

# 愛知県衛生研究所報

第 62 号 平成 24 年 3 月

## 目 次

### 調査研究

患者登録情報を活用した愛知県における結核罹患の将来予測 -全国との比較 ..... 1  
 續木雅子、櫻井博貴、広瀬かおる、大西賢治郎、皆川洋子

遺伝子検出範囲拡大による急性呼吸器感染症患者検体からの  
ウイルス検出感度向上の試み ..... 11  
 安達啓一、廣瀬絵美、藤原範子、伊藤 雅、安井善宏、小林慎一、  
 山下照夫、秦 眞美、平松礼司、皆川洋子

愛知県における胃腸炎ウイルス検出状況（2010/11 シーズン）と遺伝子解析 ..... 19  
 藤原範子、廣瀬絵美、安達啓一、伊藤 雅、安井善宏、  
 小林慎一、山下照夫、平松礼司、皆川洋子

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(第2報) ..... 29  
 井上知美、上野英二、大野春香、渡邊美奈恵、猪飼誉友、林留美子

愛知県感染症発生動向調査における定点把握疾病の動向  
-(2)長期動向の視覚化及び2011年にみられた流行 ..... 37  
 広瀬かおる、續木雅子、山下照夫、櫻井博貴、大西賢治郎、皆川洋子

他誌掲載論文抄録 ..... 45

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

Volume 62, March 2012

Contents

Original Papers

Estimation of the future epidemiological situation of tuberculosis incidence in Japan and Aichi Prefecture .....	1
Masako Tsuzuki, Hiroki Sakurai, Kaoru Hirose, Kenjiro Ohnishi, Hiroko Minagawa	
Improved detection of respiratory viruses from throat swabs by introducing additional RT-PCR protocols .....	11
Hirokazu Adachi, Emi Hirose, Noriko Fujiwara, Miyabi Ito, Yoshihiro Yasui, Shinichi Kobayashi, Teruo Yamashita, Mami Hata, Reiji Hiramatsu, Hiroko Minagawa	
Prevalence and genetic analysis of gastroenteritic viruses between April 2010 and March 2011 in Aichi prefecture .....	19
Noriko Fujiwara, Emi Hirose, Hirokazu Adachi, Miyabi Ito, Yoshihiro Yasui, Shinichi Kobayashi, Teruo Yamashita, Reiji Hiramatsu, Hiroko Minagawa	
Multi-residue analysis of pesticides in foods by gas chromatography with blos NPD ( Part ) .....	29
Tomomi Inoue, Eiji Ueno, Haruka Ohno, Minae Watanabe, Yoshitomo Ikai, Rumiko Hayashi	
Infectious disease surveillance in Aichi Prefecture -(2) visualization of long-term trends and 2011 epidemics observed with sentinel-based surveillance- .....	37
Kaoru Hirose, Masako Tsuzuki, Teruo Yamashita, Hiroki Sakurai, Kenjiro Ohnishi, Hiroko Minagawa	
Summeries of papers accepted to other journals .....	45

---

---

調 査 研 究

---

---

## 患者登録情報を活用した愛知県における結核罹患の将来予測 -全国との比較

續木雅子、櫻井博貴、広瀬かおる、大西賢治郎、皆川洋子

### 要 旨

2010年におけるわが国の結核罹患率(人口10万対)は18.2と、依然としてWHOが「中まん延国」の指標としている10.0より高い。とりわけ名古屋市の罹患率は31.5と高く、名古屋市を含む愛知県(愛知県全体)の2010年罹患率も22.5と全国を上回っている。そこで本県における今後の結核対策策定に資する基礎資料作成を目的として、結核新登録患者数の将来予測を試みた。1987～2009年の性別・年齢階級別罹患率に基づき、指数回帰式をあてはめて2010年から2030年まで5年間隔で将来予測を行った。その結果、2015年の愛知県全体の推計罹患率は18.8、2030年には11.0にまで低下するものの10.0より高い状態のままであると予測された。さらに若年罹患患者数の減少傾向が鈍化する一方、全罹患患者に占める70歳以上の高齢者の割合の上昇が予測され、診断・治療における課題の多様化が危惧される。

キーワード：結核、罹患率、将来予測

### 序文

わが国の結核罹患率は1977年頃までは年平均約10%の速度で減少してきたが、1980年以降は年約3%と減少速度が鈍化した。1999年の緊急事態宣言後、新登録者数及び罹患率ともに減少傾向にあるものの、2010年結核罹患率(人口10万対)は18.2と、WHOが中まん延状態とする、10.0より依然として高い状況である。罹患率減少鈍化の主な要因には、わが国において結核が高度に蔓延していた1950年頃までに感染した者が既感染発病を起こしやすい年齢に達したこと、高齢者人口の急速な増加に伴って高齢の既感染者数が増加したことが考えられる<sup>1)</sup>。

欧米先進諸国における2007年結核罹患率は、アメリカ4、カナダ5、ドイツ6など多くが低まん延国であるのとは対照的に、日本は2007年時点で21、2010年は前述のとおり18.2と大きく遅れをとっている<sup>2)</sup>。日本を含むWHO西太平洋地域においては、フィリピン、インドネシア、ミャンマーなど罹患率100以上の高まん延国が多い<sup>2)</sup>。このような地域からのわが国への人口移動は年々増加傾向にあり<sup>3)</sup>、特に労働力である若年層の人口が増加している。

また、70歳以上の新登録者数の全体に占める割合は1987年に既に27%を占めていたが、2009年においては51%とさらに高まり、超高齢化社会到来に伴って対策の強化

が必至である。さらに、大都市の高罹患率も目立ち、2010年の政令市罹患率では大阪市47.4、名古屋市31.5、堺市28.5がワースト3を占め、都道府県のなかで罹患率が最も低かった長野県の9.1を大きく上回っている<sup>4)</sup>。

名古屋市を含む愛知県(以下、愛知県全体)の2010年罹患率は22.5と全国の18.2より高く、「愛知県結核対策プラン」(2008年2月策定)に掲げられた2010年までの目標罹患率19.0は未達成である。2011年9月に改定された同プラン<sup>5)</sup>では、2015年までに罹患率18.0以下とすることを目標としている。本稿では愛知県における結核対策及び今後の目標値設定の基礎資料作成を目的として行った結核罹患率の将来予測結果を報告する。

#### 資料と方法

まず全国、愛知県及び名古屋市の新登録者数<sup>4)</sup>、並びに全国人口(外国人を含む総数)<sup>6)</sup>及び愛知県人口(外国人を含む総数)<sup>7)</sup>を用いて1987～2009年の性別・年齢階級別罹患率を算出し、次にこれに基づき2030年までの罹患率予測を行った。将来予測の前提条件として過去の性・年齢階級別罹患率の傾向が今後も継続すると仮定し、指数回帰式をあてはめ2010年から2030年まで5年間隔で行った<sup>8)</sup>。さらに算出した予測罹患率に全国及び都道府県別将来推計人口(外国人含む)<sup>9)</sup>を乗じて性別・年齢階級別

