 from surrounding countries into the local community of Yamagata, Japan, between 1998 and 2003, *Journal of Clinical Microbiology*, 43(12), 6171-6175, 2005.
- 16) 榎本美貴, 高井伝仕, 藤本嗣人, 岡藤輝夫, 飯尾潤, 吉田真策, 近平雅嗣: 兵庫県の手足口病患者から検出したエンテロウイルス 71 型の分子疫学解析 (2008-2010), 兵庫県立健康生活科学研究所健康科学研究センター研究報告第 2 号, 15-19, 2011.
- 17) 田中寛子, 藤井慶樹, 井澤真由, 山本美和子, 阿部勝彦, 橋本和久: 2010 年の広島市における EV71 の流行, 広島市衛研年報, 30, 108-110, 2011.

Genetic analysis of Enterovirus 71(EV-71) detected from surveillance in Aichi Prefecture, 2000-2011

Miyabi Ito, Teruo Yamashita, Emi Hirose, Hirokazu Adachi, Reiji Hiramatsu,
Hiroko Minagawa

Enterovirus 71 (EV-71) infection is associated frequently with mild rashes, including hand-foot-and mouth disease (HFMD), and less often with serious neurologic manifestations including fatal outcome. In recent years, EV-71 caused several large HFMD outbreaks with fatal encephalitis in the Asia-Pacific region. We performed virological investigation into 14,904 patients diagnosed with infectious diseases at 31 pediatric clinics in Aichi Prefecture, between 2000 and 2011. Of the 14,904 patients, 929 were diagnosed as HFMD, 936 aseptic meningitis, 1,246 Upper Respiratory Illnesses, and 241 meningitis. The isolates were identified by neutralization test using with intersecting-pool and type-specific antisera supplied from the National Institute of Health, Japan. The isolates were analyzed by RT-PCR and sequencing for partial VP1 region. EV-71 was isolated from 218 patients with HFMD (n=183), Aseptic Meningitis (n=18), Upper Respiratory Illnesses (n=5), or others (n=12), while not from meningitis. Of these isolates from 218 patients, 203(93.1%) were isolated using Vero, 119 (54.6%) RD, and 69 (31.7%) HeLa cells. The phylogenetic analysis of the partial VP1 region revealed that these isolates could be divided into subgenogroups B4, B5, C1, C2, and C4. The C4 isolate was the most prevalent isolates in this study. Our results indicated that the recent EV-71 outbreaks observed in Aichi Prefecture 3 to 4 years interval were caused by different subgenogroups.

Key words: Enterovirus71(EV-71), Genetic analysis, Hand-foot-and mouth disease (HFMD), neurologic manifestations

調 査 研 究

クロモアガー-STECCによる志賀毒素産生性大腸菌の 発育性の検討

井畑亜仁、山田和弘、鈴木匡弘、松本昌門、平松礼司、皆川洋子

要 約

牛及び豚糞便由来志賀毒素産生性大腸菌 (STECC) 72 株と STECC 以外のヒト糞便由来大腸菌 (non-STECC) 72 株を用いてクロモアガー-STECC 培地における発育性の検討を行った。

STECC はクロモアガー-STECC 上で 72 株中 64 株 (88.9%) が発育した。発育しなかった STECC 8 株は亜テルル酸カリウム・セフィキシム添加ソルビトールマッコンキー寒天培地 (CT-SMAC) 上でも発育しなかったことから、クロモアガー-STECC 上では CT 感受性の株は発育しないと考えられた。一方、non-STECC はクロモアガー-STECC 上で 8.3% (6/72) のみ発育したが、CT-SMAC 上では 27.8% (20/72) が発育した。従って、non-STECC 等の夾雑菌を抑制する効果はクロモアガー-STECC の方が CT-SMAC よりも高いと考えられた。

クロモアガー-STECC で藤色のコロニーを形成した 61 株中 55 株が STECC であり、STECC 陽性率は 90.2% であった。藤色のコロニーを形成しなかった STECC のうち 9 株は白色コロニーを形成した。これら 9 株中 6 株 (66.7%) は乳糖及び白糖が非分解もしくは遅分解であったことから、クロモアガー-STECC 上でのコロニーの色調は白糖と乳糖の分解能と関連がある可能性が考えられた。

これらの結果よりクロモアガー-STECC は夾雑菌が多く存在する糞便等の臨床検体から STECC のスクリーニング検査の上では有用と考えられるが、一部の CT 感受性 STECC はクロモアガー-STECC で発育しない可能性があるため、選択性の弱い培地も併用して検査する必要がある。また典型的な藤色のコロニーを呈さない STECC もあるので、白色のコロニーも釣菌する必要があると考えられた。

キーワード：志賀毒素産生性大腸菌 (STECC)、クロモアガー-STECC、CT-SMAC

序 文

志賀毒素産生性大腸菌 (STECC) または腸管出血性大腸菌 (EHEC) は下痢原性大腸菌の一種で、ベロ毒素 (VT) とも呼ばれる志賀毒素 (Stx) を産生し、軽い胃腸炎から出血性大腸炎などの消化管症状や生命を脅かす溶血性尿毒症症候群 (HUS)、急

性脳炎など広い範囲の疾患の原因菌としてしばしば検出される¹⁾。主な感染経路は加熱不十分な牛肉等の経口摂取であるが、汚染された食品や水から感染する場合や、ヒトからヒトへの感染も起こるとされ、STECC の迅速で確実な検出は公衆衛生上重要である。わが国における STECC の血清型

別の分離状況は O157 が最も多く、2010 年の感染症発生動向調査では O157 の分離頻度は全体の約 70% を占めている。O157 の多くはソルビトールを非分解又は遅分解であり、それを利用した分離培地が使用されている。また O157 を選択的に分離できる酵素基質培地も発売されて O157 のスクリーニングに有効活用されている²⁾。しかし、近年 O157 以外の血清型を有する non-O157 STEC 株が世界中で増加し³⁾、わが国でも 2011 年に生の牛肉由来の血清型 O111 などを原因とした食中毒事例で 5 人の死者が発生した⁴⁾。また同年ドイツおよびその周辺諸国では血清型 O104 による発芽野菜を原因とした大規模アウトブレイクが発生した⁵⁾。これらの non-O157 STEC やソルビトール分解 O157 はソルビトールマッコンキー培地 (SMAC) 上で他の大腸菌と区別ができず、検出が困難となる可能性がある。

最近、汎用的な STEC 分離用酵素基質培地としてクロモアガー STEC が開発された。STEC はクロモアガー STEC 上で藤色のコロニーを形成し、その他のグラム陰性桿菌は発育が抑制されるか白色もしくは青色のコロニーを形成する。また、グラム陽性菌

は発育が抑制される。さらに培地に直接紫外線を照射し発育した集落の蛍光の有無を確認することで、血清型 O157 と他の STEC の鑑別も可能である⁶⁾。そこでクロモアガー STEC の性能調査を行うため、牛及び豚糞便由来の種々の血清型の STEC とヒト由来の STEC 以外の大腸菌 (non-STECC) を用いて、亜テルル酸カリウム・セフィキシム添加ソルビトールマッコンキー寒天培地 (CT-SMAC) と比較することでクロモアガー STEC 上での STEC の発育性の検討を行った。

菌株と方法

菌株：調査研究「腸管出血性大腸菌 O26 の分布状況と分離株の遺伝子学的解析 (平成 12 年～13 年)」において牛及び豚糞から検出され、凍結保存されていた 11 血清型及び血清型別不能の STEC 72 株 (表 1-1) 及びヒト糞便由来の STEC 以外の大腸菌 (non-STECC) 72 株 (表 1-2)、計 144 株を用いた。培地の作成：クロモアガー STEC は添付文章に従って選択剤混合物を培地に添加して、CT-SMAC は亜テルル酸カリウム・セフィキシム (CT) を培地に添加して作成した。発育性試験：保存株をトリプトソイ寒天培地で前培養した後、クロモアガ

表1-1 牛及び豚糞便由来STECの血清型

血清型	検体数	毒素型*			インチミン遺伝子
		VT1	VT2	VT1+VT2	
O1	1	0	1	0	0
O8	1	0	1	0	0
O26	2	2	0	0	2
O74	3	1	2	0	1
O119	3	1	2	0	1
O124	1	0	1	0	0
O136	1	1	0	0	0
O145	1	1	0	0	1
O152	1	0	1	0	0
O157	15	0	5	10	15
O161	2	2	0	0	2
OUT	41**	3***	34	2	11
合計	72**	11	47	12	33

*RPLAの結果 **RPLA VT2陰性、PCR VT2陽性2株を含む

***2株はPCR VT1+2陽性

表1-2 ヒト糞便由来大腸菌の血清型

血清型	検体数
O1	7
O6	4
O18	5
O25	5
O74	2
O103	1
O121	1
O125	2
O126	1
O148	3
O152	1
O153	1
O159	1
O164	1
OUT	37
合計	72

表2-1 クロモアガー-STECC上での発育

発育	STEC	non-STEC	合計
+	64	6	70
-	8	66	74
合計	72	72	144

表2-2 CT-SMAC上での発育

CT-SMAC上での発育	STEC	non-STEC	合計
+	64	20	84
-	8	52	60
合計	72	72	144

表3 クロモアガー-STECC上でのコロニーの色調

色調	STEC	non-STEC	合計
藤色	55	6	61
白	9	0	9
合計	64	6	70

表4 クロモアガー-STECC上でのコロニーの色調と糖分解能

	白糖 分解	乳糖 分解	白糖 分解	乳糖 非分解*	白糖 非分解*	乳糖 分解	白糖 非分解*	乳糖 非分解*	合計
藤色		33	5		22		1		61
白色	2		1		0		6		9

*遅分解を含む

表5 クロモアガー-STECC上でのSTECの蛍光

蛍光	血清型		合計
	0157	その他	
+	0	46	46
-	15	3	18
合計	15	49	64

—STEC 及び CT-SMAC に接種し 37℃ 一夜培養後、コロニーの発育、色調、紫外線(365 nm)下での蛍光を調べた。白糖及び乳糖分解試験：クロモアガー-STEC 上に発育した 70 株について 37℃ で 1 日、2 日、3 日及び一週間、糖分解培地で培養した。判定は 1 日目で分解したものを陽性、2 日目以降は遅分解と判定した。ベロ毒素(VT)産生性試験：STEC 72 株について VTEC-RPLA (デンカ生研)を用いた RPLA 法で実施した。VT 及びインチミン(*eae*)遺伝子検出試験：VT 及びインチミン遺伝子の有無は小林らのプライマー^{7,8)}を用いて PCR 法により確認した。

結 果

供試した大腸菌 144 株中クロモアガー-STEC 上に発育したのは STEC72 株中 64 株(88.9%)、STEC 以外の大腸菌(non-STEC)72 株中 6 株(8.3%)であった。一方、クロモアガー-STEC 上に発育が認められなかった 74 株のなかに STEC が 8 株(10.8%)認められた(表 2-1)。次に CT-SMAC 上での発育を調べたところ、STEC72 株中 64 株(88.9%)に発育が認められた(表 2-2)。残り 8 株は CT-SMAC に発育しなかったが、これら 8 株はクロモアガー-STEC 上でも発育が見られなかった。non-STEC では 72 株中 20 株(27.8%)に CT-SMAC 上で発育が認められた。

クロモアガー-STEC 上に発育が認められた 70 株のコロニーの色調は藤色が 61 株、白色が 9 株であった(表 3)。藤色を呈した 61 株中 STEC は 55 株(90.2%)であり、残りの 6 株は non-STEC であった。また、白色を呈した 9 株は全てが STEC であった。そこでクロモアガー-STEC 上のコロニー色調と糖分解能との関連を調べるためにクロモアガー-STEC に発育した 70 株について糖分解試験を行った(表 4)。その結果、培地上で藤色コロニーを呈した 61 株ではそ

の大半である 60 株(98.4%)が白糖と乳糖の両者、若しくはどちらかの糖を分解していた。これに対して白色コロニーを呈した 9 株では両者、若しくはどちらかの糖を分解した株は 3 株のみで、6 株(66.7%)が白糖、乳糖いずれも非分解であった。

クロモアガー-STEC 培地で発育した 64 株の STEC について紫外線下でのコロニーの蛍光観察を行った(表 5)。その結果、15 株の O157 は全て蛍光陰性であった。O157 以外の 49 株の STEC ではその大半(46 株、93.9%)が蛍光陽性であったが、3 株は蛍光陰性となった。

VT 産生性に関しては STEC 72 株中 68 株(94.5%)は RPLA 法と PCR 法の結果が一致した。しかし、残り 4 株では RPLA 法と PCR 法で結果が不一致となった(表 1-1)。不一致となった 4 株はいずれも血清型 OUT で PCR 法でのみ陽性となり、その内訳は RPLA : VT 2 陰性、PCR : VT 2 陽性が 2 株、RPLA : VT 2 陽性、PCR : VT1&2 陽性が 2 株であった。これら 4 株は全てクロモアガー-STEC 上で発育が認められた。一方、インチミン遺伝子は STEC72 株中 33 株(45.8%)が陽性であった。ヒトから高率に検出される O157、O26 は全ての株がインチミン遺伝子を保有していた。また、クロモアガー-STEC で発育しなかった 8 株は全てインチミン遺伝子陰性であった。

考 察

STEC は 88.9%(64/72)がクロモアガー-STEC で良好に発育し、これら 72 株は CT-SMAC においても同様の発育を示した(88.9%(64/72))。Hirvonen らはクロモアガー-STEC 上では CT 感受性の株は発育しなかったことを報告している⁹⁾。また、中根らは 59 株の O157 についてクロモアガー-O26/O157 培地と CT-SMAC でその発育

性を比較したところ両者の発育性は一致したことを報告している¹⁰⁾。今回の検討結果も他の研究者からの報告と同様にクロモアガー-STECCに選択剤としてCT若しくはCT類似物が添加されることを示している。一方、non-STECCではCT-SMAC上に20株が発育したが、クロモアガー-STECC上では6株のみであった。山崎らは一部のO157がクロモアガー-STECCではCT-SMACに比べ約230倍発育が抑制されること、O157患者凍結保存便を塗沫した場合、クロモアガー-STECCでは発育が認められなかったが、CT-SMACには発育したことも報告している¹¹⁾。これらの結果はクロモアガー-STECCにはCT若しくはCT類似物以外の選択剤が加えられていることを示唆しているが、クロモアガー-STECCの選択剤混合物の組成が明らかでないのでその詳細は不明であった。

クロモアガー-STECCで藤色コロニーを形成した61株中55株がSTECCであり、クロモアガー-STECCのSTECC陽性率は90.2%であった。クロモアガー-O26/O157培地ではO157は赤色、O26は緑色コロニーを形成すると記載され、臨床分離株を用いた検討ではO157では83.1%(49/59)、O26では88.9%(8/9)が典型的色調のコロニーを形成したと報告している¹⁰⁾。従って、これら酵素基質培地では約1~2割の菌株が非典型的色調を示すコロニーを形成するものと推察される。また、今回の検討ではクロモアガー-STECCで非典型的な白色コロニーを形成するSTECCの多くが白糖、乳糖共に非分解もしくは遅分解であることが明らかとなったことから、クロモアガー-STECC上でのコロニーの色調は白糖と乳糖の分解能と関連がある可能性が考えられた。

紫外線下でのSTECCのコロニーの蛍光観察では15株のO157は全てクロモアガー

STECC上で蛍光を発しなかった。またO157以外のSTECCはクロモアガー-STECCで93.9%(46/49)が蛍光を発していた。蛍光を発するO157の存在も報告されているが⁷⁾、クロモアガー-STECC上での蛍光の有無によるO157検索はコロニーの色調によるSTECCの鑑別に比べその特異性は優れていると考えられ、O157とnon-O157の鑑別に利用できることが確認できた。

STECCの重要な病原因子であるインチミンについてその有無とクロモアガー-STECC上での発育との関連を調べたところ、インチミン遺伝子陰性のSTECC8株は全てクロモアガー-STECCで発育しなかったが、non-STECC6株は何れもインチミン遺伝子陰性であったがクロモアガー-STECCに発育した。従って、これらの結果からはSTECC病原因子保有状況とクロモアガー-STECC上での発育との明確な関連性は見いだせなかった。

今回の検討から、クロモアガー-STECCはCT-SMACよりnon-STECCの発育を抑制する作用が強いことが明らかとなり夾雑菌が多く存在している糞便では有用と考えられた。しかし、一部のCT感受性STECCはクロモアガー-STECCで発育しない可能性があることから、選択性の弱い培地も併用して検査する必要がある。また白糖及び乳糖非分解もしくは遅分解株の中には典型的な藤色コロニーを形成せず、白色を呈する株も存在するので、クロモアガー-STECC上の白色コロニーも釣菌する必要があると考えられる。

文 献

- 1) 藤井 潤：B. 大腸菌とエシェリヒア属。戸田新細菌学 改訂33版(吉田眞一, 柳雄介, 吉開泰信編) 535-541, 2007.
- 2) Church D L, Emshey D, Semeniuk H,