罹患率を算出した。なお年齢調整罹患率は1985年の日本人モデル人口を標準人口として算出した。

#### 結果

##### 1 全国における将来予測

全国における新規発生結核の推計罹患数及び罹患率を表1に示す。2015年の推計新登録者数は18,717人(2010年実測値23,261人の0.80倍)、罹患率14.9(2010年実測値18.2の0.82倍)と予測された(表1)。その後も予測罹患率は緩やかに減少し、2025年には10.0と低まん延状態とされるレベルを達成、2030年には罹患率7.8まで低下すると予測された。年齢調整罹患率では2010年予測の25.4に対し2015年は19.4と0.76倍になると予測された(図1)。性別年齢階級別にみた新登録者数の実測値および将来推計値を図2-1、2-2及び2-3に示す。男の年齢階級別罹患数(新登録者数)は2015年まで70歳以上、60～69歳、50～59歳の順に多いが、2020年以降いわゆる団塊世代と団塊ジュニア世代に挟まれた世代の人口を反映して60～69歳の罹患数は急激に減少し、2025年以降は50～59歳の罹患数が60～69歳を上回ると予測された。女では2010年までは20～29歳、30～39歳、40～49歳における罹患数はいずれも60～69歳を下回っているが、2015年以降は20～29歳、30～39歳が、2020年以降は40～49歳も60～69歳を上回ることが予測された(図2-3)。

表1 全国における結核の推計罹患数・推計罹患率

	推計罹患数合計	推計罹患数 対2010年比*1	推計罹患率	推計罹患率 対2010年比*2	推計年齢調整 罹患率	推計年齢調整罹患率 対2010年比*3
2010年	23,363	1.00	18.4	1.01	25.4	-
2015年	18,717	0.80	14.9	0.82	19.4	0.76
2020年	15,188	0.65	12.4	0.68	15.0	0.59
2025年	11,870	0.51	10.0	0.55	11.6	0.46
2030年	9,007	0.39	7.8	0.43	9.0	0.35

\*1; 2010年実測値23,261に対する比、\*2; 2010年実測値18.2に対する比、\*3; 2010年推計値に対する比

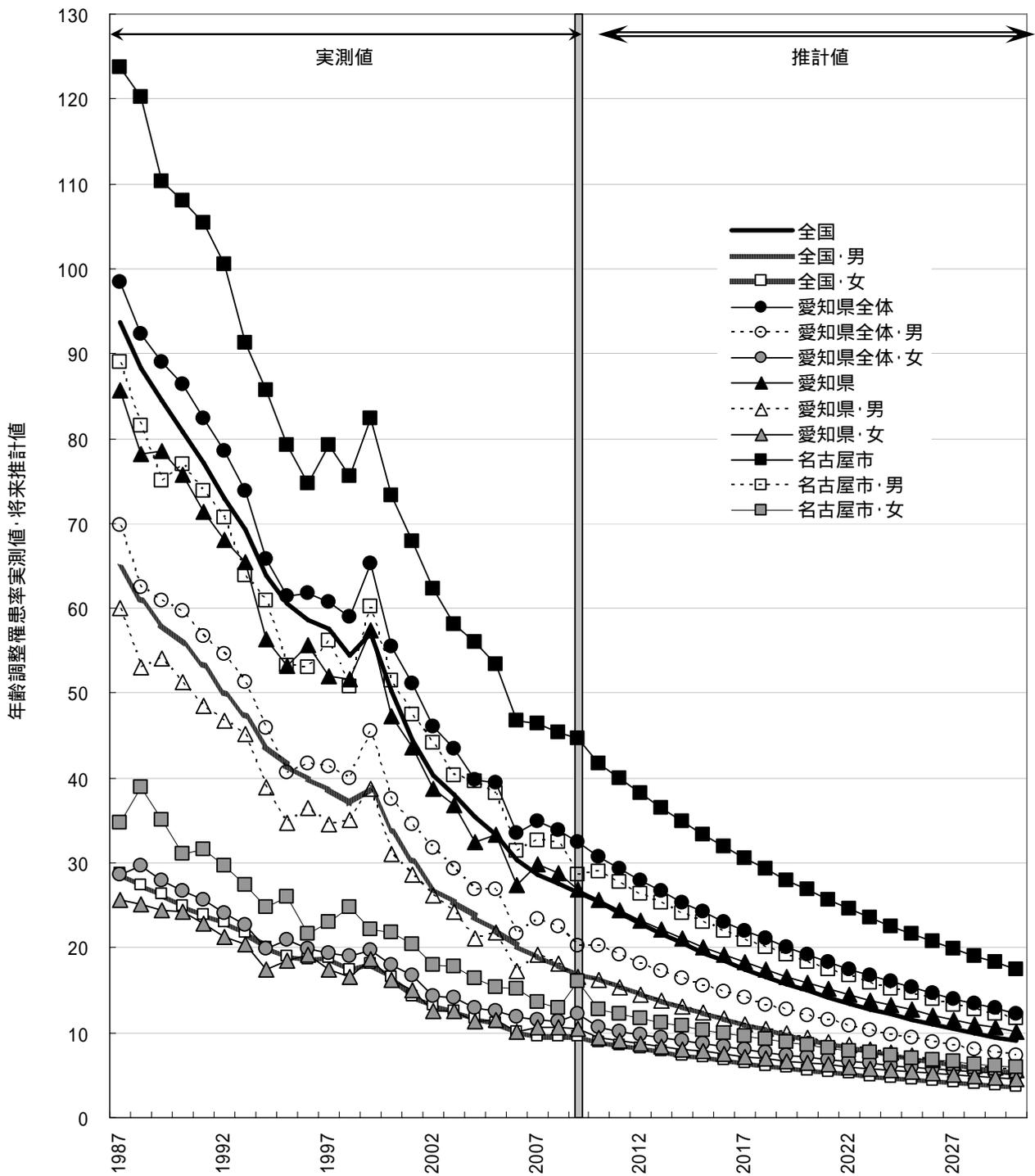


図1 結核の年齢調整罹患率(1987～2009年)及び将来推計値(2010～2030年)

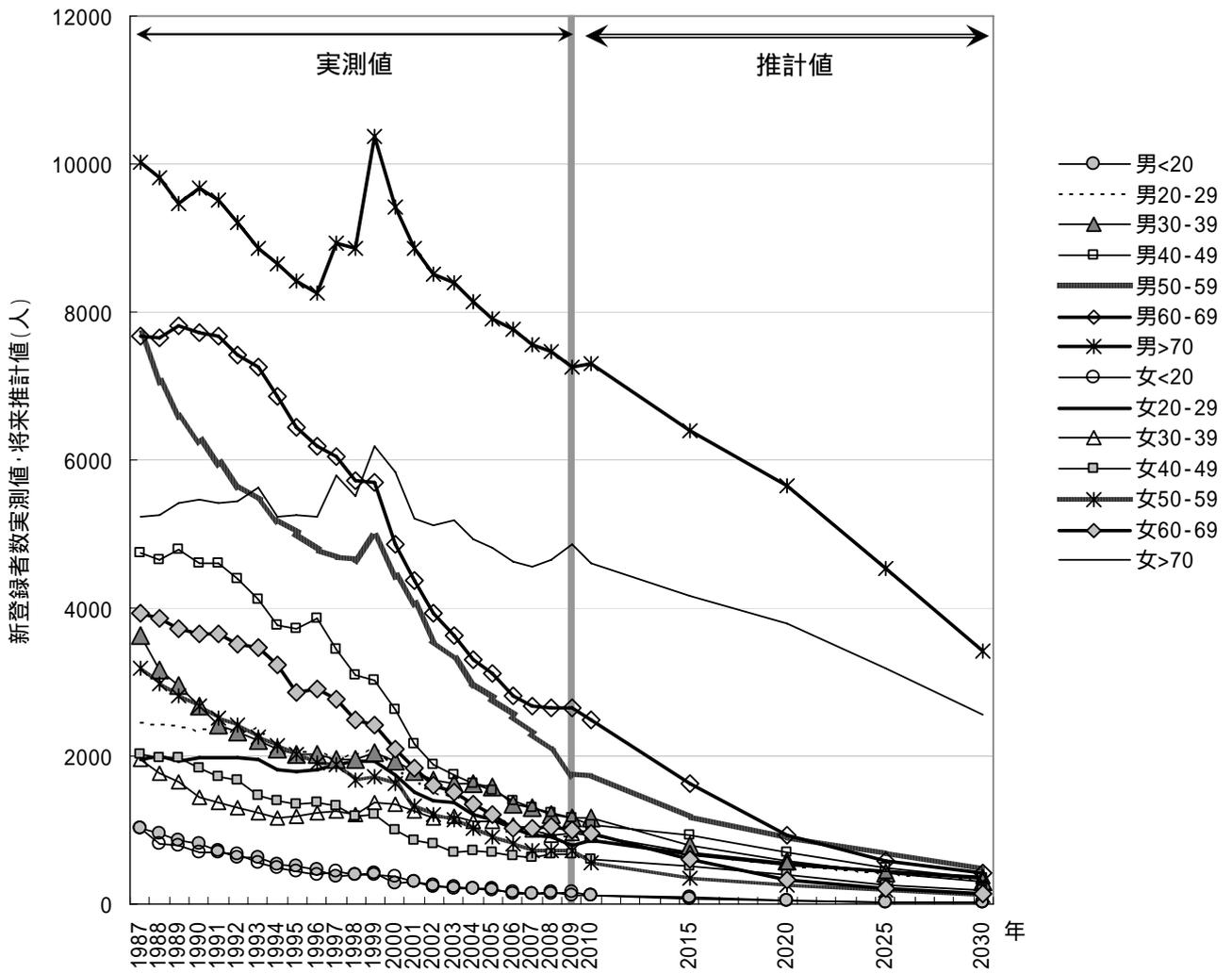


図2-1 全国の結核新登録者数(1987～2009年)及び将来推計値(2010年～2030年)

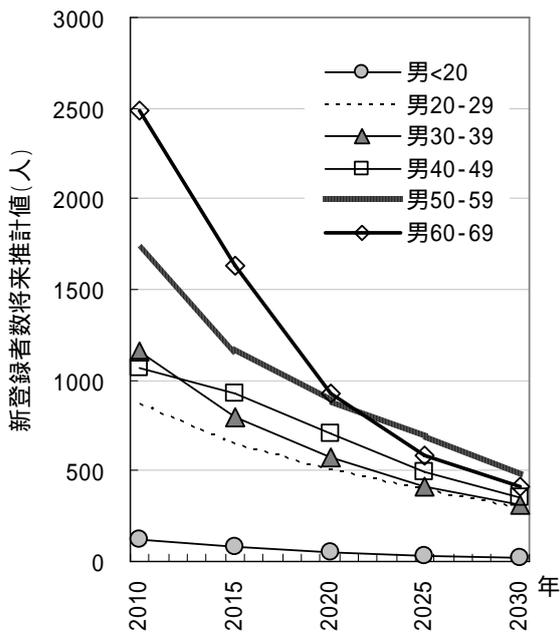


図2-2 全国の結核新登録者数将来推計値(男、0～69歳、2010年～2030年)

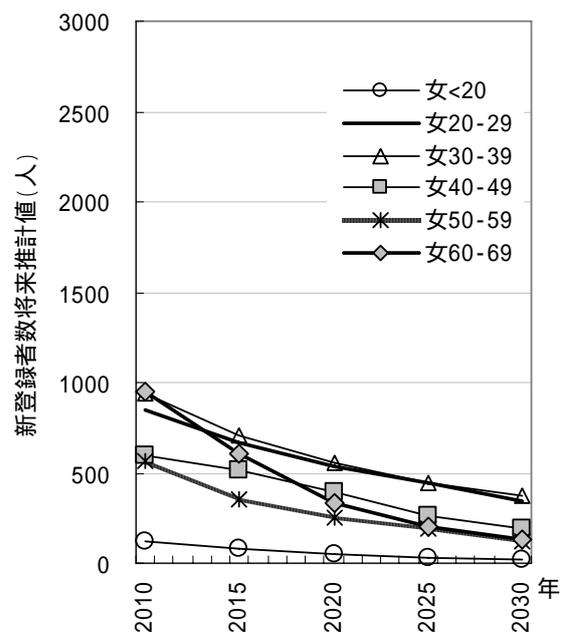


図2-3 全国の結核新登録者数将来推計値(女、0～69歳、2010年～2030年)

## 2 愛知県全体における将来予測

名古屋市を含む愛知県における新規発生結核の推計罹患数及び罹患率を表2に示す。2015年の推計新登録者数は1,390人(2010年実測値1,664人の0.84倍)、罹患率は18.8(2010年実測値22.5の0.84倍)と、愛知県結核対策プラン<sup>5)</sup>の2015年までの目標値18.0を上回ると予測された。その後も罹患率は減少傾向を示すものの、2030年時点においても11.0と依然として中まん延状態が継続すると予測された。年齢調整罹患率は2010年予測30.8に対し2015年は24.2と0.79倍になると予測された。

性別年齢階級別罹患数(新登録者数)の予測値は、全国とほぼ同様の傾向をたどるものと推察された。すなわち男では2015年までは70歳以上、60～69歳、50～59歳の順に多いが、2020年以降は50～59歳の将来推計罹患数が60～69歳を上回り、女では将来70歳以上と20～49歳の年齢層を中心に新登録患者が発生すると予測された。(図3-1、3-2及び3-3)

### 考 察

日本における結核は、21世紀に入っても未だ年間2.4万人の新規発生があり、2009年末現在の結核登録患者数は59,573人と今なお重要な感染症のひとつである。740万人口を擁する愛知県においても、2010年の新登録患者総数は1,664人

(うち名古屋市712人)を数える<sup>10)</sup>。1995年の結核予防法一部改正では、地域特性を配慮した対策の強化が明文化された。その後結核予防法は2007年3月末をもって廃止され、「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律(感染症法)」に包括されるとともに示された「結核に関する特定感染症予防指針」<sup>11)</sup>においても、保健所の機能強化及び地方衛生研究所と連携した調査研究の推進が明記されている。そこで、愛知県における結核対策及び今後の目標値設定等の検討資料を提供することを目的に、全国と比較しながら愛知県における結核の新規発生患者の将来予測を行った。

WHOは世界における推定結核患者数を推計しているが、届出数の信頼性が国により大きく異なることから、届出の信頼性の高い国では届出数を、開発途上国では年間感染危険率からの推定値を用いて世界の結核患者数を算出している。さらに、このデータに基づき地域ごとの届出の年齢分布や届出率の推移などを考慮して将来の患者発生数予測を実施している<sup>12)</sup>。本邦における結核罹患率予測を行った報告においても様々の予測手法が用いられている。大森らは過去の罹患率データに直線回帰式を当てはめる手法により都道府県別結核罹患率の将来予測を行った<sup>13)</sup>。さらに、大森らは罹患率減少速度を2種類の方法で計算し(モデルA、B)、2種類の観察期間を組み合わせたサブモデルを設定し将来推計を行った。

表2 愛知県における結核の推計罹患数・推計罹患率

	推計罹患数合計	推計罹患数 対2010年比*1	推計罹患率	推計罹患率 対2010年比*2	推計年齢調整 罹患率	推計年齢調整罹患率 対2010年比*3
2010年	1,608	0.97	21.8	0.97	30.8	-
2015年	1,390	0.84	18.8	0.84	24.2	0.79
2020年	1,206	0.73	16.4	0.73	19.2	0.62
2025年	988	0.60	13.6	0.61	15.3	0.50
2030年	786	0.47	11.0	0.49	12.3	0.40