- Lloyd T, Pitout J D : Evaluation of BBL CHROMagar O157 versus Sorbitol-MacConkey Medium for Routine Detection of *Escherichia coli* O157 in a Centralized Regional Clinical Microbiology Laboratory , *Journal of Clinical Microbiology* , 45(9) , 3098-3100 , 2007.
- 3) 西川 禎一 , 王 麗麗 : 志賀毒素産生性大腸菌の疫学 , *日本食品微生物学会雑誌* , 29(3) , 141-154 , 2012.
- 4) 国立感染症研究所感染症情報センター : 腸管出血性大腸菌O111による焼肉チェーン店での集団食中毒事件 , *病原微生物検出情報* , 33(5) , 5-6 , 2012.
- 5) 天沼 宏 , 窪田邦宏 , 森川 馨 : O157以外の血清群の志賀毒素産生性大腸菌 (STEC) : 海外における流行の状況 , *日本食品微生物学会雑誌* , 29(1) , 18-23 , 2012.
- 6) 巽 則雄 , 近藤 好 , 山田貴子 , 杉浦康行 , 犬塚和久 , 金子孝昌 : 腸管出血性大腸菌感染症患者糞便中の原因菌量と酵素基質培地クロモアガー-STECC の有用性 , *感染症学雑誌* , 85(6) , 664-669 , 2011.
- 7) 仲西寿男 , 丸山 務監修 : 食品由来感染症と食品微生物 , 281-296 , 2009.
- 8) 小林一寛 , 勢戸和子 , 八柳 潤 , 齊藤志保子 , 寺尾通徳 , 金子通治 , 芹川俊彦 , 倉本早苗 , 藤沢倫彦 , 鈴木理恵子 , 山崎 貢 , 林 賢一 , 松根 涉 , 安岡富久 , 堀川和美 , 村上光一 , 河野喜美子 , 山田 亨 , 伊藤健一郎 : 下痢原性大腸菌における付着因子保有状況とそれに基づく大腸菌検査法の一考案 , *感染症学雑誌* , 76(11) , 911-920 , 2007.
- 9) Hirvonen JJ , Siitonen A , Kaukoranta SS : Usability and Performance of CHROMagar STEC Medium in Detection of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Strains , *Journal of Clinical Microbiology* , 50(11) , 3586-3590 , 2012.
- 10) 中根邦彦 , 佐藤千歳 , 小須田文子 , 板倉裕子 , 宇野芳香 : 腸管出血性大腸菌検査におけるクロモアガー-O26/157 (SEL) 培地の検討 , 平成 22 年度保健所等試験検査技術研修会抄録集 , 4.
- 11) 山崎 貢 , 青木日出美 , 鳥居あい子 , 平野佐代子 , 長縄良勝 , 山田貞二 , 服部悟 : 新しく市販された腸管出血性大腸菌の分離培地の評価 , 平成 22 年度西三河地区保健所試験検査技術研修会抄録集 , 15.

Usefulness of CHROMagar STEC medium to select Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC)

Ami Ibata, Kazuhiro Yamada, Masahiro Suzuki, Masakado Matsumoto,
Reiji Hiramatsu, Hiroko Minagawa

We evaluated usefulness of CHROMagar STEC medium by using 72 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) from bovine and porcine stools and 72 non-STEC *E. coli* of human origin. Of the 72 STEC isolates, 64 (88.9%) grew on CHROMagar STEC, but eight did neither on CHROMagar STEC nor on Cefixime-Tellurite-Sorbitol MacConkey agar (CT-SMAC), suggesting that these isolates were sensitive to CT or CT-like reagent. As for the 72 non-STEC *E. coli*, six (8.3%) and 20 (27.8%) grew on CHROMagar STEC and CT-SMAC, respectively, showing that the CHROMagar is superior to CT-SMAC with regard to suppression of contaminated non-STEC.

Of 61 typical mauve colonies on CHROMagar STEC, 51 (90.2%) were STEC. Only six were non-STEC, indicating considerably high specificity. On the other hand, nine STEC formed atypical white colonies, which may be associated with the decreased utility of lactose and sucrose observed in six of them.

In conclusion, CHROMagar STEC is a useful tool for screening STEC from stool samples, however some STEC developed atypical white colonies on the medium and those which were sensitive to CT supplement did not grow. Therefore, it should be considered to pick up white colonies and also simultaneously use selective media without CT supplement.

調 査 研 究

培養細胞を用いたシガトキシン毒性試験法の検討

中村(林) 瑞那、長谷川晶子、林留美子、秦 眞美、平松礼司、皆川洋子

要 旨

シガトキシン類はバラフエダイ等の食用魚に含まれる海洋性自然毒であり、今後日本においても食中毒発生増加が懸念されている。現在、魚肉に含まれるシガトキシン類の検出・定量には主にマウス試験が用いられるが、大量の試料を要すること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、培養細胞を用いたシガトキシン毒性試験法の構築を試みた。検討の結果、曝露開始から最短5時間で十分な感度で検出可能であった。また、無毒の魚肉抽出液にシガトキシンを添加した模擬検体を用いて、信頼性の高い定量が可能であることを示した。

キーワード：シガトキシン、細胞毒性試験、食中毒

序 文

魚食文化の日本においては、フグ毒をはじめとする海洋性自然毒(マリントキシン: marine toxin)による食中毒がしばしば発生している。近年の日本において注視されているマリントキシンの1種に、シガテラ(ciguatera)毒がある。シガテラ毒中毒の症状は、循環器系症状、神経系症状など多岐にわたるが、解毒等の根本的な治療法は確立されていない¹⁾。原因魚としてバラフエダイ、イシガキダイ等が知られているが、植物プランクトンである渦鞭毛藻 *Gambierdiscus* 属の産生する毒素が、食物連鎖による生物濃縮でこれら魚類に蓄積するものと考えられている。魚類の毒化は *Gambierdiscus* 属の分布等に左右され、同じ魚種でも毒の保有量には著しい地域差がある¹⁾。*Gambierdiscus* 属はおもに熱帯・亜熱帯地域に分布しているため、日本におけるシガテラ毒中毒の原因魚は沖縄近海で漁獲された魚類が主であったが、近年、本

州沿岸で漁獲された魚類によるシガテラ毒中毒の発生が相次いで報告されている²⁾。地球温暖化による海水温の上昇による *Gambierdiscus* 属の分布拡大が原因として推定されており、今後の日本における発生拡大が懸念されている。

魚介類に含まれるマリントキシンの毒力の測定はマウスを用いた試験により行うことが多い。シガテラ毒の成分はシガトキシン(ciguatoxin: CTX)及びその類縁化合物であるが、CTX 類の検査も、マウス試験法が一般的である³⁾。しかしマリントキシンのマウス試験法には倫理的な問題をはじめとする様々な難点がある。例えばCTX 類の検査では、大量の試料を要すること、結果のばらつきが大きいこと、結果の判明まで時間を要すること(試験液のマウスへの投与から最短24時間)等が指摘されている¹⁾。これまで化学的検出法、免疫学的検出法の開発が進められているが⁴⁾、生体活性を確認するという観点からは、マウス試験

法に替わるものではない。

当所では、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に注目してきた。これまで、麻痺性貝毒[ゴニオトキシン(gonyautoxin: GTX)群、ネオサキシトキシン(neosaxitoxin: neoSTX)等]、フグ毒[テトロドトキシン(tetrodotoxin: TTX)]、パリトキシン(palytoxin: PTX)において培養細胞を用いる試験法の実用化に取り組み^{5)~7)}、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。

CTX 類については、Na⁺チャネルの活性化作用を利用した Neuro2a 細胞を用いる試験法の報告がある^{4), 8)}。既報では魚類から抽出したシガトキシン類を用いており、また細胞へのトキシンの曝露は 14~24 時間である。今回、初めて全合成のシガトキシン類である CTX3C を用いての細胞毒性試験を試み、検査の迅速化や実用性の検討を行った。

材料と方法

1. トキシン標準品の調製

CTX 標準品として、全合成の CTX3C (030-21581, 和光純薬)を用いた。CTX 標準品をメタノール(特級、和光純薬)に溶解して CTX ストック溶液(100 ng/mL)を作成し、-20 で保存した。CTX 標準溶液は、CTX ストック溶液をリン酸緩衝生理食塩水(PBS: pH 7.4)で 2 倍の段階希釈を行い作製した。

2. 細胞培養

マウス神経芽細胞腫由来 Neuro2a 細胞(ECACC:89121404)は 5% CO₂ 37 の条件下で培養し、継代培養用には、Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 に 10% fetal bovine serum、100 U/mL penicillin、100 µg/mL streptomycin、1 mM sodium pyruvate を添加した培地を用いた。毒性試験用培地として、血清及び添加試薬を加えない RPMI1640 を用いた。培地、血清、培地添加試薬は、いずれも Invitrogen 社製品を用いた。

3. 毒性試験添加試薬の調製

ウアバイン八水和物(ouabain octahydrate, SIGMA)を PBS に溶解して 10 mM に調製し、ウアバイン溶液とした。ベラトリジン(veratridine, SIGMA)を 0.01 M 塩酸(和光純薬)に溶解して 1 mM に調製し、ベラトリジン溶液とした。両溶液は分注して -20 で保存し、必要時に溶解して用いた。ウアバイン溶液とベラトリジン溶液を 1 : 1 で混合した液を O/V 液とした。

4. 魚肉抽出液の作製

魚肉として、アブラカレイ、アジ、タラの筋肉を用いた。

魚肉抽出液の作製は、機器分析等に用いられる手法^{4), 8)}(アセトンにより抽出し、溶媒をメタノール、クロロホルムに置き換えた後、2 種のカラムで精製して 1% Tween 60 生理食塩水により溶解: 図 1 a)及びマウス試験法³⁾(アセトンにより抽出し、溶媒をジエチルエーテル、メタノールに置き換えた後、溶媒を除去して 1% Tween 60 生理食塩水により溶解: 図 1 b)で文献の記載に従った。作製した抽出液は、分注して -20 で保存した。試薬は和光純薬製のものを用いた。

5. 模擬検液の作製

ガラスチューブに分注していた CTX ストック溶液 2 µL (CTX 200 pg を含むメタノール溶液)を風乾させた後、魚肉抽出液 20 µL を加えてよく混合し、10 ng/mL の模擬検液とした。この模擬検液を、同じ魚肉抽出液で更に段階希釈することにより様々な濃度の模擬検液を作製した。

6. 毒性試験

培養細胞を用いた CTX の毒性試験は、当所より既報の麻痺性貝毒等の試験法^{5)~7)}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。

前培養

96 ウェルマイクロプレート(平底、353072、Falcon)に 5 × 10⁴/ウェルの Neuro2a 細胞を播種し、継代培養用の培地 100 µL で 24 時間培養した。

トキシンへの曝露

前培養で用いた培地を除いて、各ウェル

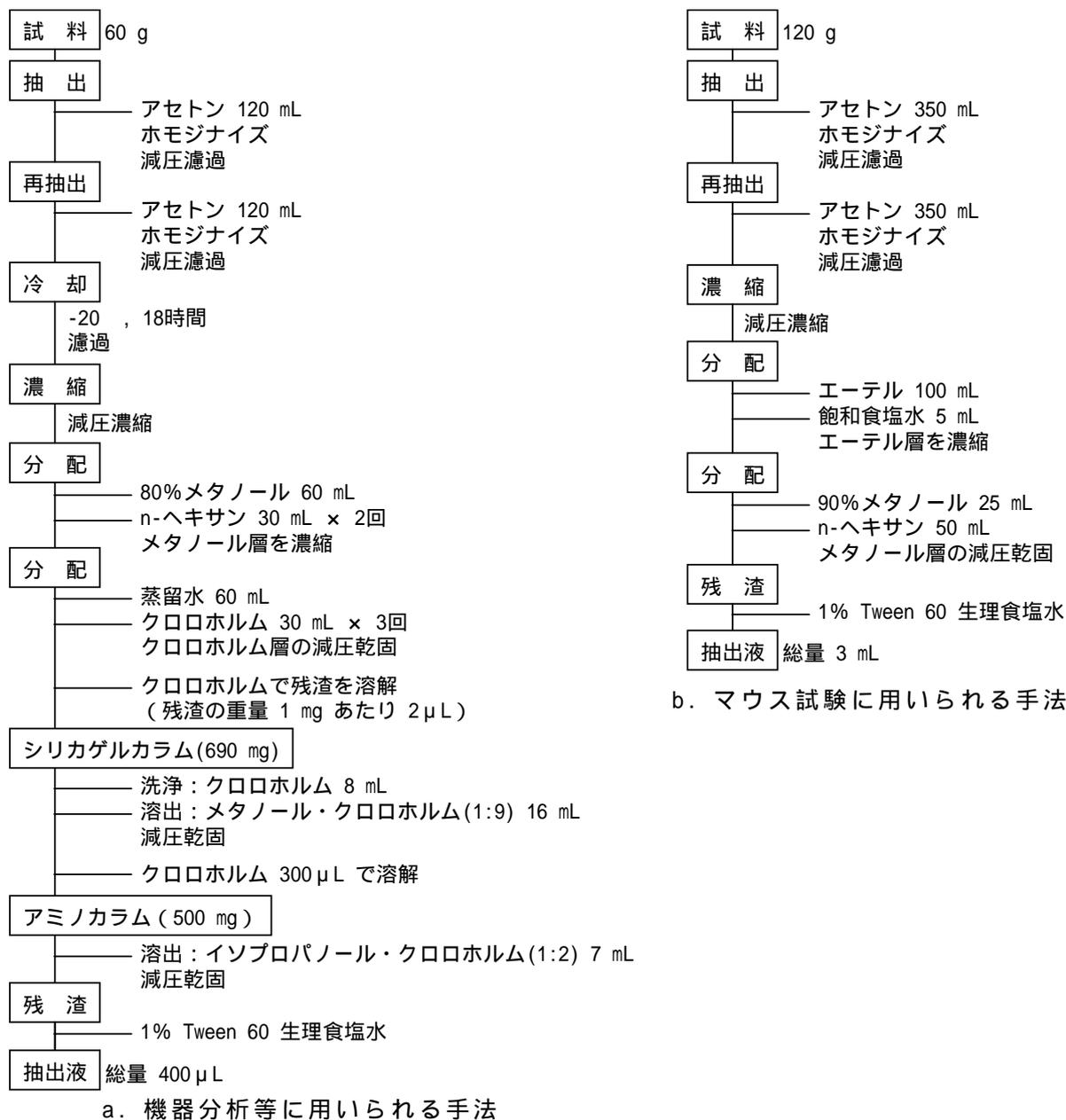


図 1 抽出液作製法の概略

に、試験用培地 55~95 μL、O/V 液 0~40 μL、試験液または PBS を 5 μL 加え、1 ウェルあたりの液の総量を 100 μL とした。攪拌振とう器 (マイクロプレートミキサー NS-P、井内盛栄堂) で 3~5 秒攪拌してから、5% CO₂ 37℃ の条件下で一定時間の曝露を行った。

試験液としては、CTX 標準溶液、魚肉抽出液または模擬検液のいずれかを用いた。魚肉抽出液及び模擬検液は、適宜 PBS で希釈して試験液とした。

生細胞数の測定

の操作の後ウェル内の液を除いて、50

μL の試験用培地でウェルを洗浄した後、試験用培地 90 μL と Cell Counting Kit-8 溶液 (同仁化学) 10 μL を各ウェルに加えて、5% CO₂ 37℃ の条件下で 1 時間培養して呈色反応を行った。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 における吸光度を測定した。

解析

において O/V 液を加えず、試験液の代わりに PBS 5 μL を加えたウェルを、細胞生存率 100% のウェルとした。このウェルの吸光度の値を 100% として、各ウェルの

吸光度のパーセンテージを求め、それを各ウェルでの細胞生存率とした。

模擬検液の CTX 濃度の定量

模擬検液の試験時には、同時に CTX 標準溶液による試験を実施して近似曲線を作成し、これを検量線として模擬検液の CTX 濃度を算出した。近似曲線の作成には 5 パラメータロジスティック (5-parameter logistic: 5PL) モデルを用い、近似式は $F(x) = A + (D / (1 + (\ln(x)/C)^B))^E$ において x を CTX 標準溶液の濃度 (pg/mL)、 $F(x)$ を細胞生存率 (%) として、係数 A~E の値を最小二乗法で求めた^{9),10)}。x の値に 1 未満の数値が含まれる場合は $\ln(x)$ を $\ln(10 \cdot x)$ として求めた。

結果と考察

1. トキシンへの曝露時間とウアバイン及びペラトリジンの添加量の比較 (図 2)

CTX 標準溶液を用いて、CTX への曝露時間 (1、3、6、18 時間) と 0/V 液の添加量 (0 ~ 40 μ L) を比較した。

曝露 1 時間の全てのウェル、及び各曝露時間において 0/V 液を添加しないウェルでは CTX の細胞毒性は検出できなかった (データ不掲載)。曝露 3、6、18 時間では、曝露時間が長いほど検出感度が高まる傾向

がみられた。しかしながら曝露 18 時間では、CTX 非添加 0/V 液 2.5 μ L 添加ウェルで細胞生存率が 60% を下回った (データ不掲載)。0/V 液のみによる細胞生存率の大幅な低下は、定量の正確性の低下に繋がる。0/V 液添加量の減量により改善できる可能性があるが、迅速な検出が望ましいこと、また後述するように曝露 3、6 時間での検出感度が充分であることから、以後は曝露 3、6 時間で検討した。

曝露 3、6 時間において、0/V 液の添加量が多いほど検出感度は高まるが、CTX 非添加ウェルの細胞生存率が低くなる (図 2 a, 2 b)。10 μ L から 20 μ L の範囲で添加する 0/V 液の増量に伴う検出感度の上昇は曝露 3、6 時間においては小さいと判断し、以後は 0/V 液の添加量 10 μ L で検討した。

2. 検量線による定量範囲 (図 3)

5PL 解析による標準曲線の一例を、図 3 に示す。近似式は、CTX 標準溶液の濃度 (pg/mL) を x として、曝露 3 時間: 細胞生存率 (%) = $-0.46 + (82.3 / (1 + (\ln(x)/45.2)^{5.4}))^{(3.4 \cdot 10^4)}$ 、6 時間: 細胞生存率 (%) = $-0.24 + (77.1 / (1 + (\ln(10 \cdot x)/7.5)^{5.4}))^{2.8}$ である。この例における定量範囲の CTX 濃度は、曝露 3 時間で 0.145 ~ 1.33

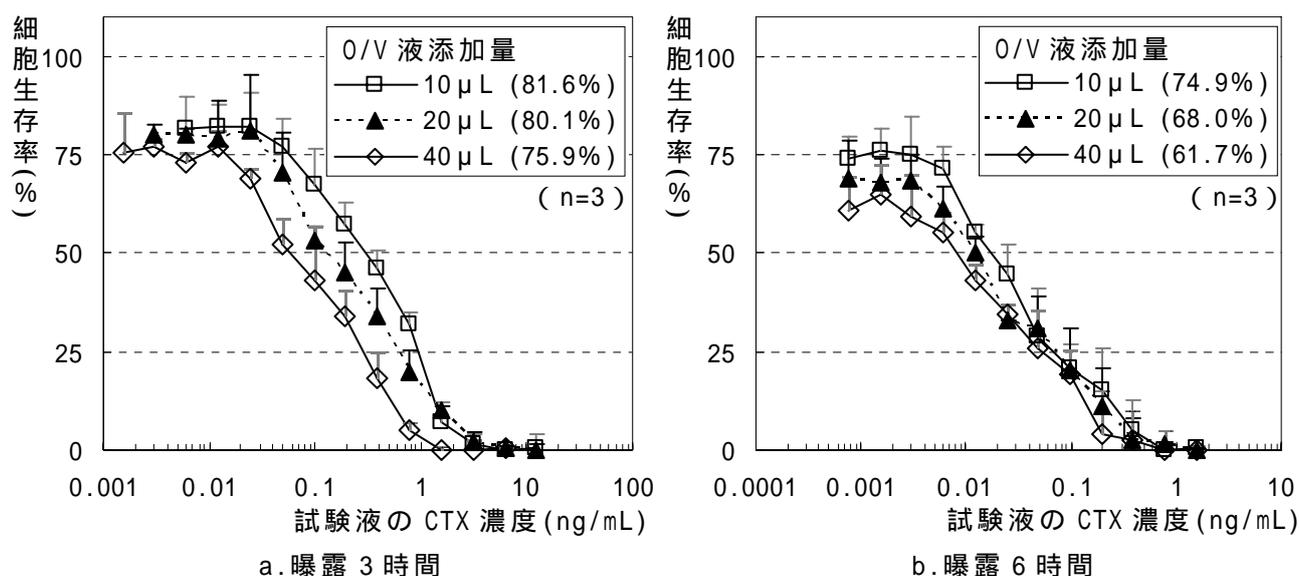


図 2 曝露時間と 0/V 液添加量の比較

注: 凡例の ()内は、CTX 濃度 0 ng/mL での細胞生存率

ng/mL、6 時間で 0.012 ~ 0.124 ng/mL である。実験を 5 回実施した結果、定量可能範囲は、曝露時間 3 時間では細胞生存率 15 ~ 65%、6 時間では細胞生存率 15 ~ 60% が適当であると考えられた。以後の模擬検液の定量は、この範囲内で行った。

3. 模擬検液の検討 - 機器分析等で用いら

れる抽出法(図 4 a)

機器分析等で用いられる抽出液で模擬検液を作製し、CTX 濃度の定量を行った(図 4 a)。

模擬検液の CTX 濃度と試験による定量値の近似式(回帰式)は、 $\text{Log}_{10}[\text{定量値}] = 1.0376 * \text{Log}_{10}[\text{模擬検液の濃度}] + 0.0391$ で表された。近似式の傾き(回帰係数)が 1

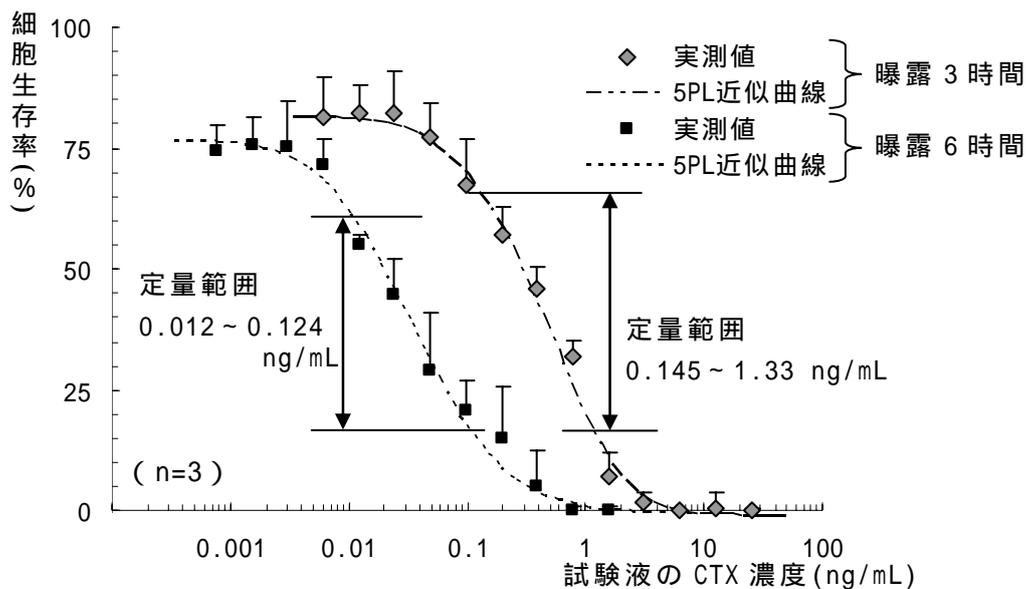


図 3 5PL 解析による近似曲線

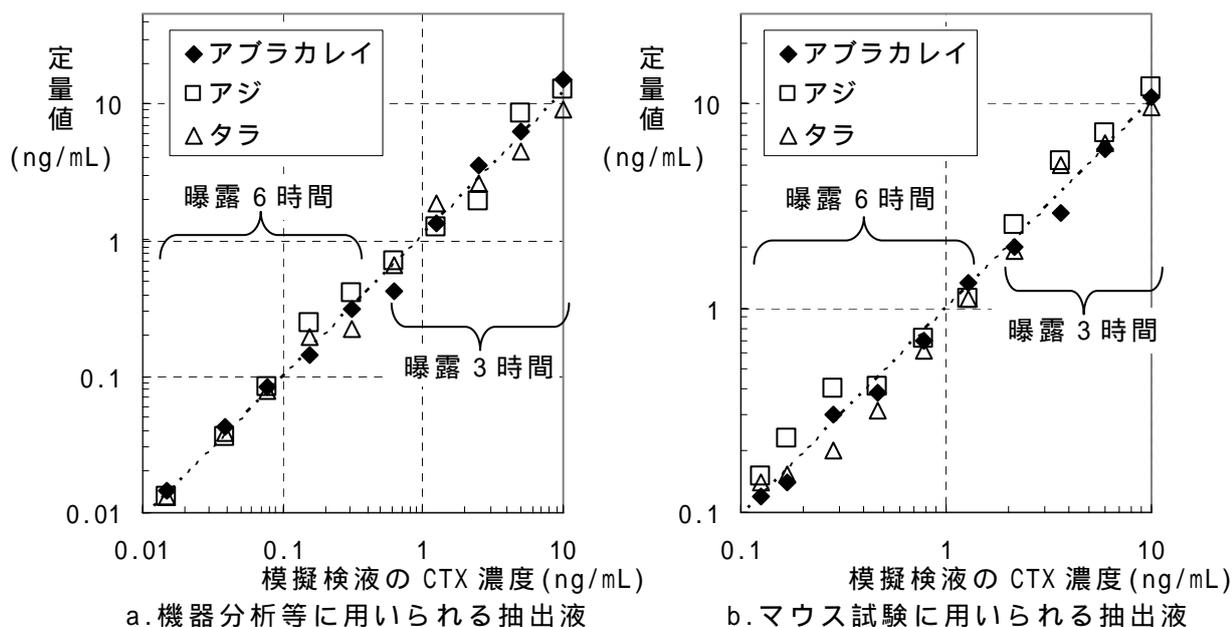


図 4 模擬検液による検討

注：破線は近似直線

表 1 検出感度の比較

	細胞試験法		マウス試験法
	(曝露 3 時間)	(曝露 6 時間)	(接種から 24 時間)
機器分析等に用いられる抽出液	0.967 pg/g	0.08 pg/g	-
マウス試験に用いられる抽出液	36.3 pg/g	3.0 pg/g	650 pg/g

に近く、定数項は 0 に近く、また強い相関関係がみられたため (R^2 値: 0.9896)、信頼性の高い定量が行えたと言える。前述の定量範囲から曝露 3 時間で 0.145 ng/mL 以上、6 時間で 0.012 ng/mL 以上の模擬検液を定量可能である。魚肉抽出液 1 mL は魚肉 150 g に相当するため、この抽出法と細胞試験法の組み合わせにより魚肉 1 g あたり曝露 3 時間では 0.967 pg 以上、6 時間では 0.08 pg 以上の CTX を定量可能であると考えられた。

4. 模擬検液の検討 - マウス試験で用いられる抽出法 (図 4 b)

マウス試験で用いられる抽出法による検討を行った。

無毒の魚肉抽出液を試験液として、0/V 液を加えずに毒性試験を行ったところ、細胞毒性がみられた(データ不掲載)。機器分析等で用いられる抽出液と比較して、マウス試験で用いられる抽出液は精製度が低いため、魚由来の成分による毒性が現れたものと考えられる。毒性の程度は魚種により異なり、いずれも 8 倍以上に希釈することで毒性はみられなくなった。

以上を踏まえ、模擬検液を 10 倍以上に希釈して細胞試験に用い、CTX 濃度の定量を行った(図 4 b)。模擬検液の CTX 濃度と試験による定量値の近似式は、 $\text{Log}_{10}[\text{定量値}] = 1.0232 * \text{Log}_{10}[\text{模擬検液の濃度}] - 0.0014$ で表された。近似式の傾き及び定数項の値、そして相関関係の強さ (R^2 値: 0.9825) から、信頼性の高い定量が行えたと言える。模擬検液を 10 倍以上に希釈することから、曝露 3 時間で 1.45 ng/mL 以上、6 時間で 0.12 ng/mL 以上の模擬検液を定量可能である。魚肉抽出液 1 mL は魚肉 40 g に相当するため、この抽出法と細胞試験法の組み合わせ

により魚肉 1 g あたり曝露時間 3 時間では 36.3 pg 以上、6 時間では 3.0 pg 以上の CTX を定量可能であると考えられた。

5. まとめ

本法では、CTX への曝露時間 3 時間で十分な感度で検出できたため、魚肉抽出液の添加から最短 5 時間(曝露 3 時間、呈色反応 1 時間、解析等 1 時間)で結果が得られる。また、模擬検液を用いた試験においても信頼性の高い定量が可能であった。

マウス試験法では毒力はマウス単位 (MU) で算出され、シガテラ毒の検出限界は魚肉 1 g あたり 0.025 MU である³⁾。今回の検討で用いた CTX 標準品では、1 MU は 26 ng に相当するため¹⁾、マウス試験法では魚肉 1 g あたり 650 pg を検出できる。今回検討した細胞試験法の検出限界は、最低でも魚肉 1 g あたり 36.3 pg であり、マウス試験法より検出感度に優れていた(表 1)。

また、マウス試験での定量には 240 g もの試料が必要となる³⁾。細胞毒性試験においては少量の試料からの定量が可能である。今回検討した機器分析等で用いられる抽出法では、試料 60 g から、定量に必要な充分量 (30 μ L) の 10 倍以上の魚肉抽出液を得た。

以上から、本法は、マウス試験法の代替法として十分に機能すると考えられる。本法を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 ELISA 法と比較すると、培養細胞を用いる検出法は生体活性を確認できる点や、高価な機器や抗体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、健康危機発生時には必要に応じて CTX 特異的な検出法との並行実施等を行う必要がある。

謝 辞

カラム精製についてご教示頂きました
医薬食品研究室の猪飼誉友室長、伊藤裕子
主任研究員に感謝申し上げます。

文 献

- 1) 大城直雅：シガテラ毒，食品衛生研究，60(1)，37-45，2010.
- 2) 厚生労働省：自然毒のリスクプロファイル(2012年12月19日現在);<http://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/poison/index.html>
- 3) 社団法人日本食品衛生協会：食品衛生検査指針理化学編，691-695，2005.
- 4) Caillaud A, de la Iglesia P, Darius HT, Pauillac S, Aligizaki K, Fraga S, Chinain M, Diogène J: Update on methodologies available for ciguatera toxin determination: perspectives to confront the onset of ciguatera fish poisoning in Europe, *Marine Drugs*, 8(6), 1838-1907, 2010.
- 5) Okumura M, Tsuzuki H, Tomita B: A rapid detection method for paralytic shellfish poisoning toxins by cell bioassay, *Toxicon*, 46(1), 93-98, 2005.
- 6) 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.
- 7) 林瑞那，秦眞美，館井浄子，長谷川晶子，藤浦明，皆川洋子：培養細胞を用いたパリトキシン毒性試験法の検討，*愛知県衛生研究所報*，61，31-38，2011.
- 8) Dickey RW: Ciguatera Toxins: Chemistry, Toxicology, and Detection, *Seafood and Freshwater Toxins Second Edition* (Luis MB eds), 479-500, 2008, CRC Press, New York.
- 9) Ricketts JH, Head GA: A five-parameter logistic equation for investigating asymmetry of curvature in baroreflex studies, *American Journal of Physiology*, 277(2), R441-R454, 1999.
- 10) 神足史人：Excelで操る！ここまでできる科学技術計算，36-42，2009，丸善出版，東京。

A cytolytic assay for the measurement of ciguatoxin

Mizuna Nakamura-Hayashi, Akiko Hasegawa, Rumiko Hayashi,
Mami Hata, Reiji Hiramatsu, Hiroko Minagawa

Marine toxins present in seafood are potential hazard for human health through foodborne intoxication, frequently with lethal consequences. Ciguatoxin is one of the most potent marine toxins. Recently, the number of patient reports intoxicated with ciguatoxin is increasing in Japan. Climate change due to global warming offers some explanation for this event. For effective public health practice, proper monitoring of ciguatoxin in seafood and its risk assessment are urgently required.

The traditional mouse bioassay is generally used for the quantification of ciguatoxin. However, this method is far from ideal, because of its requirement for a large amount of sample, and time-consuming procedure. The ethical problem regarding the use of experimental animals also exists. Therefore, alternative methods for the detection of ciguatoxin in seafood are now being sought.

Under these circumstances, we developed a cell-based assay for the detection and quantification of ciguatoxin. Our data demonstrated here indicated that the cytolytic assay using Neuro2a cell line can detect ciguatoxin within 5 hours after exposure through the use of ouabain and veratridine, and show higher sensitivity to ciguatoxin than mouse bioassay.