\*1; 2010年実測値1,664に対する比、\*2; 2010年実測値22.5に対する比、\*3; 2010年推計値に対する比

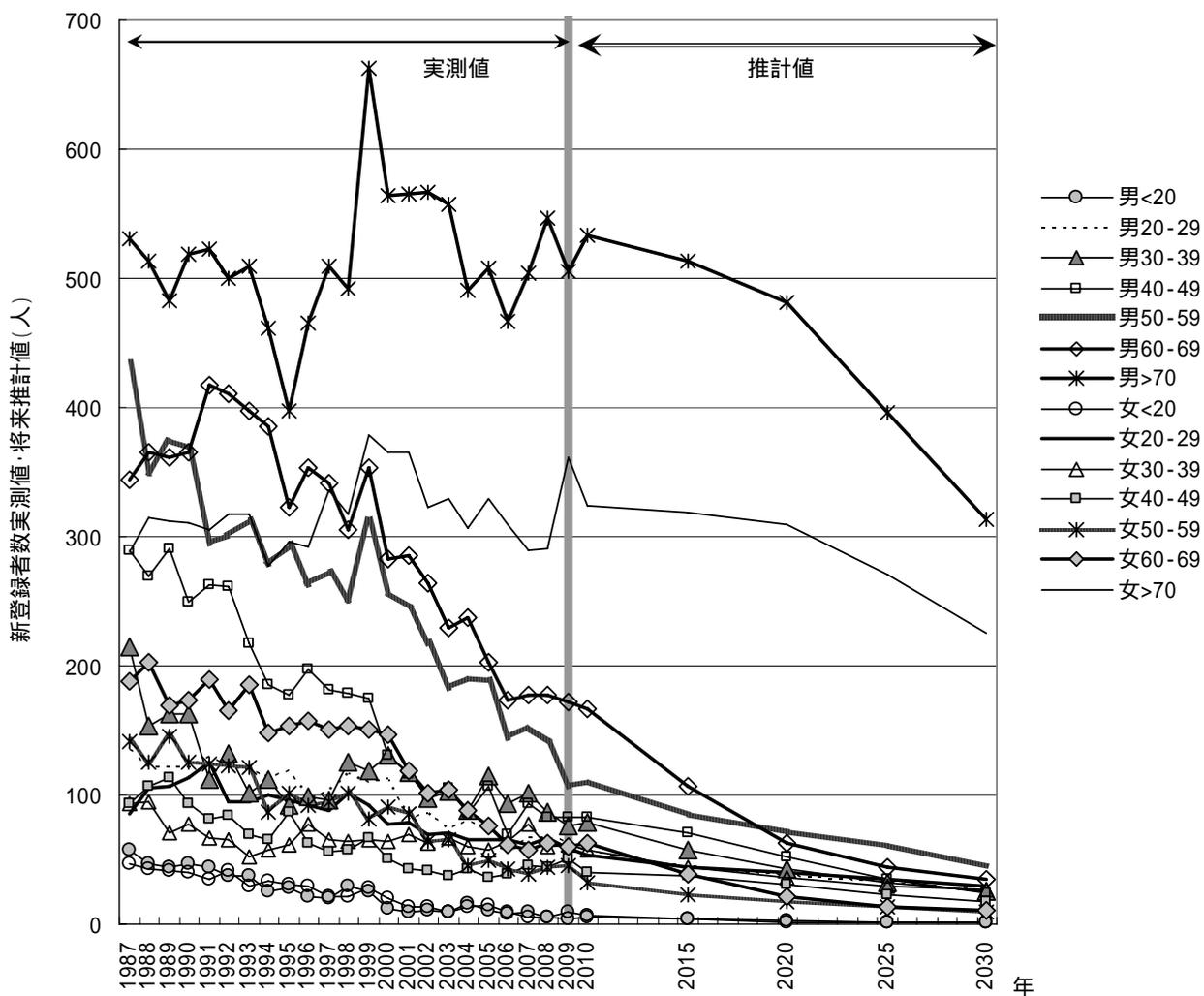


図3-1 愛知県全体の結核新登録者数(1987～2009年)及び将来推計値(2010年～2030年)

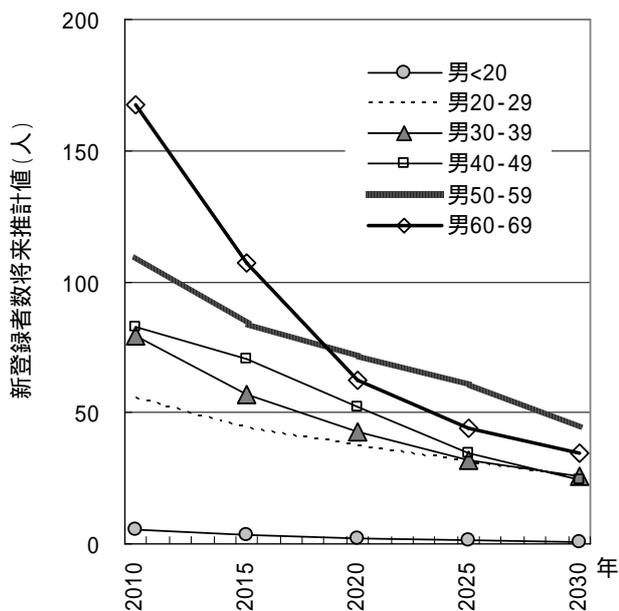


図3-2 愛知県全体の結核新登録者数将来推計値(男、0～69歳、2010年～2030年)

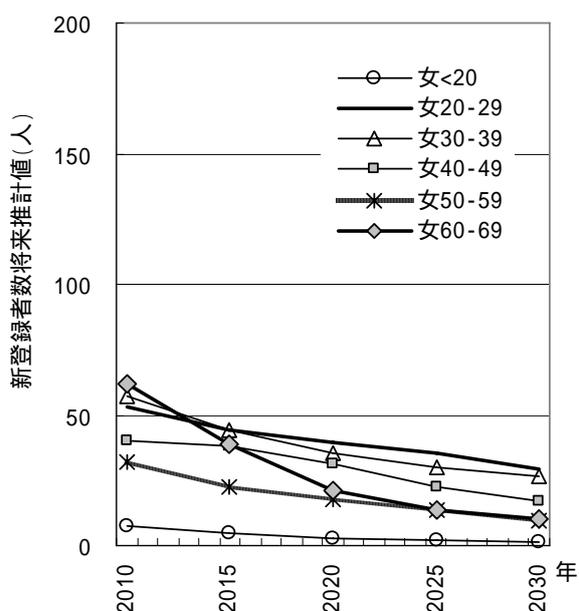


図3-3 愛知県全体の結核新登録者数将来推計値(女、0～69歳、2010年～2030年)

その報告によると全国の 2030 年全結核罹患率をモデル A-1 で 9.8、モデル A-2 で 5.4、モデル B-1 で 7.5、モデル B-2 で 3.2 と予測している<sup>14)</sup>。この他に、過去の動向に age-period-cohort (APC) 分析を適用し、得られた年齢、時代及び同年代出生コホートの影響に適切なシナリオを設定し、推定値を算出する方法がある。このようなモデルや APC 分析を適用する場合はその仮定やシナリオにより推計値は大きく変動する。そこで、今回愛知県における結核罹患将来予測を初めて試みるにあたって、出生年等の影響因子設定は行わずに、指数回帰式をあてはめる手法を採用した。