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

調査研究

2-アルキルシクロブタノン を指標とした 放射線照射食品の検知法の検討

上野英二、井上知美、大野春香、渡邊美奈恵、猪飼誉友、森下智雄

要 旨

ガスクロマトグラフィー/質量分析法 (GC-MS) による 2-アルキルシクロブタノン (2-ドデシルシクロブタノン、2-テトラデシルシクロブタノン) を指標とした放射線照射食品の検知法について検討した。牛肉を試料として、均一化した試料にケイソウ土を加えて混和したのち、n-ヘキサンで抽出した。抽出された脂質を分取してゲル浸透クロマトグラフィー (GPC)、次いで PSA/シリカゲルミニカラムクロマトグラフィーにより精製し、内標準に 2-シクロヘキシルシクロヘキサノン を添加して GC-MS により測定した。ブランク試料から抽出した脂質を陰性対照、ブランク試料から抽出した脂質に 2-ドデシルシクロブタノン及び 2-テトラデシルシクロブタノンを各 0.05 µg/g 添加したものを陽性対照として、4 個 (2 併行 2 日間) の陰性対照及び 16 個 (4 併行 4 日間) の陽性対照を分析したところ、すべて正しく判定できたことから、本法の放射線照射食品への適用の可能性が示唆された。

キーワード：放射線照射食品、2-アルキルシクロブタノン、2-ドデシルシクロブタノン、2-テトラデシルシクロブタノン、GC-MS

序 文

食品にガンマ線などの放射線を照射すると腐敗や食中毒の原因となる微生物が死滅するとともに、農産物では成熟、発芽等が抑制され、長期保存が可能となる。この技術は、食肉や香辛料などに多くの国で利用されている。しかし、日本では、馬鈴薯の発芽防止以外の目的での使用は原則認められていない¹⁾。

脂質を含む食品にガンマ線、電子線、エックス線を照射すると、トリグリセリドから 2-アルキルシクロブタノン (2-alkylcyclobutanones) が照射線量に比例して生成する。この物質は、放射線照射

以外のプロセスでは生成しないとされ、現在、国際食品規格である Codex を始め、国内でも脂質を多く含む畜水産食品を対象に

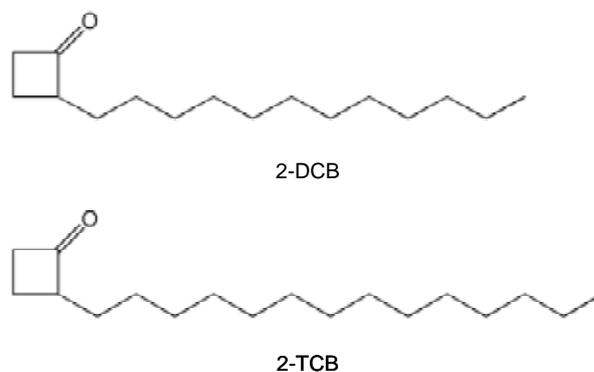


Fig. 1. Structure of 2-dodecylcyclobutanone (2-DCB) and 2-tetradecylcyclobutanone (2-TCB).

Table 1. Retention time and monitor ion of 3 compounds obtained by EI-Scan/SIM mode GC-MS

Compound	RT, min		Monitor ion, <i>m/z</i>		
	Rxi-5Sil MS	Rtx-200 MS	Scan	SIM	
				Target	Qualifier
2-CCH ^{a)}	8.55	7.95	-	98.1	-
2-DCB	12.04	10.50	95-115	98.1	112.1
2-TCB	14.40	12.36	95-115	98.1	112.1

^{a)} Internal standard.

して、パルミチン酸由来の 2-ドデシルシクロブタノン (2-dodecylcyclobutanone、以下 2-DCB) 及びステアリン酸由来の 2-テトラデシルシクロブタノン (2-tetradecylcyclobutanone、以下 2-TCB) (Fig. 1) を指標とする検知法が通知されている²⁾。本通知法はソックスレー装置を用いた抽出法、及びフロリジル (合成ケイ酸マグネシウム) を充てんしたオープンカラムを用いた精製法を採用しており、いずれも溶媒の使用量が多く、操作が煩雑で長時間を要するといった問題がある。そこで、試料調製にゲル浸透クロマトグラフィー (gel permeation chromatography, GPC)、エチレンジアミン-N-プロピルシリル化シリカゲル (primary secondary amine, PSA) ミニカラム/シリカゲルミニカラム連結クロマトグラフィーなどを採用した迅速な検知法を検討したので報告する。

実験方法

1. 試料

試料 (牛肉、500 g) は、愛知県内の小売店で購入した。

2. 試薬及び標準品

試薬は和光純薬工業 (株) または関東化学 (株) の残留農薬試験用を用いた。ケイソウ土は Merck 社製の Extrelut® を用いた。

2-DCB 及び 2-TCB 混合標準溶液 (10 µg/mL アセトン溶液) は林純薬工業 (株) の食品分析用を用い、穏やかな窒素気流下で溶媒

を揮散させたのち、n-ヘキサンに溶解して 1 µg/mL 標準原液とした。標準原液を n-ヘキサンで適宜希釈し、添加用及び検量線用の標準溶液とした。また、2-シクロヘキシルシクロヘキサノン (2-cyclohexylcyclohexanone、以下 2-CCH) 標準溶液 (100 µg/mL アセトン溶液) は林純薬工業 (株) の食品分析用を用い、穏やかな窒素気流下で溶媒を揮散させたのち、n-ヘキサンに溶解して 10 µg/mL 標準原液とした。標準原液を n-ヘキサンで適宜希釈し、内標準溶液とした。

PSA/シリカゲルミニカラムは、Waters 社製 Sep-Pak Plus Silica (690 mg) の手前に Agilent 社製 Bond Elut Jr-PSA (500 mg) を連結し、ジエチルエーテル - 石油エーテル (2 : 98) 10 mL、次いで石油エーテル 10 mL で洗浄したものを用いた。

3. 装置及び条件

GPC 装置 : (株) 島津製作所製 LC10 シリーズ GPC クリーンアップシステムに、昭和電工 (株) 製カラム CLNpak EV2000AC-12F (内径 12 mm、長さ 300 mm) 及びガードカラム CLNpak EV-G AC12C (内径 12 mm、長さ 100 mm) を装着し、カラム温度 45 °C、溶出液 アセトン - シクロヘキサン (15:85)、流速 3 mL/min、モニター波長 254 nm の条件で用いた。

GC-MS 装置 : (株) 島津製作所製 GCMS-QP2010Ultra (デュアルカラム MS システム付) に、Restek 社製の不活性処理済カスタムライナー (石英ウール入) デュアルカラム Restek 社製

Table 2. Elution of 2 compounds from GPC and PSA/Silica gel mini-column

Compound	GPC elution volume, mL (min)	PSA/Silica gel elution, % ^{a), b)}	
		Fraction 1	Fraction 2
2-DCB	22.5 - 27.3 (7.5-9.1)	0	97
2-TCB	21.6 - 26.4 (7.2-8.8)	0	98

^{a)} Mean of 3 replicates.

^{b)} Each compound (0.1 µg) in 2 mL petroleum ether was loaded on the column, and eluted with 10 mL of petroleum ether, followed with 2 mL of diethylether-petroleum ether (2:98) (Fraction 1), and eluted with 10 mL of diethylether-petroleum ether (2:98) (Fraction 2).

Rxi-5Sil MS (内径 0.25 mm、長さ 30 m、膜厚 0.25 µm) Restek 社製 Rtx-200MS (内径 0.25 mm、長さ 30 m、膜厚 0.25 µm) を装着して用いた³⁾。測定条件は、注入口温度 250 °C、カラム温度プログラム 60 °C (1 min) 20 °C /min 160 °C 8 °C /min 240 °C 25 °C /min 290 °C (7 min)、インターフェース温度 300 °C、イオン源温度 200 °C、イオン化法 EI、イオン化電圧 70eV、キャリアガス ヘリウム、キャリアガス線速度 40 cm/sec、注入量 1 µL、注入モード 高圧スプリットレス (250 kPa, 1 min)、測定モード (インターバル) SIM/スキャン同時取込 (0.2/0.2 sec)、スキャン範囲 95 ~ 115 m/z に設定した (Table 1)。

4. 分析操作

(1) 試験溶液の調製

ガラス製乳鉢に均一化した試料 5 g を量り採り、ケイソウ土 7.5 g を加えて乳棒で十分に粉碎・混和したのち、50 mL 容ポリプロピレンチューブに移した。これに n-ヘキサン 30 mL を加え、3 分間振とう抽出した。これを 3,100 回転/分で 5 分間遠心分離し、ヘキサン層を採取したのち、残さに n-ヘキサン 20 mL を加えて同様に操作し、ヘキサン層を合わせて綿栓ろ過した。ろ液を減圧濃縮後、70 °C で 20 分間 GC オープン中に放置して溶媒を完全に除去した。抽出さ

れた脂質の重量を量り、0.1 g 脂質/mL になるようにアセトン - シクロヘキサン (15 : 85) に溶解して試料原液とした。

試料原液を 3,100 回転/分で 5 分間遠心分離したのち、上清 2 mL (脂質 0.2 g 相当) を GPC 装置に注入し、7.2 ~ 9.2 分 (21.6 ~ 27.6 mL) に溶出する画分を 32 mL 容コレクターチューブ (内径 15 mm、長さ 150 mm) に分取した。この画分を穏やかな窒素気流下で約 0.5 mL まで濃縮し、石油エーテル 1 mL を加えてボルテックスミキサーで攪拌したのち、PSA/シリカゲルミニカラムに負荷した。コレクターチューブは、さらに石油エーテル 1 mL を加えて同様に操作し、同ミニカラムに負荷した。このミニカラムに石油エーテル 10 mL、次いでジエチルエーテル - 石油エーテル (2 : 98) 2 mL を注入し、流出液を捨てた。その後、PSA ミニカラムを取り外したのち、シリカゲルミニカラムにジエチルエーテル - 石油エーテル (2 : 98) 10 mL を注入して 10 mL 容濃縮管に溶出した。溶出液を穏やかな窒素気流下で乾固させ、器壁を洗い込みながら石油エーテルで 1 mL 容濃縮管に移した。これをさらに穏やかな窒素気流下で乾固させたのち、内標準溶液 (2-CCH, 0.1 µg/mL) 0.4 mL を加え、ボルテックスミキサーで攪拌して GC-MS 用の試験溶液 (0.5 g 脂質/mL) とし

た。

(2) 定性及び定量

GC-MS ワークステーションのデータ解析画面上で、SIM クロマトグラムとマススペクトルを表示させ、目視により保持時間、イオンの強度比、及び標準マススペクトルとの類似度を確認することにより定性を行ったのち、内標準法により定量した。

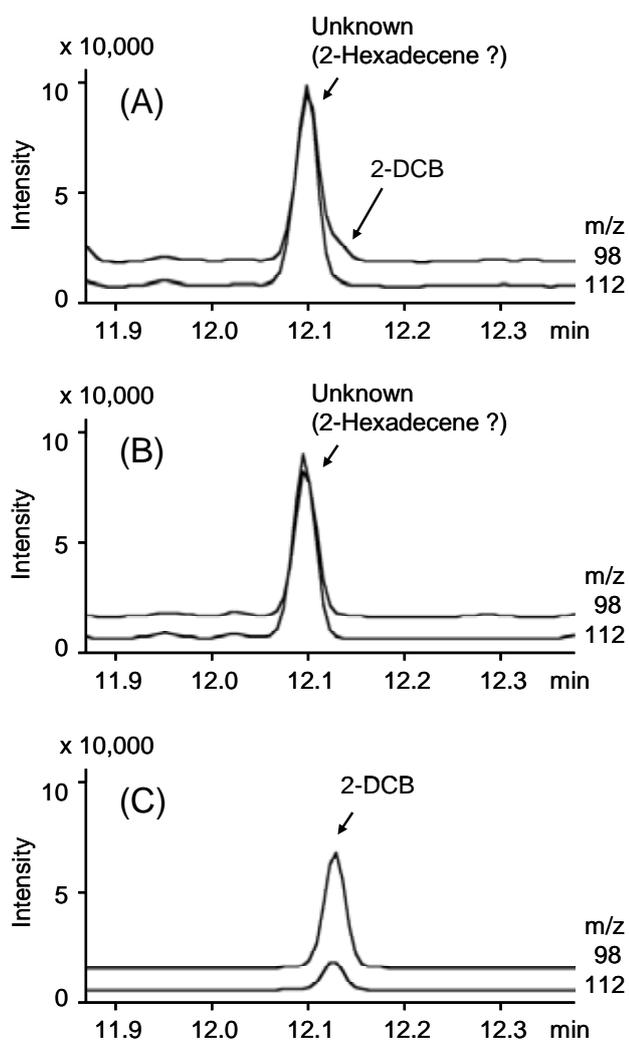


Fig. 2. Extracted ion chromatograms (Scan-mode, Rxi-5Sil MS column) of extract of beef lipid fortified with 0.05 µg/g of 2-DCB after PSA/Silica gel mini-column chromatography. (A) eluate with 10 mL of diethylether-petroleum ether (2:98) (No fractionation), (B) eluate with 10 mL of petroleum ether, followed with 2 mL of diethylether-petroleum ether (2:98) (Fraction 1), (C) eluate with 10 mL of diethylether-petroleum ether (2:98) after (B) (Fraction 2).

結果及び考察

1. GC-MS 条件

通知法では、Agilent 社製 DB-5ms カラムを採用している²⁾。しかし、m/z 98 及び m/z 112 のイオンをモニターする条件では、レバーなど食品によっては脂質成分由来の妨害ピークが少なからず出現し、定性が困難となる場合もあった。そこで、分離挙動の大きく異なる 2 種類のカラムを装着したデュアルカラム GC-MS システムを採用することにした³⁾。Restek 社製の 5% フェニル系カラム Rxi-5Sil MS 及びトリフルオロプロピル系カラム Rtx-200MS を装着し、定性・定量は前者、確認は後者により得られた SIM クロマトグラム及びマススペクトルを用いる方法とした (Table 1)。

2. 抽出法

通知法では、ソックスレー装置を用いて 6 時間還流抽出したのち、脱水のために無水硫酸ナトリウムを加えて一晩放置する²⁾。本法では、比較的硬い牛肉を脱水しながら、より細かく粉碎して脂質成分が抽出されやすくするために、ケイソウ土⁴⁾を加え、粗面に仕上げられたガラス製乳鉢と乳棒で回転を加えながら圧搾粉碎したのち、n-ヘキサンを加えて振とうする迅速な抽出法を採用した。

3. 脱脂・精製法

通知法では、550 で 5 時間活性化したのち、水を加えて一晩放置した不活性化フロリジルを調製し、これを湿式充てんしたオープンカラムを用いて脱脂・精製する²⁾。本法では、GPC により大部分の脂質成分を除去し、さらに、比較的 low molecular weight の脂肪酸を PSA ミニカラムで除去したのち、シリカゲルミニカラムクロマトグラフィーにより分画・精製する方法を採用した。Table 2 に示したように両成分は GPC において 7.2 ~ 9.1 min (21.6 ~ 27.3 mL) の画分に溶出したことから、この画分のみを選択的に分取することにした。一方、トリグリセリドなどの脂質成分は 5.5 ~ 7.2 min (16.5 ~ 21.6 mL) の画分に溶出し、高い脱脂・精製効果が期待された。次に、Fig. 2(A) に示したよ

Table 3. Analytical results of blank and fortified beef samples

Compound	Sample	No. of samples	Evaluation item ^{a)}					Judgment
			1) S/N		2) Peak area ratio against standard ion ratio (m/z 112/98), %	3) Sum of relative intensities at m/z 98 and 112 in m/z 95-115, % ^{b)}	4) Concentration, $\mu\text{g/g}$ lipid (Recovery, %)	
			m/z 98	m/z 112				
2-DCB	Blank	4	–	–	–	5–8	N.D.	All negative
	Fortified ^{c)}	16	43–48	31–35	-9 – -2	74–82	0.038–0.041 (76.4–82.4)	All positive
2-TCB	Blank	4	–	–	–	3–7	N.D.	All negative
	Fortified ^{c)}	16	40–47	29–37	-3 – +5	69–78	0.041–0.045 (81.3–89.1)	All positive

^{a)} Each item was evaluated by the SIM chromatograms and the MS spectra obtained by Rxi-5Sil MS column.

^{b)} 3) was obtained by the MS spectra in scanning measurement.

^{c)} Samples were fortified with 0.05 $\mu\text{g/g}$ of each compound.

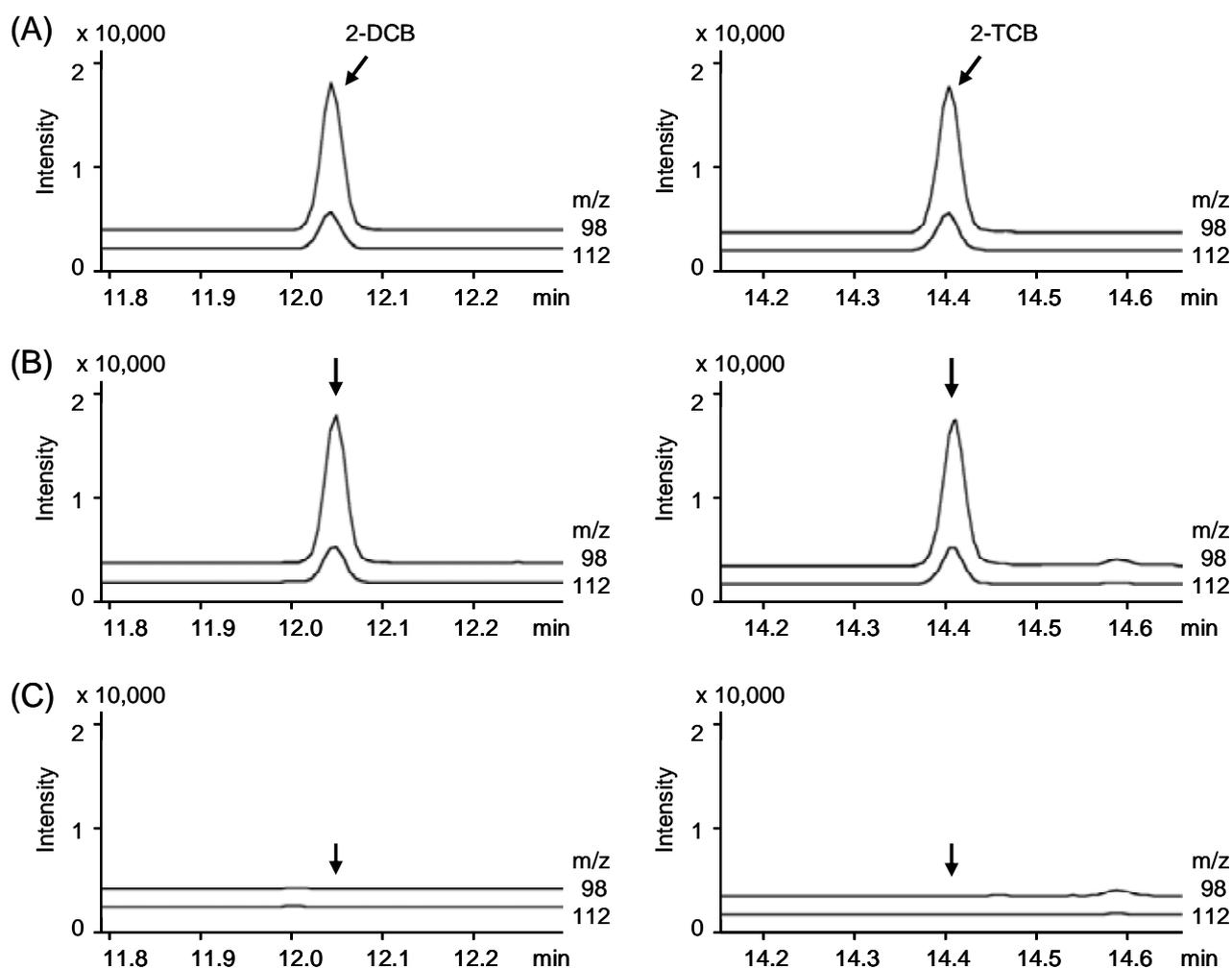


Fig. 3. SIM chromatograms (Rxi-5Sil MS column) of (A) 0.025 $\mu\text{g/mL}$ standard mixture of 2-DCB and 2-TCB, (B) extract of beef lipid fortified with 0.05 $\mu\text{g/g}$ of each compound, (C) extract of blank beef lipid.

うに、PSA/シリカゲルミニカラムに GPC 精製後の試料溶液を負荷したのち、ジエチルエーテル - 石油エーテル (2 : 98) 10 mL で溶出したところ、Rxi-5SiI MS カラムにより得られたクロマトグラム上に 2-ヘキサデセン類と見られるピークが出現して 2-DCB のピークと重なり、定性が困難であった。このためミニカラムを石油エーテル 10 mL、次いでジエチルエーテル - 石油エーテル (2 : 98) 2 mL で洗浄して妨害成分を除去したのち (Fig. 2(B))、ジエチルエーテル - 石油エーテル (2 : 98) 10 mL で両成分を溶出する方法とした (Fig. 2(C)) (Table 2)。なお、窒素気流下での濃縮効率を高めるために、n-ヘキサンに代えて揮発性の高い石油エーテルを用いることにした。本法ではミニカラム吸引精製システム⁵⁾を用いたが、減圧条件下でジエチルエーテル - 石油エーテル (2 : 98) が気化しないように PSA ミニカラムを取り外したのち、シリカゲルミニカラムから両成分を溶出することにした。

4. 性能評価試験

通知法に示されている方法²⁾に従って、本法の性能評価試験を実施した。すなわちブランク試料から抽出した脂質を陰性対照、ブランク試料から抽出した脂質に 2-DCB 及び 2-TCB 標準品を 0.05 µg/g 添加したものを陽性対照として 4 つの判定項目により評価した。Table 3 に示したように、4 個 (2 併行 2 日間) の陰性対照を分析したところ、1) m/z 98 及び m/z 112 の SIM クロマトグラム上にピーク (S/N 3) は認められず、すべて陰性と判定された。次に、16 個 (4 併行 4 日間) の陽性対照を分析したところ、1) m/z 98 及び m/z 112 の SIM クロマトグラム上にピーク (S/N 3) がすべて認められた。2) 認められたピークの面積比 (m/z 112/98) は、m/z 98 の SIM クロマトグラムにおいて近似した面積を与える標準品のピーク面積比 (m/z 112/98) のすべて ±20% 以内であった。3) スキャン測定で得られたマ

ススペクトル (m/z 95 ~ 115) において、m/z 98 及び m/z 112 がすべて主要イオン (相対イオン強度の合計が 50% 以上) であった。4) 上記 1) ~ 3) の項目を満たしており、すべての定量値が検出限界濃度 (両成分ともに 0.003 µg/g、S/N=3) 以上であった。以上、すべての陽性対照についても全判定項目を満足しており、陽性と判定された。Fig. 3 に Rxi-5SiI MS カラムにより得られた標準溶液、標準品を添加した牛肉の試験溶液、及び牛肉のブランク試験溶液の SIM クロマトグラムを示した。このように陰性及び陽性対照ともにすべて正しく判定できたことから、本法の放射線照射食品への適用の可能性が示唆された。

文 献

- 1) 厚生省告示“食品添加物等の規格基準”，昭和 34 年 12 月 28 日付け第 370 号，1959.
- 2) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知“放射線照射された食品の検知法について”平成 19 年 7 月 6 日付け食安発第 0706001 号，2007.
- 3) 上野英二：ガスクロマトグラフィー/質量分析法の農薬残留分析への利用：GC-MS および GC-MS/MS を用いた食品中の農薬残留分析，日本農薬学会誌，36(4)，544 - 558，2011.
- 4) 上野英二：多孔性ケイソウ土カラムクロマトグラフィーの農薬残留分析への利用，日本農薬学会誌，35(1)，74 - 78，2010.
- 5) Ueno E, Oshima H, Saito I, Matsumoto H: Determination of nitrogen- and phosphorus-containing pesticide residues in vegetables by GC-NPD and -FPD after GPC and a two-step mini-column cleanup, Journal of AOAC International, 86(6), 1241-1251, 2003.

Detection of irradiated foods using 2-alkylcyclobutanones as markers

Eiji Ueno, Tomomi Inoue, Haruka Ohno, Minae Watanabe,
Yoshitomo Ikai, Toshio Morishita

A method has been developed for the detection of irradiated food using 2-alkylcyclobutanones (2-dodecylcyclobutanone and 2-tetradecylcyclobutanone) as markers. Beef sample pestled with diatomaceous earth was extracted with n-hexane. An aliquot of the extracted lipid was cleanup by gel permeation chromatography and PSA/silica gel mini-column chromatography. The test solution spiked with 2-cyclohexylcyclohexanone as an internal standard was subjected to gas chromatography with mass spectrometry. Lipids extracted from blank sample were used as negative controls. Further, negative samples fortified with 2-dodecylcyclobutanone and 2-tetradecylcyclobutanone were used as positive controls. In the performance evaluation test, 4 negative and 16 positive controls were analyzed to verify the method's ability to detect irradiation. All of the negative controls were judged negative, and all of the positive controls were judged positive. These results suggest that the present method is able to detect irradiation in foods such as animal and fishery products.

Key words : irradiated food, 2-alkylcyclobutanone, 2-dodecylcyclobutanone, 2-tetradecylcyclobutanone, GC-MS

調 査 研 究

愛知県における可燃性温泉付随ガスの賦存状況について

小池恭子、松田達也、山本優子、伊藤徹¹⁾、森下智雄、林留美子、大沼章子²⁾

1)衣浦東部保健所、2)中部大学

要 旨

2007年6月に発生した可燃性温泉付随ガス(メタン)による爆発事故を契機に温泉法が改正され、全ての温泉施設においてメタン濃度の測定が義務付けられた。

当所では愛知県内64か所の温泉源(未利用源泉3か所を含む)についてメタンの現場検査を実施し、県内温泉中のメタンの賦存状況と温泉成分、地域特性等について解析した。

現場検査をした64か所中34か所(53%)で安全対策が必要な基準を超えるレベルのメタンが検出された。基準を超えた源泉は、地形・地質的な特性による地域区分で見ると、尾張平野部 14/16(88%)、知多半島を含む尾張東部丘陵部 12/17(71%)、三河平野部 5/10(50%)、三河山間部 3/21(14%)であった。

本調査により、メタンは尾張地域に比較的多く賦存していることが明らかになった。この地域は、第三紀の堆積層から温泉を汲み上げておりメタンの分布は温泉が湧出する地点の地質依存性が高いと推測された。また、メタンを検出した温泉の泉温は34以上、pHは弱アルカリ性、電気伝導率が比較的高く、成分的にはナトリウムイオン、塩化物イオンを主成分とするものが多いという傾向がみられた。

キーワード：可燃性温泉付随ガス(メタン)、温泉成分、地域特性

序 文

2007年6月、東京都の温泉施設において3名もの死亡者を出す爆発事故が発生した。原因は温泉水に付随して湧出した可燃性天然ガスのメタンによるものであった。

環境省は同年11月温泉法を改正、2008年10月から施行し、温泉施設に対する安全対策を強化した。これにより、温泉を汲み上げているまたは汲み上げようとする全ての事業者は温泉施設におけるメタン濃度を確認し、源泉のメタン濃度が基準値を超えている場合には、ガスの分離低減化等の安全対策を実施することが義務付けられた。メタンは空気中濃度が5~15%の濃度範囲

のとき、火源に触れると急激に燃焼して爆発を起こす。爆発を起こす最低濃度(メタンの場合5%)を爆発下限界として100%LEL(Lower explosion Limit)で表し、この濃度に安全を考慮してメタンの基準値は定められている。

愛知県では2012年12月現在、133の源泉が温泉台帳に登録されており、そのうち101か所が利用されている。当所では未利用源泉3か所を含む64か所においてメタンの現場検査を実施し、これら温泉の水質状況と地域特性、温泉付随ガスの賦存状況を調査したので報告する。

表1 温泉の可燃性天然ガスの測定方法と基準値

測定方法	源泉の状況	基準値
水上置換法	(水上置換法で温泉付随ガスが収集できる場合)	50 %LEL
槽内空気測定法	(ができなくて貯湯槽が設置されている場合)	25 %LEL
ヘッドスペース法	(ができなくて貯湯槽が設置されていない場合)	5 %LEL

調査方法

1. 調査対象及び調査期間

愛知県内の温泉 64 か所について、2008～2012年に調査を実施した。調査地点は図1に示した。

2. 現場調査

源泉におけるメタン濃度は、「温泉法におけるメタン濃度測定手法マニュアル」(環境省自然環境局 2008年7月策定、12月改訂)¹⁾に従い測定した。測定には接触燃焼式ガスセンサー(新コスモス電機社製 XP-3110)を使用し、表1に示したように源泉での状況に応じて測定方法を選択した。同表の基準値以下の場合をメタン不検出として扱った。

水上置換法

源泉井戸に最も近い開口部において、予め温泉水で満たした100 mL広口ポリスチレン製容器に空気が入らないように温泉付随ガスを採取し、温泉水全てをガスで置換した後、容器の開口部分を下にしたままガスセンサーの検出器部分を容器中に入れて測定した(31か所)。

槽内空気測定法

温泉井戸から最初に入るガス分離設備または貯水槽のガス排出口か槽内のメタン濃度を測定した。測定は、利用時の最高水位で可能な限り常時温泉水が流入する状態で実施した(10か所)。

ヘッドスペース法

容量3.7 Lのポリエチレン容器に温泉水0.72 L(液相:気相=1:4)を採取、密栓し5分間よく振とうした後に開栓、容器の開口部分を横にして直ちにガスセンサーの検出器部分を容器の気相部分に入れて測定した(23か所)。

その他、泉温(標準温度計による)、気温、

湧出量、ガス水比(メスシリンダー等による簡易測定)及び電気伝導率を測定した。

3. 温泉付随ガスの成分分析

水上置換によってガスの採取が可能な温泉水について、JIS K 2301「燃料ガス及び天然ガス-分析・試験方法」に準じて温泉付随ガスの成分分析を実施した。試料ガスは、予め温泉水で満たした揮発性有機化合物(VOC)測定用の100 mLガラスバイアルに温泉水を少量残して採取し、水中で密栓後、倒置保冷して実験室に搬入した。この試料を熱伝導度型(TCD)ガスクロマトグラフ(GL Sciences社製 GC-3200)を用い、以下の条件でメタン、酸素、窒素、二酸化炭素の濃度を測定した。

カラム: WG-100SUS 1.8 m×1/4 mm

キャリアガス: ヘリウム 33 mL/min

注入口温度: 50 オープン温度: 50

検出器: TCD 120 mA 温度: 50

標準は1Lのテトラパックに純空気700 mL、メタン標準品300 mLを混合したものを100 µLシリンジにて20、40、60、80、100 µL注入して検量線を作成した。

試料は20～100 µLを注入し、検出された酸素は混入した空気起源とみなしてその他のガス濃度を補正した。

4. 温泉水の成分分析

鉱泉分析法指針²⁾に準じて実施した。なお、本調査で成分分析できなかった温泉については、当所において2001年以降分析したデータを解析に使用した。

結果

1. 調査した温泉の位置及び泉質

今回調査を実施した温泉の位置とガスクロマトグラフ(以下GC)による温泉付随ガス中のメタン濃度の結果を泉質別に図1に

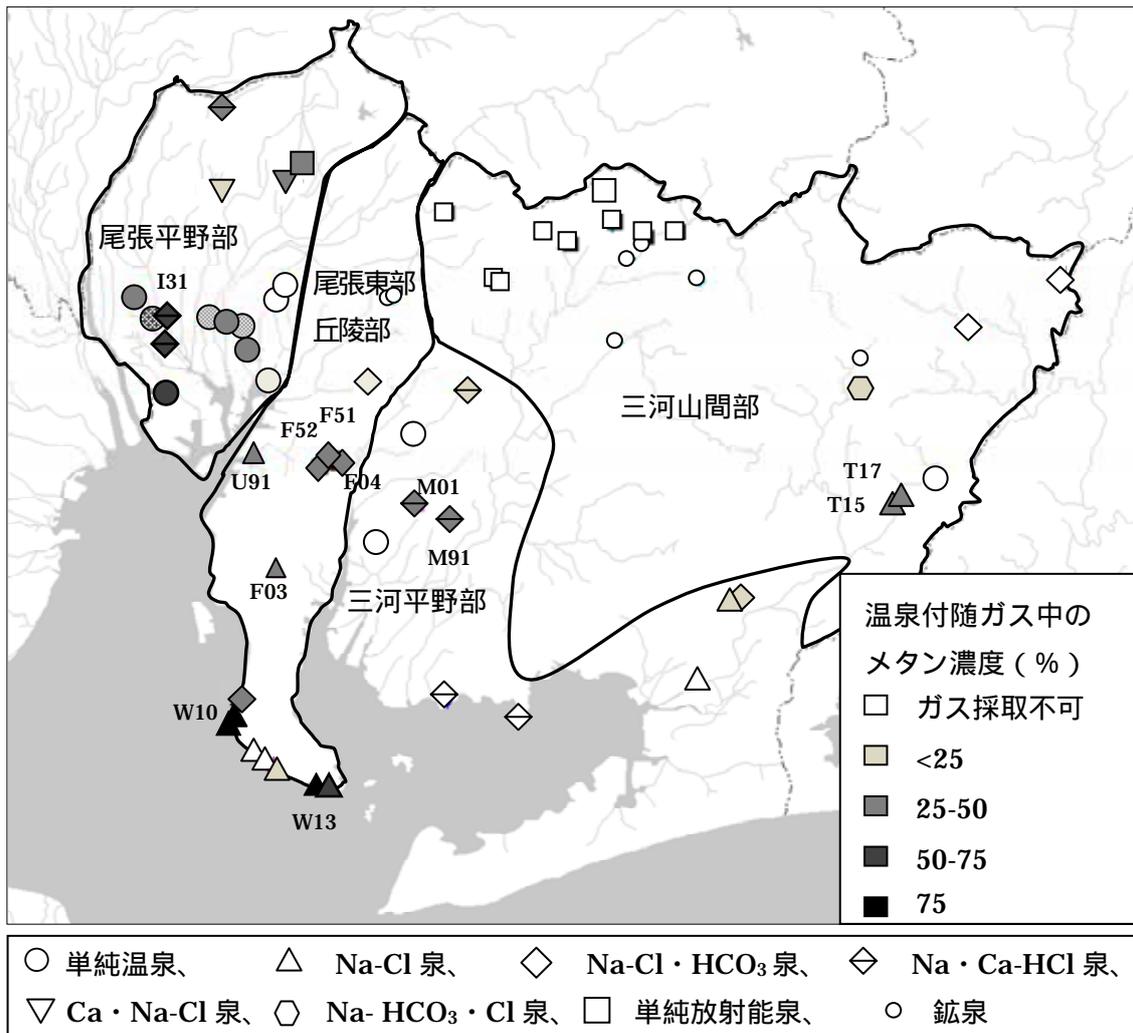


図 1. 調査した温泉位置と付随ガス中のメタン濃度

示した。また、温泉現場での調査結果と GC による温泉付随ガス中のメタン濃度の結果を、地質や地形的な特性による地域区別に表 2 に示した。検査を実施した 64 か所中 34 か所(53%)において基準を超えるメタンが検出された。検出率を地域区別にみると、尾張平野部では 14/16(88%)、知多半島を含む尾張東部丘陵部では 12/17(71%)、三河平野部では 5/10(50%)及び三河山間部では 3/21(14%)であり、尾張地域においてメタン濃度の高い傾向が見られた。