今回の予測によると全国の結核罹患率は 2010 年以降も減少を続け、10.0 と低まん延状態に達するのは 2025 年であると推測された。2010 年の指定都市別掲愛知県結核管理図では全国平均から偏差 1 以上偏った指標値は 27 項目中潜在性結核感染症治療対象者届出率の 1 項目のみ<sup>10)</sup>であることから愛知県における結核罹患の動向は全国と同様の傾向を示すと考えられる。愛知県全体でも 2010 年以降も罹患率は減少するが、2015 年予測罹患率は 18.8 と、愛知県結核対策プランの目標値 18.0 を上回り、さらに 2030 年の時点でも 10.0 の低まん延レベルに達しないと推察された。2015 年について予測される年齢調整罹患率は愛知県(名古屋市除く)の 20.1 に対し名古屋市が 33.4 と 1.7 倍であり、名古屋市が高い罹患率を示す傾向は今回予測した全期間(2030 年まで)継続すると予測された。罹患構造の変化により都市部の結核問題は複雑になっており、例えば簡易宿泊所居住の結核患者や外国人結核患者の実態把握や支援・治療をはじめ都市部における結核対策を強化充実させることは必須といえる。

全国における年齢階層別罹患数予測結果からみると、新規発生患者に占める 70 歳以上の割合は 2010 年の 51.2% から 2030 年には 66.2% に増加するものと推測される。愛知県全体でも同様に 2010 年

の 55.0% から 2030 年には 68.4% まで増加すると予測された。1950 年以前に出生した高齢者の多くは既感染者であり、人口の高齢化が急速に進展するわが国は大きな発病予備群をかかえていることになる。基礎疾患保有者の割合が多い高齢者が結核を発病すると、病態の複雑化が考えられる。さらに高齢者は若年者に比べ症状が目立たないため発見の遅れによる重症化も予測され、高齢者の結核問題は重要かつ困難な課題である。介護保険法施行(2000 年)後は高齢者施設の利用者が増加しており施設内感染対策も喫緊の課題と考えられる。

今回の解析結果から患者の高齢者への偏在の一方で、男では 50 歳代、女では 20~40 歳代の罹患者数が将来横ばいとなることが予測された。若年罹患者数の減少傾向の鈍化と 70 歳以上の高齢者での患者の偏りが今後の課題として示唆され、診断・治療・感染者への対応など都市部における特異的結核対策と併せて体制づくりを検討していく必要がある。

西欧先進諸国では 18 世紀以降の産業革命の中で爆発的な結核の流行を経験したが、その後栄養状態や生活環境の改善にともない患者の減少が始まった。20 世紀半ばからは有効な化学療法や対策の拡大により減少を続け、多くが低まん延状態レベルに達している。しかし、低まん延状態に達した後も順調に罹患率を減少させている国は少なく、罹患率減少の鈍化が認められている。最大の要因としては途上国からの外国人労働者・移住者の増加、ホームレス等の都市貧困層の増加が考えられる<sup>2)</sup>。社会構造や政治制度の変動をも考慮した結核対策が世界的に求められているといえる。著しい国際化が進展する現状をふまえて、わが国においても地球レベルの対策と連携しながら結核制圧の取り組みを進めていく必要がある。

愛知県においても、結核対策が公衆衛生上の重要な課題であるとの認識と体制の維持強化が求められる。当面取り組む

べき対策としては(1)潜在性結核感染症の治療を中心とする発病予防の取り組み強化に加えて、(2)国際的企業が多く立地し定住外国人が多い、エイズ・HIV感染者報告数が未だに減少に転じていない、といった地域特性をふまえ、ハイリスク者、外国人を中心とした患者発見の重点化、(3)受診が遅れがちな働き盛り世代や高齢者など世代別の診断・治療・支援、(4)高罹患率を示す都市部における患者対策など罹患構造の変化に対応した対策が必要<sup>15)</sup>と考えられる。

今後は、まず今回実施した手法を用いて喀痰塗抹陽性罹患数予測や結核による死亡者数予測を行いたい。また今回の予測では出生年による影響を考慮せず若年期の衛生状態を反映していないが、男では50歳代、女では20～40歳代の罹患率が将来横ばいとなることが予測されたことから、出生コホートを考慮した予測モデルの検討を再度行う必要がある。わが国の2010年における年齢別推計既感染率をみると20歳代1%、30歳代3%と低いのに対し、60歳代35%、70歳代58%、80歳代74%と圧倒的に高い。現在60歳代の年齢階層が2030年には80歳代を迎え、がんや免疫抑制剤治療などにより発病が促進された既感染者が患者発生の母地になるものと推察される。従って、結核高まん延時代の影響を受けた出生コホート集団(2010年現在で50歳以上)の存在は予測を行う上での重要な要因のひとつとなる<sup>16)</sup>。さらに愛知県(名古屋市含む)における保健所別罹患率では、保健所別人口規模や年次変動の違いはあるものの、10.2から70.5と大きな格差が認められている<sup>10)</sup>。各保健所における人口の年齢構成、職業の特性、外国人人口割合などの地域特性を考慮した予測モデルの検討を行い、患者への保健所からの指導に直結する結核対策策定に有用となる情報提供等地域保健対策の現場で役立つ調査研究をめざしたい。愛知県基幹地方感染症情報センターとして、精度の高いサーベイランスデータ収集に努め、その情報を

活用した解析を実施し、今後愛知県における結核対策の策定及び評価に貢献していきたい。

#### 文 献

- 1)大森正子:結核罹患率減少速度鈍化の要因.結核 1993,581-588.
- 2)WHO: Global Tuberculosis Control 2009.
- 3)総務省:日本の統計 2011 第2章人口・世帯,国籍別登録外国人数.
- 4)公益財団法人結核研究所疫学情報センター:「結核の統計」関係資料.  
[http://www.jata.or.jp/rit/ekigaku/toukei/pertinent\\_material/](http://www.jata.or.jp/rit/ekigaku/toukei/pertinent_material/)
- 5)愛知県:愛知県結核対策プラン, 2011年9月.
- 6)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).
- 7)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.
- 8)黒石哲生,広瀬かおる,他:日本のがん死亡の将来推計.がん・統計白書 罹患/死亡/予後 2004,219-234.
- 9)国立社会保障・人口問題研究所:将来推計人口・世帯数 日本の将来推計人口,日本の都道府県別将来推計人口 平成19年5月中位推計.
- 10)愛知県健康福祉部健康担当局健康対策課:愛知の結核2010,2012年3月.
- 11)結核に関する特定感染症予防指針(平成19年3月30日厚生労働省告示第72号平成23年改正厚生労働省告示第161号)
- 12)Dolin PJ, Raviglione MC, Kochi A:Global tuberculosis incidence and mortality during 1990-2000.Bulletin of the World Health Organization, 72(2),213-220,1994.
- 13)大森正子,青木正和:都道府県別結核罹患率の将来予測,日本公衆衛生雑誌,44(10),741-748,1997.
- 14)大森正子,吉山崇,石川信克:日本の結核蔓延に関する将来予測,結核,83(4),365-377,2008.

15)石川信克：わが国の結核対策の現状と課題(3)「世界、日本の結核の疫学と課題」,日本公衆衛生雑誌, 55(11), 791-794, 2008.

16)大森正子：わが国における結核の根絶年の予測, 結核, 66(12), 819-828, 1991.

# Estimation of the future epidemiological situation of tuberculosis incidence in Japan and Aichi Prefecture

Masako Tsuzuki, Hiroki Sakurai, Kaoru Hirose, Kenjiro Ohnishi,  
Hiroko Minagawa

Although it is estimated that tuberculosis(TB) would be eliminated around 2030 in most European and other industrialized countries, TB incidence rate in Japan remains the level of middle-burden country. Based on the current TB surveillance and various census data, we predicted the TB incidence rates, in order to clarify the emerging/urgent issues of TB control and eventual elimination.