メタンの検出された温泉を泉質別にみると、単純温泉 8 か所、ナトリウム - 塩化物泉 (ナトリウム・カルシウム - 塩化物泉、ナトリウム - 塩化物・炭酸水素塩泉を含む) 22 か所、カルシウム・ナトリウム - 塩化物

泉 2 か所、ナトリウム - 炭酸水素・塩化物泉 1 か所及び単純弱放射能泉 1 か所であり、泉質名のつかない冷鉱泉からはメタンは検出されなかった。メタンの検出された単純温泉、単純弱放射能泉の 9 か所は全て尾張平野部にあった。県全体では塩化ナトリウムを主成分とする温泉にメタン濃度の高い傾向があった。

2. 温泉成分とメタン検出状況との関係

図 2 に示したようにメタンが検出されたのは、深度 500 m 以上 1000 m 未満の井戸では 8/14(57%)、1000 m 以上の井戸では 25/34(76%)であったが、深度 500 m 未満の井戸では 1/17(6%)のみであり、深度の深い温泉井戸ほど高い確率でメタンが検出された。

現場調査時の泉温とメタン検出状況を図3に示した。冷鉱泉に分類される25未満の井戸からのメタンの検出率は2/25(8.0%)であったが、低温泉(25~34)では19/26(73%)、温泉、高温泉に分類される34以上では13か所全てから検出され、泉温が高いほどメタンの検出率は高くなった。

pHについては、弱アルカリ性(7.5~8.5)に分類される温泉からメタンが21/29(72%)と高率に検出された(図4)。

電気伝導率については100 mS/m以上でメタンの検出率は28/36(78%)であり、100 mS/m未満の場合の6/28(21%)よりも高い

傾向があった(図5)。

メタンを検出した温泉と検出しなかった温泉において、各成分の中央値についてMann-Whitneyの順位和検定を実施したところ、メタンを検出した温泉において陽イオンではアンモニウムイオン、ナトリウムイオン、カルシウムイオン、マンガンイオン、リチウムイオン、ストロンチウムイオン及びバリウムイオン、陰イオンでは塩化物イオン、炭酸水素イオン、臭化物イオン及びヨウ化物イオン、非解離成分ではメタホウ酸が有意($P < 0.01$)に高濃度であった。また、硫酸イオンは有意($P < 0.01$)に低濃度であった。

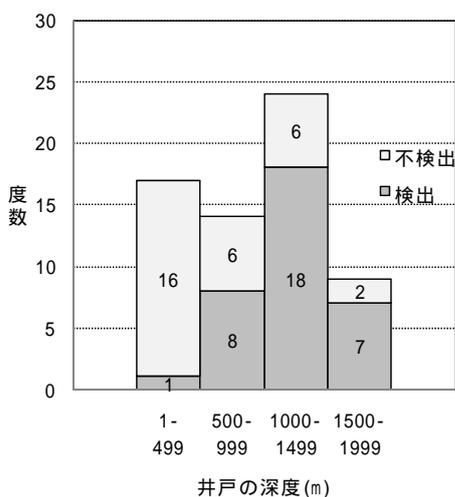


図2. 井戸の深度とメタン検出状況

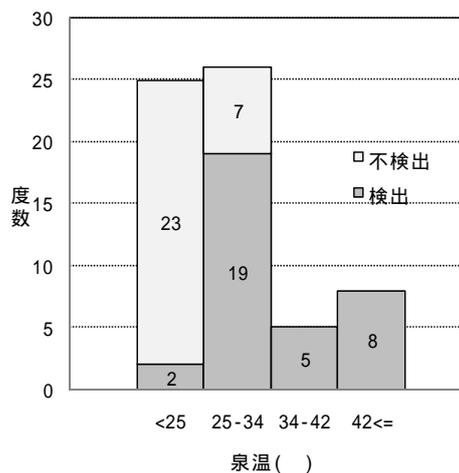


図3. 泉温とメタン検出状況

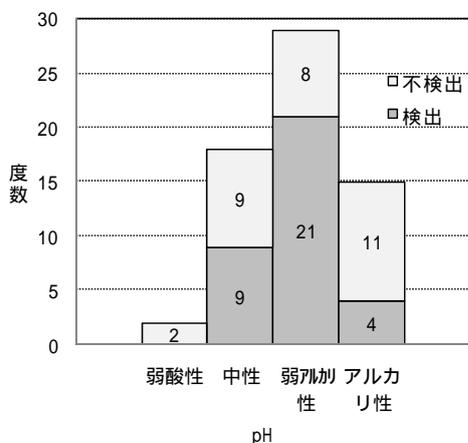


図4 pHとメタン検出状況

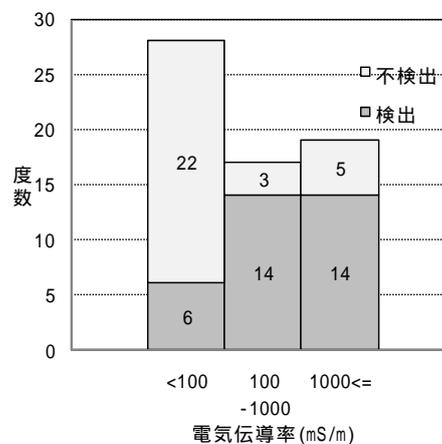


図5. 電気伝導率とメタン検出状況

表2. 愛知県の地域別温泉付随ガスの調査結果

地域	コトド	深度 (m)	泉質	pH	現 場 調 査					GC結果 ^{*4}			試算値	
					泉温 ()	電気伝 導率 (mS/m)	湧出量 (L/min)	水/ガ ス比	*1 *2 検査 方法	*3 結果	付随ガスの割合 (%)			CH ₄ 湧出量 (L/min)
									CH ₄	N ₂	CO ₂			
尾張 平野部	A01	1,085	単純温泉	7.5	42.1	100	240	30		+	37	63	0.1	2.9
	A02	1,200	単純温泉	7.4	39.0	71	250	60		+	44	56	0.4	1.8
	A09	801	単純温泉	7.3	33.6	40	45	×		+	-	-	-	-
	A92	1,008	単純温泉	7.1	38.7	29	165	×		+	-	-	-	-
	A97	1,000	単純温泉	7.7	34.8	55	150	200		+	21	78	0.0	0.16
	D01	1,100	Ca・Na-Cl泉	7.4	27.8	1,500	110	16		+	10	90	0.1	0.66
	I04	1,253	単純温泉	8.1	44.2	47	260	30		+	62	37	0.3	5.4
	I05	1,233	Na-Cl・HCO ₃ 泉	7.6	49.1	260	770	13		+	71	28	0.5	42
	I31	1,230	Na-Cl・HCO ₃ 泉	7.7	48.5	200	1300	4		+	73	28	0.0	240
	I32	1,251	単純温泉	7.6	50.0	130	1000	36		+	-	-	-	-
	I91	800	単純温泉	8.0	32.9	38	97	2400		+	27	73	0.2	0.01
	P92	1,851	Na・Ca-Cl泉	7.9	30.8	210	41	70		+	33	66	0.7	0.19
	R04	1,000	Ca・Na-Cl泉	8.1	32.0	880	260	5		+	44	56	0.1	23
	R06	564	単純弱放射能温泉	9.5	26.5	170	370	400		+	26	74	0.0	0.24
A06	630	単純温泉	7.3	29.2	15	64	-		-	-	-	-	-	
A95	700	単純温泉	7.1	23.5	14	66	-		-	-	-	-	-	
尾張 東部 丘陵部	A11	1,200	Na-Cl・HCO ₃ 泉	8.5	31.0	120	350	18		+	22	77	0.1	4.4
	F03	1,500	Na-Cl強塩泉	7.7	55.3	3,800	100	1		+	38	59	3.4	38
	F04	870	Na-Cl・HCO ₃ 泉	7.6	41.7	3,200	240	1.6		+	31	48	21	47
	F51	1,055	Na-Cl・HCO ₃ 泉	7.3	40.5	2,600	220	2.4		+	32	46	22	29
	F52	1,500	Na-Cl・HCO ₃ 泉	7.6	43.1	2,800	330	4		+	33	46	21	27
	U91	801	Na-Cl強塩泉	7.0	27.0	440	130	3		+	48	51	1.4	21
	W06	1,250	Na-Cl強塩泉	6.9	21.6	3,800	85	8		+	6 ^{*5}	76	0.9	0.7
	W07	1,630	Na-Cl強塩泉	7.6	30.6	3,500	0.9	0.8		+	61	39	0.1	1
	W09	1,200	Na-Cl泉	7.8	28.3	2,200	34	11		+	77	22	0.4	2.4
	W10	1,500	Na-Cl強塩泉	7.5	28.5	4,200	39	3		+	96	4	0.0	12
	W13	1,500	Na-Cl強塩泉	7.7	29.2	4,000	31	2		+	86	14	0.1	13
	W14	1,500	Na-Cl・HCO ₃ 泉	7.7	51.5	1,900	330	4		+	37	54	9.0	27
	E02	87	単純弱放射能泉	9.6	18.4	23	3.1	-		-	-	-	-	-
	E41	105	-	5.8	17.6	9	80	-		-	-	-	-	-
E42	114	-	6.1	17.1	9	170	-		-	-	-	-	-	
W05	1,300	Na-Cl強塩泉	7.5	28.5	4,700	380	-		-	-	-	-	-	
W08	1,303	Na-Cl強塩泉	7.6	22.0	4,200	250	-		-	-	-	-	-	
三河 平野部	H41	1,100	Na-Cl泉	8.0	29.2	300	13	4		+	20	80	0.2	0.6
	H42	1,300	Na-Cl・HCO ₃ 泉	8.5	26.4	130	18	11		+	20	80	0.2	0.3
	L23	1,300	Na・Ca-Cl泉	8.4	26.2	1,200	1.8	2.4		+	21	7	0.0	0.2
	M01	650	Na・Ca-Cl泉	7.9	32.7	1,500	66	4		+	42	58	0.0	6.9
	M91	900	Na・Ca-Cl泉	8.1	31.9	1,600	130	3.6		+	36	64	0.0	13
	H92	1,200	Na-Cl泉	7.6	23.0	2,800	86	2		-	-	-	-	-
	J02	480	単純温泉	7.0	26.1	25	200	-		-	-	-	-	-
	K02	500	-	6.4	18.9	11	70	-		-	-	-	-	-
N02	1,600	Na・Mg・Ca-Cl泉	7.4	20.2	1,400	26	600		-	-	-	-	-	
O07	701	Na・Ca・Mg-Cl泉	7.2	24.9	3,250	8	-		-	-	-	-	-	

表2. 愛知県の地域別温泉付随ガスの調査結果

(続き)

地域	コード	深度 (m)	泉質	pH	現場調査					GC結果*4			試算値 CH ₄ 湧出量 (L/min)	
					水温 ()	電気伝 導率 (mS/m)	湧出量 (L/min)	水/ガ ス比	*1 検査 方法	*2 結果	*3	付随ガスの割合 (%)		
									CH ₄	N ₂	CO ₂			
	T15	500	Na・Ca-Cl泉	7.4	28.4	280	500	18		+	27	73	0.1	7.5
	T17	1,200	Na・Ca-Cl泉	7.4	33.9	620	340	4		+	34	66	0.1	29
	Y06	1	Na-HCO ₃ ・Cl泉	8.9	16.1	130	2.2	-		+	-	-	-	-
三 河 山 間 部	L01	1	単純放射能泉	10.1	15.0	17	-	-		-	-	-	-	-
	L04	1	単純弱放射能泉	6.7	15.2	110	2	-		-	-	-	-	-
	L11	1	単純弱放射能泉	9.5	19.6	27	-	-		-	-	-	-	-
	L211	565	単純弱放射能泉	9.6	22.8	18	26	-		-	-	-	-	-
	L212	600	単純弱放射能泉	8.5	20.9	20	20	-		-	-	-	-	-
	L251	5	-	6.0	18.3	13	2	-		-	-	-	-	-
	L252	4	単純弱放射能泉	4.5	19.8	26	0.1	-		-	-	-	-	-
	L91	1,568	単純弱放射能温泉	9.2	29.2	22	90	-		-	-	-	-	-
	T07	1,302	アルカリ性単純温泉	8.3	27.1	24	250	-		-	-	-	-	-
	X01	2	-	9.0	18.4	77	-	-		-	-	-	-	-
	X03	1	単純弱放射能泉	8.4	20.1	35	4.8	-		-	-	-	-	-
	X06	1	-	8.1	21.1	35	-	-		-	-	-	-	-
	X08	1	-	9.8	20.8	20	-	-		-	-	-	-	-
	X21	2	-	10.0	18.1	42	2.8	-		-	-	-	-	-
X23	1	-	9.7	15.9	28	-	-		-	-	-	-	-	
Y05	1	-	9.2	14.2	80	0.4	-		-	-	-	-	-	
Y13	1,004	アルカリ性単純温泉	8.9	30.0	110	100	-		-	-	-	-	-	
Y14	1,000	Na-Cl・HCO ₃ 泉	8.6	30.3	270	170	-		-	-	-	-	-	

*1: x ; 井戸の構造上源泉での採取ができず、測定不能、 - ; ガス量少なく測定不能

*2: ; 水上置換法、 ; 槽内空気測定法、 ; ヘッドスペース法

*3: + ; 基準値超過、 - ; 基準値内

*4: - ; GC測定未実施

*5: 酸素による補正を実施していない。酸素濃度11%

3. 地質とメタン賦存量の関連

図1及び表2に、愛知県を地形・地質的な特性によって4つの地域に区分して調査結果を示した。県西部に位置する尾張平野部の温泉はほとんどが深さ1000m以上の堆積層(第三紀中新世師崎層群及び第三紀鮮新世東海層群)から湧出しており³⁾、県内では比較的泉温が高く湧出量も多い。特に南部に位置する海部地域のI31では付随ガス中のメタン濃度が73%と高く湧出量も多いので、本調査において最大のメタン湧出量を示した。この地域は、過去に三重県長島地区とともに天然ガス採取を目的に試掘が行われた地域であり、メタン賦存量は県内では比較的高いと推定された。

尾張東部丘陵部の南部に伸びる知多半

島は、第三紀中新世に形成された海成層を含む堆積層(師崎層群)からなっている。知多半島の温泉は溶存物質が多く主成分は塩化ナトリウムであり、硫酸イオンをほとんど含まない化石海水と推定される。知多半島南部の温泉(W10とW13)は付随ガス中のメタン濃度が85%以上と高いが、湧出量が少ないのでメタンの賦存量はあまり高くないと推定された。一方、知多半島中北部の温泉(F03、F04、F51、F52及びU91)では付随ガス中のメタン濃度は30~40%台であるが湧出量が多くメタン賦存量がやや高い傾向が見られた。

三河平野部は沖積層、洪積層の下部に領家帯変成岩類³⁾が存在している。メタン濃度の比較的高いM01とM91は、柱状図によ

ると深部は花崗斑レイ岩や花崗閃緑岩であるが、堆積層からも温泉を汲み上げている。メタンの湧出量は少なく賦存量は高くないと推定された。

三河山間部では、ほとんどの温泉でガスの採取ができず、メタン賦存量は低いと推測された。地質的には北西部はほとんどが先新生代の花崗岩からなり、温泉は自然湧出する放射能泉が多い。メタンの湧出がみられた T15 及び T17 は三河山間部の南東部にあり、柱状図によると亀裂の多い流紋岩から湧出しており、近傍の海成堆積層である第三紀中新世設楽層群の影響が考えられた。

考 察

本県のメタン検出率 53% は、既に報告されている北海道の約 16%⁴⁾、兵庫県の約 21%⁵⁾ より高かった。本県では 1963 年隣接する三重県長島地域での温泉湧出を契機に 1000 m を超える深度の温泉の開発が始まり、現在では 1000 m 以上の大深度温泉といわれる温泉が温泉台帳 133 か所中 78 か所と 59%、500m 以上の井戸を含めると 101 件と 76% を占めている。本調査の結果より、メタンは 500 m 以上の深度の温泉において検出されることが多いことから、50% を超えるメタン検出率は本県に大深度温泉が多いことが一因かと思われる。

メタンを検出した温泉水の泉温は 34 以上、pH は弱アルカリ性、電気伝導率が比較的高く、成分的にはナトリウムイオン、塩化物イオンを主成分とするものが多いという特徴がみられた。温泉付随ガス中のメタン濃度が高い知多半島南部の温泉は塩化ナトリウムを主成分としアンモニウムイオン濃度が高く、硫酸イオンはほとんど検出されない還元的な状態にあり、化石海水と推測された。また、炭酸水素イオン、ヨウ化物イオン及び臭化物イオンが高い傾向にあり、化石海水由来と推測されている南関東ガス田における報告^{6,7)}と同様、これらの成分は有機物起源と考えられた。一方、海部地域の温泉は化石海水の影響が少なくと考えられ、電気伝導率から推測されるよ

うに知多半島に比べて溶存物質量は少ないが、メタン検出温泉において同様の水質組成傾向がみられた。

本調査により、メタンは尾張平野部の海部地域と知多半島中北部の地域に比較的多く賦存していることが明らかになった。この地域の温泉は第三紀の堆積層から湧出しており、メタンの賦存は温泉を汲み上げる地点の地質に依存性が高いことが推定された。

謝 辞

本調査の実施にあたって、愛知県健康福祉部健康担当生活衛生課（検査管理グループ）の皆様のご協力にあらためて深謝いたします。

文 献

- 1) 環境省自然環境局：温泉法におけるメタン濃度測定手法マニュアル、2008 年 7 月策定、12 月改訂
- 2) 環境省自然環境局：鉱泉分析法指針（改訂）、2002
- 3) 松澤勲編 自然史編纂調査会：東海の自然史 1-94、2000
- 4) 内野栄治、青柳直樹、中山憲司：北海道における改正温泉法によるメタン検出温泉の分布とその地球化学的特徴、温泉科学、59、282-294、2010.
- 5) 矢野美穂、川元達彦：接触燃焼式可燃性ガス検知器及びガスクロマトグラフによる温泉付随メタンガスの測定値に与える酸素濃度の影響、BUNSEKI KAGAKU、59、131-136、2010
- 6) 杉崎隆一、吉本泰介、加藤喜久雄、杉浦孜：南関東ガス田の地球科学的考察 - とくにガス成分と鉱床の存在状態との関連について -、The Geological Society of Japan、69、67-81、1963
- 7) Maekawa T, Igari S, Kaneko N: Chemical and isotopic compositions of brines from dissolved-in-water type natural gas fields in Chiba, Japan, Geochemical Journal, 40, 475-484, 2006

Regional distribution of inflammable natural gas incidental to hot spring water in Aichi prefecture

Yasuko Koike, Tatsuya Matsuda, Yuko Yamamoto, Toru Ito¹⁾,

Toshio Morishita, Rumiko Hayashi, Shoko Ohnuma²⁾

1) Kinuura-Tobu health center, 2) Chubu University

The Hot springs law was revised with the explosion accident with the inflammable natural gas (methane) in incidental gas from hot spring water in June 2007 and the concentration of methane must be measured in all spring facilities. We determined the concentrations of methane in the field in 64 spring sources (including three places of unused sources) in Aichi prefecture and investigated the detection rate, regional distribution, hot spring ingredient and geochemical characteristic etc.

The spring sources with the level of methane beyond the standards that needed safety measures were detected in 34 of 64 places (53%) on the field investigations. The detection rate of methane was 14/16(88%) in the plains of Owari area, 12/17(71%) in the hills of Owari eastern area included the Chita Peninsula, 5/10(50%) in the plains of Mikawa area and 3/21(14%) in the mountains of Mikawa area, respectively. The levels of methane concentration released from hot spring water were inclined to be higher values in Owari area .

By this investigation, it was estimated that there was relatively much methane in the Owari area. In this area the springs well up from the sedimentation layer of the Tertiary period, and it was thought that dependence was high in the geological feature of the spot where the distribution of methane drew the spring. And they were seen the characteristics of spring which detected methane that water temperature was more than 34 degrees Celsius, pH was alkalescent, electric conductivity was relatively high, and the sodium ion and the chloride ion were primarily composed.

Key words : Inflammable natural gas incidental to hot spring water (methane), the quality of the water, regional distribution

 他誌掲載論文抄録

高齢者入所施設における肺炎球菌ワクチンのインフルエンザワクチンとの同時接種及び再接種に対する認識と対応についての調査

広瀬かおる、續木雅子、林 嘉光¹、鈴木幹三²

¹名古屋市厚生院付属病院、²名古屋市千種保健所

日本公衆衛生雑誌 59(6):407-414, 2012

2009年10月に新型インフルエンザ予防強化策のひとつとして肺炎球菌ワクチンのインフルエンザワクチンとの同時接種及び再接種が承認されたことを受け、肺炎球菌ワクチンの同時接種・再接種に対する認識と対応などについて調査を実施した。愛知県内の全高齢者入所施設(716施設)を対象に郵送により調査を行い、392施設(54.7%)から回答が得られた。インフルエンザワクチンとの同時接種が認められたことを認識しているのは老人保健施設で79.2%と高かったが、全体では45.4%であった。再接種を認識している施設は31.7%と低

かった。同時接種を認識していない施設においては肺炎球菌ワクチン接種者ありと回答した施設は37.0%であるのに比し、認識している施設では接種者ありと回答した施設が52.3%と有意に高かった。肺炎球菌ワクチン接種に関する情報の有無が、各施設における肺炎球菌ワクチンの同時接種や再接種の積極的な勧奨や接種状況に反映される可能性が示唆され、各自治体は高齢者における本ワクチンの公費助成を検討するとともに、これらの情報を周知徹底する必要がある。

A genetic risk predictor for breast cancer using a combination of low-penetrance polymorphisms in a Japanese population

Akiko Sueta¹, Hidemi Ito¹, Takakazu Kawase¹, Kaoru Hirose, Satoyo Hosono¹, Yasushi Yatabe², Kazuo Tajima³, Hideo Tanaka¹, Hiroji Iwata⁴, Hirotaka Iwase⁵, Keitaro Matsuo¹

¹Division of Epidemiology and Prevention, Aichi Cancer Center Research Institute,

²Department of Pathology and Molecular Diagnosis, Aichi Cancer Center Hospital, ³Aichi

Cancer Center Research Institute, ⁴Department of Breast Oncology, Aichi Cancer Center

Hospital, ⁵Department of Breast and Endocrine Surgery, Kumamoto University Graduate

School of Medical Science

Breast Cancer Research and Treatment 132(2):711-721, 2012

Genome-wide association studies have identified genetic variants associated with

breast cancer. To evaluate the contribution of these variants as predictors in Japanese women, a case-control study was conducted with 697 case subjects and 1,394 controls. We fit conditional regression models with genetic variants and conventional risk factors. In addition, we created a polygenetic risk score, using those variants with a statistically significant association with breast cancer risk and also evaluated the contribution of these genetic predictors using the c statistic. Eleven

single-nucleotide polymorphisms revealed significant associations with breast cancer risk. A dose-respondent association was observed between the risk of breast cancer and the genetic score, which was an aggregate measure of alleles in seven selected variants. Risk models which include a genetic risk score are possibly useful in distinguishing women at high risk of breast cancer from those at low risk, particularly in the context of targeted prevention.

A foodborne outbreak of Sapovirus linked to catered box lunches in Japan

Shinichi Kobayashi, Noriko Fujiwara, Yoshihiro Yasui, Teruo Yamashita, Reiji Hiramatsu, Hiroko Minagawa

Archives of Virology 157(10):1995–1997, 2012

Sapovirus (SaV) is a common cause of acute viral gastroenteritis worldwide, and SaV outbreaks have become more frequent in recent years. In January 2010, an outbreak of acute gastroenteritis due to SaV occurred in Aichi, Gifu and Mie Prefectures, Japan. The illness was strongly associated with eating a delivered box lunch prepared by one catering company. In total, 655 (17.1 %) of 3827 individuals developed gastroenteritic symptoms. SaV was detected in seven of the nine people who

became ill and in seven of the 52 food handlers at the catering company, but all the tested samples were negative for norovirus and enteropathogenic bacteria. Sequence analysis of RTPCR products indicated that the nucleotide sequences of SaV strains from the people who became ill and the food handlers were identical. The detected SaV strains were genogrouped as SaV genotype I.2. This was the largest foodborne outbreak of sapovirus in Japan.

食品を介する感染症について

松本昌門、小林慎一、平松礼司、皆川洋子
食品の包装 43(2):80 - 87, 2012

食中毒をはじめとする食品摂取によって発生する感染症 (foodborne infection) について、リステリア、カンピロバクター、腸管出血性大

腸菌、ノロウイルス及びサポウイルスを中心に概説した。

渡航歴の無い小児および家族内感染者からの D8 型麻疹ウイルス検出 - 愛知県

安井善宏、伊藤 雅、安達啓一、廣瀬絵美、藤原範子、小林慎一、山下照夫、平松礼司、皆川洋子、高木崇光¹、池田晃一¹、多和田光紀¹、加藤勝子¹、竹内清美¹

¹ 豊田市保健所

病原微生物検出情報 33(3):66, 2012

2012年2月10日までに愛知県内で麻疹と診断された患者のうち7例から、D8型麻疹ウイルス遺伝子を検出した。患者由来N遺伝子の部分塩基配列は全て同一であり、千葉県から報告された配列とも同一であった。また、4例の患者由来検体から麻疹ウイルスが分離された。疫

学調査では7例全ての患者及び同居者に患者発症前1カ月間の渡航歴はなく、患者は県内の2医療圏に集中していた。患者7名中6名は麻疹ワクチン接種歴無し、又は不明で、麻疹が発生するとワクチン未接種者間で感染が拡大することが再認識された。

2011/12 シーズン用同定キットの赤血球凝集抑制活性が低いインフルエンザウイルス AH3 亜型分離株 - 愛知県

安井善宏、藤原範子、小林慎一、山下照夫、平松礼司、皆川洋子

病原微生物検出情報 33(3):67-68, 2012

愛知県衛生研究所では2012年1月末現在、インフルエンザウイルス AH3 亜型 55 株を分離している。赤血球凝集 (HA) 試験で HA 価が低い 21 株は RT-PCR にて同定を行った。残り 34 株は赤血球凝集抑制 (HI) 活性を測定し、AH3 亜型と同定した。この中で 5 株がワクチン株と比べ 4 倍低い HI 価を示した。そこで、これら 5 株を含む県内分離株について HA 遺伝子の部

分塩基配列を決定し、系統樹解析を行った。その結果、県内分離株は Victoria 208 クレードに属しており、低 HI 価を示した 5 株には F193S の分岐が存在していた。F193S 置換変異はウイルスのレセプター結合部位の構造変化を引き起こす可能性があり、それによって低 HI 価を示した 5 株は抗原性の変化を引き起こしたと考えられた。

麻疹疑い症例からの風疹ウイルス検出と遺伝子型解析 - 愛知県

安井善宏、森嘉生¹、小林慎一、山下照夫、平松礼司、皆川洋子

¹国立感染症研究所ウイルス第三部

病原微生物検出情報 33(6):167-168, 2012

愛知県では平成 23 年度より麻疹疑い検体のうち麻疹ウイルス (MeV) PCR 検査が陰性であった検体について、パルボウイルス B19 及び風疹ウイルス PCR 検査を行っている。2 例の MeV 陰性例より風疹ウイルスを検出した。これらの検体 RNA より E1 遺伝子型別領域の増幅を試みたが、国立感染症研究所より推奨されている方法では PCR 産物は得られなかった。そこで麻疹

検査マニュアル第 2 版の方法を参考にして E1 領域の増幅を試みたところ PCR 産物を得ることができた。風疹は麻疹と同様に遺伝子型別の結果に基づき輸入関連症例かどうかを判断する必要があるため、E1 領域の検出は不可欠である。新規 E1 領域の検出方法が検査方法選択肢の 1 つになると思われる。

Human SCARB2-Dependent Infection by Coxsackievirus A7, A14, and A16 and Enterovirus 71

Seiya Yamayoshi¹, Setsuko Iizuka², Teruo Yamashita, Hiroko Minagawa, Katsumi Mizuta³, Michiko Okamoto⁴, Hidekazu Nishimura⁴, Kanako Sanjoh⁵, Noriko Katsushima⁶, Tsutomu Itagaki⁷, Yukio Nagai⁸, Ken Fujii¹, Satoshi Koike¹

¹Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, ²Shimane Prefectural Institute of Public Health and Environmental Science, ³Yamagata Prefectural Institute of Public Health, ⁴Sendai Medical Center, ⁵Sanjoh Clinic, ⁶Katsushima Pediatric Clinic, ⁷Yamanobe Pediatric Clinic, ⁸Nagai Children's Clinic

Journal of Virology 86(10):5686-5696, 2012

Human enterovirus species A (HEV-A) consists of at least 16 members of different serotypes that are known to be the causative agents of hand, foot, and mouth disease (HFMD), herpangina, and other diseases, such as respiratory disease and polio-like flaccid paralysis. Enterovirus 71 (EV71) and coxsackievirus A16 (CVA16) are the major causative agents of HFMD. CVA5, CVA6, CVA10, and CVA12 mainly cause herpangina

or are occasionally involved with sporadic cases of HFMD. We have previously shown that human scavenger receptor class B, member 2 (SCARB2) is a cellular receptor for EV71 and CVA16. Using a large number of clinical isolates of HEV-A, we explored whether all clinical isolates of EV71 and other serotypes of HEV-A infected cells via SCARB2. We tested this possibility by infecting L-SCARB2 cells, which are L929 cells

expressing human SCARB2, by infecting human RD cells that had been treated with small interfering RNAs for SCARB2 and by directly binding the viruses to a soluble SCARB2 protein. We showed that all 162 clinical isolates of EV71 propagated in L-SCARB2 cells, suggesting that SCARB2 is the critical receptor common to all EV71 strains. In addition, CVA7, CVA14, and CVA16, which are most closely related to each other, also utilized SCARB2 for infection. EV71, CVA14, and CVA16 are highly associated with HFMD, and EV71 and CVA7 are occasionally associated with neurological

diseases, suggesting that SCARB2 plays important roles in the development of these diseases. In contrast, another group of viruses, such as CVA2, CVA3, CVA4, CVA5, CVA6, CVA8, CVA10, and CVA12, which are relatively distant from the EV71 group, is associated mainly with herpangina. None of these clinical isolates infected via the SCARB2-dependent pathway. HEV-A viruses can be divided into at least two groups depending on the use of SCARB2, and the receptor usage plays an important role in developing the specific diseases for each group.

ポリオウイルス感染症の実験室診断マニュアル

板持雅恵¹、世良暢之²、石橋哲也²、林 志直³、山下照夫、清水博之⁴、西村順裕⁴、吉田 弘⁴
¹富山県衛生研究所、²福岡県保健環境研究所、³東京都健康安全研究センター、⁴国立感染症研究所
 病原体検出マニュアル, 2012

<http://www.nih.go.jp/niid/ja/lab-manual.html#class5>

高病原性鳥インフルエンザ診断マニュアル(第3版)

今井正樹¹、高下恵美¹、岸田典子¹、藤崎誠一郎¹、徐 紅¹、中内美名¹、高山郁代¹、松井清彦¹、
 影山 努¹、小田切孝人¹、押部智宏²、小淵正次³、加瀬哲男⁴、川上千春⁵、高橋雅輝⁶、平良勝也⁷、
 安井善宏、皆川洋子、調 恒明⁸

¹国立感染症研究所インフルエンザウイルス研究センター、²兵庫県立健康科学研究所、³富山
 県衛生研究所、⁴大阪府立公衆衛生研究所、⁵横浜市衛生研究所、⁶岩手県環境保健研究センター、
⁷沖縄県衛生環境研究所、⁸山口県環境保健センター

病原体検出マニュアル, 2012

<http://www.nih.go.jp/niid/ja/lab-manual.html#class5>

インフルエンザ診断マニュアル(第2版)

今井正樹¹、高下恵美¹、岸田典子¹、藤崎誠一郎¹、徐 紅¹、中内美名¹、高山郁代¹、松井清彦¹、影山 努¹、小田切孝人¹、押部智宏²、小淵正次³、加瀬哲男⁴、川上千春⁵、高橋雅輝⁶、平良勝也⁷、安井善宏、皆川洋子、調 恒明⁸

¹国立感染症研究所インフルエンザウイルス研究センター、²兵庫県立健康生活科学研究所、³富山県衛生研究所、⁴大阪府立公衆衛生研究所、⁵横浜市衛生研究所、⁶岩手県環境保健研究センター、⁷沖縄県衛生環境研究所、⁸山口県環境保健センター

病原体検出マニュアル, 2012

<http://www.nih.go.jp/niid/ja/labo-manual.html#class5>

病原体検出マニュアル「性器ヘルペスウイルス感染症」

井上直樹¹、片野晴隆¹、佐多徹太郎²、長島真美³、皆川洋子

¹国立感染症研究所、²富山県衛生研究所、³東京都健康安全研究センター

病原体検出マニュアル, 2012

<http://www.nih.go.jp/niid/ja/labo-manual.html#class5>

手足口病病原体検査マニュアル

板持雅恵¹、飯塚節子²、山下照夫、中田恵子³、石橋哲也⁴、清水博之⁵、西村順裕⁵、吉田 弘⁵

¹富山県衛生研究所、²島根県保健環境科学研究所、³大阪府立公衆衛生研究所、

⁴福岡県保健環境研究所、⁵国立感染症研究所

病原体検出マニュアル, 2012

<http://www.nih.go.jp/niid/ja/labo-manual.html#class5>

ヘルパンギーナ病原体検査マニュアル

清水博之¹、西村順裕¹、吉田 弘¹、板持雅恵²、山下照夫、石橋哲也³

¹国立感染症研究所、²富山県衛生研究所、³福岡県保健環境研究所

病原体検出マニュアル, 2012

<http://www.nih.go.jp/niid/ja/labo-manual.html#class5>

An Enrichment Medium for Increasing a Very Small Number of *Vibrio parahaemolyticus* Cells to the Detection Limit of the Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Assay.