Annual reports of new TB registrations were used for observing past trends (1987-2009) of TB, and predictions were then made assuming that past trends would continue. We applied exponential model to estimation.

The predicted future TB incidence rate in Aichi Prefecture, which was 21.8 per 100,000 population as of 2010, would continuously decrease to reach 18.8 in 2015, 11.0 in 2030, respectively. The year when the national TB incidence rate in Japan will reach the level of low-burden countries, i.e., less than 10 per 100,000 population, might be around 2025 in Japan, however, Aichi Prefecture would miss the goal by the year 2030. At that time, the age composition of TB patients will be dominated by very old (i.e., 70 years old and over) patients, followed by the young adult and middle-aged patients. Problems such as delay in diagnosis and difficulty/failure of treatment among very old patients are apprehended, unless significant enforcement on anti-TB policy targeting those population are taken.

**Key words :** tuberculosis, incidence rate, estimation

---

## 調 査 研 究

---

# 遺伝子検出範囲拡大による急性呼吸器感染症患者検体 からのウイルス検出感度向上の試み

安達啓一、廣瀬絵美、藤原範子、伊藤 雅、安井善宏、小林慎一、  
山下照夫、秦 眞美、平松礼司、皆川洋子

### 要 旨

急性呼吸器感染症は、特に乳幼児や高齢者で重要であり、多くのウイルスが病原体となる。愛知県では感染症発生動向調査などの病原体検索において、呼吸器系ウイルスを含む多くのウイルス検出を、ウイルス分離と遺伝子検出を主体に実施している。しかし呼吸器系ウイルスの検出率は、インフルエンザウイルスを除き、腸管系ウイルスに比べ呼吸器疾患患者検体からも低率にとどまっている。そこで呼吸器系ウイルスの検出率向上の一環として、ヒトメタニューモウイルス (human metapneumovirus: HMPV)、RS ウイルス (respiratory syncytial virus: RSV)、パラインフルエンザウイルス (parainfluenza virus: PIV) 1,2,3,4 型について既報の RT-PCR (逆転写・ポリメラーゼ連鎖反応) 法による遺伝子検出を試みた。なお、PIV-1~4 はマルチプレックス法を用いて同時に検出した。2009 年 4 月~2011 年 3 月に搬入された呼吸器系ウイルス感染が疑われる患者の咽頭ぬぐい液 546 検体のうち 54 件 (9.9 %) からウイルス遺伝子が検出され、各ウイルスの陽性率は、HMPV 5.2 % (15/289)、RSV 4.5 % (23/515)、PIV 6.1 % (PIV-2: 3/264、PIV-3: 12/264、PIV-4: 1/264) であった。HMPV、RSV および PIV について、遺伝子検出に基づくウイルスの特定が当所に搬入される検体においても可能となり、検出率向上が期待されると共に、これらのウイルスの関与が疑われる集団発生等における疫学解析の可能性が広がった。

キーワード：感染症発生動向調査、集団発生、ヒトメタニューモウイルス、RS ウイルス、パラインフルエンザウイルス、PCR

### 序 文

日本を含む先進諸国では急性呼吸器感染症 (acute respiratory infections: ARI) のほとんどがウイルスによるものとされており<sup>1)</sup>、原因ウイルスとしてインフルエンザウイルス (influenza virus)、RS ウイルス (respiratory syncytial virus: RSV)、パラインフルエンザウイルス (parainfluenza virus: PIV)、ヒトメタニ

ューモウイルス (human metapneumovirus: HMPV)、ライノウイルス (rhinovirus)、エンテロウイルス (enterovirus)、アデノウイルス (adenovirus)、ヒトボカウイルス (human bocavirus) など多くのウイルスが知られている<sup>1)~6)</sup>。ARI は特に乳幼児や高齢者、免疫機能不全患者において重症化するリスクが高いほか、施設内での集団発生も報告されている<sup>5)~11)</sup>。

愛知県で実施している感染症発生動向調査を始めとする病原体検索では、呼吸器系ウイルスについては上気道炎・下気道炎など呼吸器系ウイルス感染が疑われる患者の咽頭ぬぐい液からウイルス分離を中心に行っている。しかし、2008年度における検出率はインフルエンザウイルスを除くと約3%であり、腸管系ウイルス約19%に比べ低率にとどまっている。その理由としては、現在分離に用いている細胞がピコルナウイルス、アデノウイルスをはじめとする腸管系ウイルス分離効率を主眼に選択したことに加えて、当所における遺伝子検索対象範囲が狭いことが考えられる。病原診断や疫学調査の精度向上には原因ウイルスの特定が不可欠である。そこで呼吸器系ウイルスの検出率向上のため、インフルエンザ以外の主な呼吸器系ウイルスとしてHMPV、RSV、PIV-1、2、3、4型についてRT-PCR（逆転写・ポリメラーゼ連鎖反応）法プロトコルを検討した。

#### 材料と方法

##### 1. 検体

2009年4月～2010年3月の期間に感染

症発生動向調査等により当所に搬入された検体のうち、上気道炎、下気道炎等の呼吸器感染症及び不明熱、髄膜炎、脳炎・脳症等、呼吸器系ウイルス検索の意義が認められる臨床診断を付された咽頭ぬぐい液検体546件を研究対象とした。

##### 2. RT-PCR

検体から High Pure Viral RNA kit (Roche, Germany) を用いてウイルス RNA を抽出した。

以下のプロトコルにおいて、第一段階の RT-PCR はすべて QIAGEN OneStep RT-PCR Kit (QIAGEN, Germany) にて行った。HMPV については F (fusion protein) 遺伝子を対象に、RT-PCR および 2nd PCR (Takara Ex Taq, Takara, Japan) を行った。RSV については N (nucleoprotein) 遺伝子から P (phosphoprotein) 遺伝子の領域を対象に RT-PCR を行った。PIV-1～4 については、HN (hemagglutinin-neuraminidase) 遺伝子 (PIV-1～3) または P 遺伝子 (PIV-4) を対象に、マルチプレックス法を用いて RT-PCR 及び 2nd PCR (KOD FX, TOYOBO, JAPAN) を行い同時に検出した。使用したプライマーを表 1 に示した。

表 1 用いたプライマー

ウイルス	プライマー	配列 (5' 3')	参考文献	
HMPV (RT-PCR)	MPVF1f	CTTTGGACTTAATGACAGATG	12)	
	MPVF1r	GTCTTCCTGTGCTAACTTTG		
HMPV (2nd PCR)	MPVF2f	CATGCCGACCTCTGCAGGAC	13)	
	MPVF2r	ATGTTGCAYTCYTTGATTG		
RSV (RT-PCR)	RSVAB1	GTCTTACAGCCGTGATTAGG	14)	
	RSVAB2	GGGCTTTCTTTGGTTACTTC		
PIV (RT-PCR)	PIP1+	CCTTAAATTCAGATATGTAT	15)	
	PIP1-	GATAAATAATTATTGATACG		
	PIP2+	AACAATCTGCTGCAGCATTT		
	PIP2-	ATGTCAGACAATGGGCAAAT		
	PIP3+	CTGTAAACTCAGACTTGGTA		
	PIP3-	TTTAAGCCCTTGCAACAAC		
	PI4P+	CTGAACGGTTGCATTCAGGT		16)
	PI4P-	TTGCATCAAGAATGAGTCCT		
PIV (2nd PCR)	PIS1+	CCGGTAATTTCTCATACCTATG	15)	
	PIS1-	CTTTGGAGCGGAGTTGTTAAG		
	PIS2+	CCATTTACCTAAGTGATGGAAT		
	PIS2-	GCCCTGTTGTATTTGGAAGAGA		
	PIS3+	ACTCCCAAAGTTGATGAAAGAT		
	PIS3-	TAAATCTTGTTGTTGAGATTG		
	PI4S+	AAAGAATTAGGTGCAACCAGTC		16)
	PI4S-	GTGTCTGATCCCATAAGCAGC		