Mitsugu Yamazaki¹, Hidemi Aoki¹, Yoshito Iwade², Masakado Matsumoto, Kazuhiro Yamada, Hiroaki Yamamoto, Masahiro Suzuki, Reiji Hiramatsu, Hiroko Minagawa

¹Aichi Prefectural Kinuura-Tobu Health Center, ²Mie Prefectural Health and Environmental Research Institute

Japanese Journal of Infectious Diseases 65(2):111-116, 2012

We developed an enrichment medium for use with the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay (enrichment media + LAMP assay) to quickly increase a very small number of *Vibrio parahaemolyticus* cells to the detection limit of the assay. Thirty-nine different enrichment media were prepared based on evaluating 12 potential ingredients. From our assessment of the 39 media, enrichment medium #36, which contained 2% sodium chloride, 1% proteose peptone no. 2, 0.1% trehalose, 0.5% α-ketoglutaric acid, 0.25% pyruvic acid, and 0.5% yeast extract (pH 8.6), was found to be most effective at enhancing the proliferation

of *V. parahaemolyticus* during incubation for 3 h at 40°C. We compared the detection limits of the LAMP assay, the enrichment medium #36 + LAMP assay, and the cultivation method using bacterial cell and spiked shrimp sample tests. The detection limits of the LAMP assay, the medium #36 + LAMP assay, and the cultivation method were 10³, 10¹⁰ - 1, and 10¹ - 1 CFU ml⁻¹, respectively. Enrichment medium #36 promoted a 10³- to 10⁴-fold increase in the bacterial population, and the detection limit of the enrichment media + LAMP assay was the same as that of the cultivation method.

腸管侵入性大腸菌が原因と疑われた腸管毒素原性大腸菌 O6 による集団食中毒について 豊橋市

山本新也¹、石黒亜基子¹、宮本典子¹、鈴木 勝¹、伊藤香江²、名倉健一²、墨岡成治²、藤岡正信²、青木日出美³、林 智子³、山崎 貢⁴、鈴木匡弘、松本昌門、伊藤健一郎⁵

¹豊橋市保健所衛生試験所 ²豊橋市保健所 ³愛知県衣浦東部保健所 ⁴愛知県一宮保健所

⁵国立感染症研究所感染症情報センター第五室

病原微生物検出情報 33(10):14 - 15, 2012

2010年9月、豊橋市内の仕出し弁当製造施設を原因とする大規模な食中毒事例が発生した。当初、病因物質は腸管侵入性大腸菌(EIEC)

であると判断したが、腸管毒素原性大腸菌(ETEC)の毒素試験、PCR産物の追加解析等によりETECであることが判明した。

Commercially distributed meat as a potential vehicle for community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.

Kikuyo Ogata^{1,2}, Hiroshi Narimatsu¹, Masahiro Suzuki, Wataru Higuchi³, Tatsuo Yamamoto³, Hatsumi Taniguchi²

¹Oita Prefectural Institute of Health and Environment, ²University of Occupational and Environmental Health, ³Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences Applied and Environmental Microbiology 78(8):2797-2802, 2012

The incidence of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA) infection has been increasing; however, the sources of infection remain unclear. Therefore, we investigated the involvement of meat as a possible mediator of CA-MRSA infection. We examined the distribution of MRSA strains in commercially distributed raw meat samples (n = 197) and diarrheal stool samples of outpatients (n = 1,287) that were collected in Oita Prefecture, Japan, between 2003 and 2009 for routine legal inspections. Fourteen MRSA strains were isolated from three meat and 11 stool samples. Among these, seven isolates from three meat and four stool samples exhibited

the same epidemiological marker profiles [coagulase type III, staphylococcal enterotoxin C, staphylococcal chromosomal cassette *mec* (SCC*mec*) type IV, ST8, spa type 606 (t1767), and toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1) producing type]. Furthermore, of the seven strains, three isolates from two meat samples and one stool sample collected in 2007 exhibited completely identical characteristics with respect to phage open reading frame (ORF) typing, pulsed-field gel electrophoresis, and drug susceptibility profiles. The results suggest that commercially distributed meat could play a role in the prevalence of CA-MRSA in the community.

腸管出血性大腸菌 (E H E C) 検査・診断マニュアル

八柳 潤¹、横山栄二²、小西典子³、松本昌門、磯部順子⁴、勢戸和子⁵、横田正春⁶、田内敦子⁷、堀川和美⁸、伊豫田 淳⁹、寺嶋 淳⁹

¹秋田県健康環境センター、²千葉県衛生研究所、³東京都健康安全研究センター、⁴富山県衛生研究所、⁵大阪府立公衆衛生研究所、⁶堺市衛生研究所、⁷広島市衛生研究所、⁸福岡県保健環境研究所、⁹国立感染症研究所 細菌第一部

病原体検出マニュアル, 2012

<http://www.nih.go.jp/niid/images/lab-manual/EHEC.pdf>

病原体検出マニュアル 薬剤耐性菌

和知野純一^{1,2}、鈴木匡弘、常 彬³、大西 真³、鈴木里和¹、松井真理¹

¹国立感染症研究所 細菌第一部、²名古屋大学医学部、³国立感染症研究所 細菌第一部
病原体検出マニュアル, 2012

<http://www.nih.go.jp/niid/images/lab-manual/Resistant20130104.pdf>

シンポジウム 第34回農薬残留分析研究会

市原 勝¹、坂 真智子²、上野英二、安藤 孝³

¹高知県農業技術センター、²一般財団法人残留農薬研究所、³宮崎県総合農業試験場
日本農薬学会誌 37(2):229-232, 2012

平成23年11月17日～18日に、高知市で開催された日本農薬学会第34回農薬残留分析研究会には、全国各地から約250名もの参加があり、シンポジウム：残留農薬分析における試験所および精度管理システム、特別講演：高知県の農業の実態 IPM の推進と農薬登録、ポスター発表（26題）、およびポスター発表から選抜された一般講演（6題）が行われた。また、企業展示（17社）では、農薬の残留分析に関する

最新の技術情報の提供が行われた。今回のシンポジウムは、平成23年度に作物残留試験におけるガイドラインが大幅に改正されたことから、それを踏まえて実施したものである。ガイドライン改正に関する事前説明会は何度か開催されたが、実際の運用段階では問題が発生しているようであり、活発な意見交換が行われていた。

書評 実践残留農薬分析における注意点（操作編） 廣田政隆著

上野英二

日本農薬学会誌 37(2):303, 2012

現在、昭和40～50年代からオープンカラムクロマトグラフィーなどの技術を蓄積してきた団塊の世代が、残留分析の第一線から退きつつある。著者も、その一人であり、DDTに代表される有機塩素系農薬から始まり、有機リン系農薬、カーバメート系農薬、そしてピレスロイド系農薬へと主役が劇的に移りかわっていった時代の貴重な経験を積んできている。本書は、長年、残留分析に携わってきた経験的感覚を含

めて、若手技術者にぜひとも継承してほしい分析手法などがまとめられている。GC-MSなどで、ほとんど親化合物のみを一斉分析しているだけでは、さして技術力の向上は望めない。若手技術者にとって、本書が農薬の残留分析への興味を高め、さらなる技術力向上のきっかけになってほしいと願う。もちろん経験を積んだ技術者にとっても楽しい読み物である。

愛知県衛生研究所報作成要領（平成 24 年度版）

2013.03.31

愛知県衛生研究所報（以下所報）は、以下の要領により作成する。

1. （掲載内容）所報には原則として愛知県衛生研究所において実施された調査研究に関する原著・短報若しくは総説及び他誌掲載論文抄録を掲載する。他の研究機関等が主体となって実施された研究に関する原稿掲載の妥当性等については、必要に応じて編集情報運営委員会において審議の上、発行人（所長）に上申する。
2. （著者）原著・短報若しくは総説は、著者に少なくとも 1 名の愛知県衛生研究所職員を含むものとし、筆頭著者は原則として愛知県衛生研究所職員であることとする。当該原稿の修正・作図及び校正確認等の事務は職員である著者の 1 名が担当する。
3. （原稿の採否）原稿の採択については、編集情報運営委員会の意見を聴取の上、発行人が「採択・要修正・不採択」を決定する。
4. （原稿作成要領）事務の簡素化に利する目的で、概ね年報の記載要領に準ずるものとする。
 - (1) 原著、短報、総説原稿作成の概要
 - ア 1 編の長さは概ね欧文抄録込み 8 ページ程度を目安とし、12 ページを超えないこと。欧文抄録は 250 ワード以内とする。
 - イ 原稿本文は「Microsoft-WORD2003」（拡張子 doc）の以下の設定で作成する。
 - ウ 原則として前年度の原稿フォーマット様式を踏襲して作成する。
 - エ ファイル - ページ設定で、用紙は A4 縦配置、余白は上下各 25mm、左右各 20mmとし、1 行の文字数は全角 40 文字、1 ページの行数は 45 行とする。
 - オ 箇条書き
オートフォーマットは用いない。[ツール - オートコレクトのオプション - 入力オートフォーマットタブの「箇条書き（行頭番号）」及び「箇条書き（段落番号）」のチェックボックスをオフに、一括オートフォーマットタブの「箇条書き」のチェックボックスもオフにする。
(2013 年 3 月現在)
 - カ 書式 - フォント
和文の文書は MS 明朝、欧文の文書及び欧文抄録本文は Century、10.5pt とし句読点はすべて『、』又は『。』とする。
見出しは MS ゴシック、10.5pt とし、太字は用いない。
数字、アルファベット及び単位は半角を用い、数値と単位との間に半角スペースを挿入する（例：10 mg/mL）。ただし、文書内の 1 桁数字については全角とする（表内及び表のタイトルについて、1 桁数字は半角）。
学名、遺伝子等斜体文字が適当な場合は斜体とする。
単位、略語等の例；リットル L、年齢 歳、範囲 ~、検出せず N.D.、マイクロ μ（全角。symbol フォントは用いない）、期間 か月
 - キ 所属名の記載例
文書内の最初に登場した箇所に正式名称を示し、以下、適宜略するものとする。
 - ク 文献
記載は下記の例に従う。
雑誌の場合
 - 1) Young D C, Sharp D G: Poliovirus aggregates and their survivals in water. Applied Environmental Microbiology 33(1): 168-177, 1977.
 - 2) Yamashita T, Ito M, Tsuzuki H, Sakae K, Minagawa H: Molecular identification of

- enteroviruses including two new types (EV-98 and EV-107) isolated from Japanese travelers from Asian countries. Journal of General Virology 91(4): 1063- 1066, 2010.
- 3) 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(1): 15-16, 2006.

単行本の場合

- 4) Pallansch M, Roos R: Enteroviruses: Polioviruses, Coxsackieviruses, Echoviruses, and Newer Enteroviruses. Fields Virology Fifth edition (Knipe DM, Howley PM eds), 839-893, 2007, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- 5) 山下照夫: アイチウイルス. ウイルス感染症の検査・診断スタンダード (田代真人、牛島廣治編) 143-145, 2011, 羊土社、東京.

電子ジャーナル、ウェブページの場合 (他誌と同じ記載)

ケ 表作成要領 (表の記載例参照)

原稿作成及び校閲の間は修正が容易な EXCEL シートの使用を認めるが、最終原稿には著者の責任において図として貼り付ける。調査研究内容に関する図表の体裁については、内容を適切に伝えるものである限り年報よりも広く著者の裁量を許容するものとする。

図、表には図 1, 表 1 と番号をつける。図は原則として白黒印刷でそのまま掲載可能な明瞭なものとする。

表題は MS ゴシックとする。

表内の文字は、MS 明朝、10pt とする。数字は半角数字を使用し、1桁の数字も半角とする。表の最初及び最後の横線は 1.5 ポイントの太さとし、その他は 0.5 ポイントとする。また両側の縦線は『罫線なし』で作成する。

一つの表は表題から脚注に至るまで一つの表として作成する。(例)を参照のこと。

<例> 表 2 微好気培養法 (ガスパック) と好気培養法 (シール培養) との検出感度の比較

培養方法	増菌培地	分離培地	塗抹量	培養菌液の希釈倍数 (3.6×10^6 /mL)			
				10^4	10^5	10^6	10^7
微好気培養法 (ガスパック)	ポルトン培地	CCDA 培地	10 μ L	検出	検出	検出	検出
	プレストン培地	CCDA 培地	10 μ L	検出	検出	検出	不検出
好気培養法 (シール培養)	ポルトン培地	CCDA 培地	10 μ L	検出	検出	検出	不検出
	プレストン培地	CCDA 培地	10 μ L	検出	検出	不検出	不検出

(2) 「他誌掲載論文抄録」記載要領

ア 前年 1 月～12 月に掲載された論文を記載する (暦年扱いとする)。

イ 抄録の長さの目安: 欧文は 250 ワード程度、和文の場合は 400 字程度とする。

ウ 雑誌名の記載: 雑誌名は略さずに記す。巻(号): 開始ページ-終了ページ, 発行年を明記する。号数がある場合には必ず記載する。

エ 著者名: 衛生研究所職員はゴシックとする。在職中の研究内容が主となる場合は、異動後であってもゴシックとし、必要に応じて現所属を付記する。

オ 共著者の所属: 衛生研究所以外の所属は、¹ (上付き文字の数字) で示し、コンマで区切り改行なしで記載する。

カ 電子ジャーナル文献の記載方法: paper journal と同様の巻(号)及びページ番号が付与されている場合はこれらを記した後に DOI を明記する。

< 記載例 >

雑誌の場合（邦文）

ヒトパレコウイルス

伊藤雅、山下照夫、皆川洋子

臨床と微生物 36 (3) :187-192, 2009

雑誌の場合（英文）

Seroepidemiological study of norovirus infection in Aichi Prefecture, Japan

Shinichi Kobayashi, Noriko Fujiwara, Naokazu Takeda¹, Hiroko Minagawa

¹Department of Virology II, National Institute of Infectious Diseases

Microbiology and Immunology 53(6): 356–359, 2009

単行本の場合

皆川洋子

III-7. 化学療法・免疫療法、VIII-2. ヘルペスウイルス科、VIII-14. アレナウイルス科およびブニヤウイルス科、VIII-15. レオウイルス科

戸田新細菌学改訂 33 版（吉田真一、柳雄介、吉開泰信編）：281-288, 715-741, 814-818, 818-821, 2007、南山堂、東京。

電子ジャーナルの場合

Genetic control of organ shape and tissue polarity

Green AA, Kennaway JR, Hanna AI, Bangham JA, Coen E.

PLoS Biology 8(11):e1000537.doi:10.1371/journal.pbio.1000537, 2010

ウェブページアドレスの記載例

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(2009年12月3日現在);<http://www.pref.aichi.jp/eiseiken/>

5. その他

著者校正は原則として1回のみとする。以後のレイアウト等については編集情報運営委員会に一任する。

編集情報運営委員会

委員長 : 水野 英明 (企画情報部)
委員 : 井村 守邦 (総務課)
広瀬 かおる・桜島 由佳 (企画情報部・健康科学情報室)
伊藤 雅 (生物学部・ウイルス研究室)
山田 和弘 (生物学部・細菌研究室)
中村 瑞那 (生物学部・医動物研究室)
伊藤 裕子 (衛生化学部・医薬食品研究室)
富田 浩嗣 (衛生化学部・生活科学研究室)

愛知県衛生研究所報

第 63 号

平成 25(2013)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	052-910-5638
	052-910-5639
	052-910-5643

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)