## 結果及び考察

1. 各ウイルス遺伝子の検出成績 (表 2)  
 全 546 検体中 54 件 (9.9 %) よりウイルス遺伝子が検出された。HMPV、PIV-3、RSV の順に陽性率が高かった。PIV-1 は検出されなかった。

表 2 各ウイルスの陽性率

ウイルス	検体数	陽性数	陽性率
HMPV	289	15	5.2 %
RSV	515	23	4.5 %
PIV-1	264	0	0.0 %
PIV-2		3	1.1 %
PIV-3		12	4.5 %
PIV-4		1	0.4 %
Total	546	54	9.9 %

2. 上気道炎および下気道炎から検出されるウイルスの比較 (図 1)

臨床診断名が上気道炎および下気道炎であった患者検体について、ウイルスごとに陽性率を比較すると、HMPV は上気道炎 3.4 % (6/177)、下気道炎 7.2 % (5/69)、RSV は上気道炎 0 % (0/165)、下気道炎 13.1 % (8/61)、PIV-3 は上気道炎 3.6 % (6/169)、下気道炎 7.3 % (4/55) であり、これらの

ウイルスは下気道炎患者検体からより高率に検出された。ウイルスが検出された下気道炎患者はすべて 4 歳以下であった。乳幼児の下気道炎の原因は RSV がもっとも多く、次いで PIV-3 と報告されている<sup>6)</sup>が、本研究でも同様の結果が得られた。一方 PIV-2、PIV-4 は上気道炎患者検体のみからそれぞれ 1.2 % (2/169)、0.6 % (1/169) 検出され、下気道炎患者からは検出されなかった。

3. 流行ウイルスの季節変動 (図 2)

各ウイルス遺伝子の陽性率を検体採取月別に比較すると、冬、春、夏では各々検出されるウイルスの交替がみられた。すなわち、RSV は 2009 年 10 月から 2010 年 1 月に検出され、その後 2 月から 5 月にかけて HMPV が、5 月と 6 月に PIV-3 が検出された。PIV-3 は 2009 年にも 4 月から 7 月と同様の時期に検出され、HMPV は 2009 年には 5 月に検出されている。2010 年 2 月以降の RSV の検出は 2011 年 1 月のみであった。一般に RSV は冬に多く、その後に HMPV の流行のピークがあり<sup>4), 5)</sup>、PIV-3 は春から初夏にかけて多い<sup>6)</sup>と報告されているが、今回の我々の調査においても同様のパターンで流行が移り変わっている事が示された。

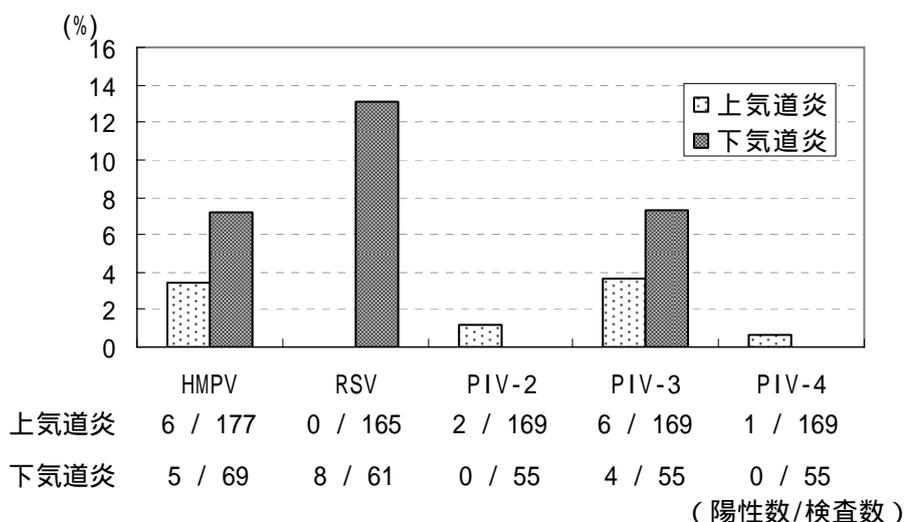


図1 上気道炎および下気道炎における各ウイルスの陽性率

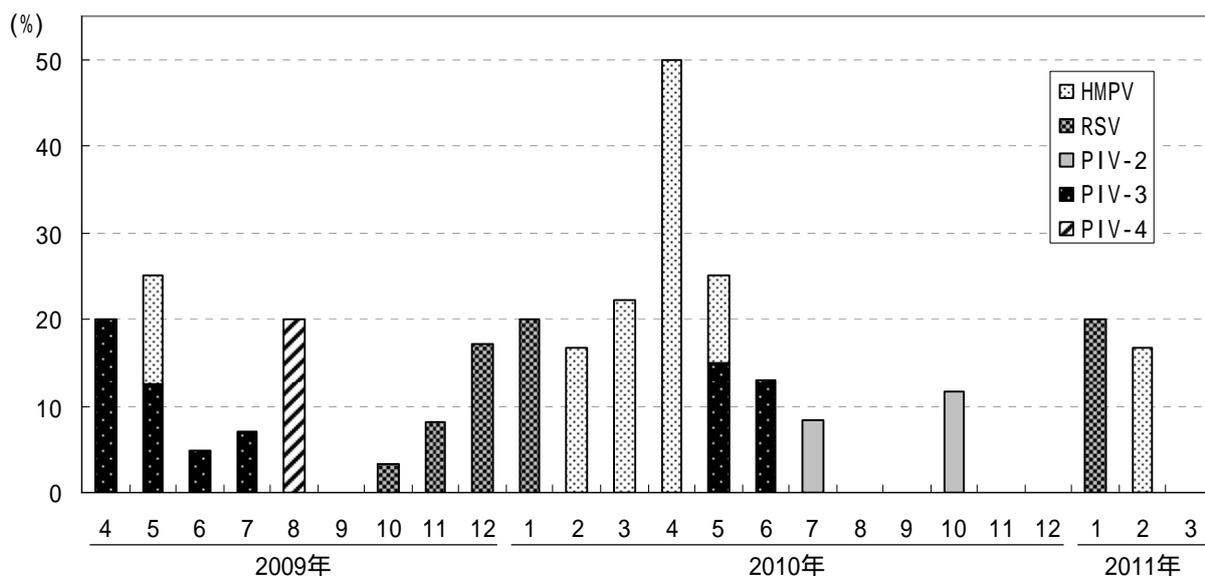


図2 検体採取月別、呼吸器系ウイルス遺伝子の陽性率

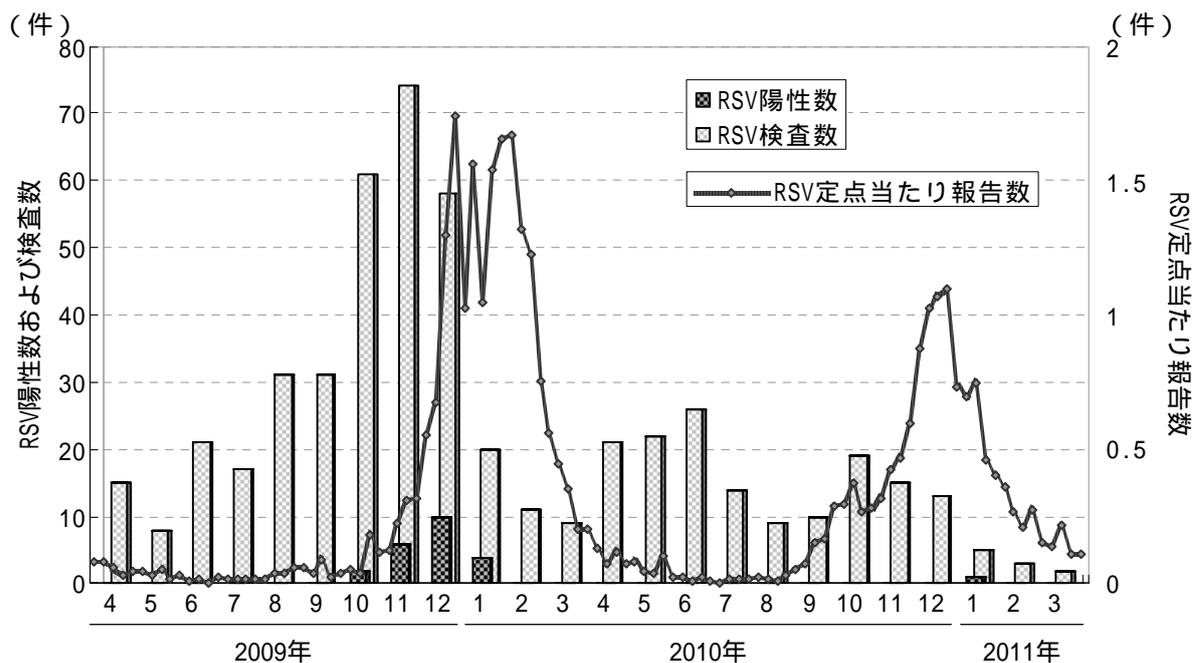


図3 RSVの定点当たり患者報告数と検体採取月別陽性数および検体数

4. RSV の検出数と定点当たり患者報告数の比較 (図3)

検体採取月別の RSV 検出数と、愛知県感染症発生動向調査における小児科定点当たり週別患者報告数及び月別検査検体数を比

較対照可能な形で図3に示す。検体数のピークは、患者報告数より1ヶ月程度先行していた。定点当たり患者報告数が多い流行時期にほぼ一致してウイルス遺伝子陽性検体が採取されている。

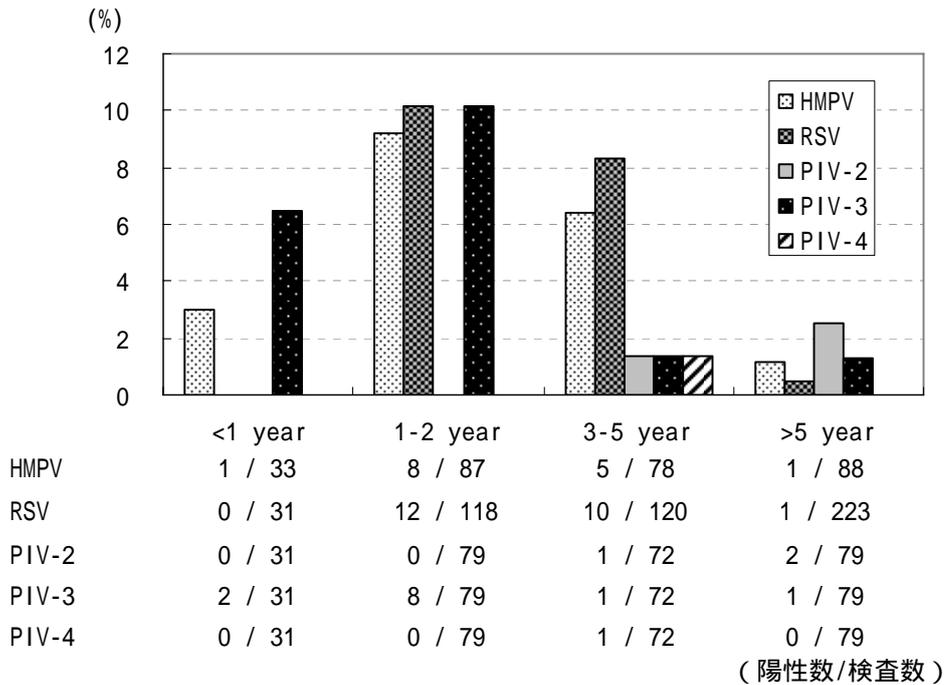


図4 年齢別各ウイルス遺伝子の陽性率

#### 5. 各ウイルスの年齢別陽性率 (図4)

年齢別に各ウイルス遺伝子の陽性率を比較した。1～2歳ではHMPV、RSV、PIV-3がそれぞれ9.2%(8/87)、10.2%(12/118)、10.1%(8/79)と高い陽性率を示した。3～5歳では、HMPV、RSVがそれぞれ6.4%(5/78)、8.3%(10/120)とある程度の値を示すのに対して、PIV-3は1.4%(1/72)と陽性率が下がっていた。5歳以上ではHMPV、RSV、PIV-3のいずれも低い陽性率を示した。逆にPIV-2は3歳以上の患者からのみ検出された。RSVは母体からの移行抗体が存在するものの感染防御に十分ではなく、多くの乳児が生後1年までにRSVに罹患するため、0歳児での検出が多い事が予想されたが、実際には検出されなかった。この理由としては、0歳児の検体が他の年齢層に比べ少ない事や、特に生後6か月以内の乳児では重症化しやすいため、入院治療中に迅速診断キット検査が実施され当所に検体が搬入されなかった可能性が考えられる。

#### まとめと今後の課題

用いた546検体中54件(9.9%)からウイルス遺伝子が検出され、季節や年齢によ

る陽性率の差異が認められた。RT-PCR法によるHMPV、RSV及びPIVの遺伝子検出が当所に搬入される検体においても有用であることが確認できた。遺伝子検出法の実施範囲については、費用対効果等も検討する必要があるが、今後これらのウイルスの関与が疑われる集団発生等に際して疫学解析に有用な検査を実施できる可能性を示すことができた。

感染症発生動向調査においては、単なる病原体同定にとどまらず、病原体の抗原性や薬剤耐性等の性状変化をも検索することが望ましいが、PCR法による遺伝子検出だけでは、ウイルスの性状に関する情報はわずかしか得られない。したがって、引き続き遺伝子検出だけでなくウイルス分離効率を高める必要がある。HMPV、RSVおよびPIVに関して、Vero E6細胞、MDCK細胞、HEp-2細胞等を用いた分離の報告<sup>17)</sup>等を参考に、現在当所が用いているMDCK細胞、HeLa細胞、RD-18DS細胞およびVero細胞に加えて(もしくはVero細胞に代えて)、Vero E6細胞およびHEp-2細胞の使用が有効であると考えられる。ただし、HMPV、RSVおよびPIVは分離が比較的難しい<sup>18)</sup>ことや、研

研究室ごとに永く継代を繰り返した培養細胞はしばしば性質の変化がみられることから、培養条件等についても注意深く検討する必要がある。

なお、本研究の概要は、平成 23 年度愛知県公衆衛生研究会(2012 年 1 月 20 日 愛知県大府市)にて口演発表した。

#### 参考文献

- 1) Mäkelä M J, Puhakka T, Ruuskanen O, Leinonen M, Saikku P, Kimpimäki M, Blomqvist S, Hyypiä T, Arstila P: Viruses and bacteria in the etiology of the common cold, *Journal of Clinical Microbiology*, 36(2), 539-542, 1998.
- 2) Tregoning J S, Schwarze J: Respiratory viral infections in infants: causes, clinical symptoms, *Virology, and Immunology, Clinical Microbiology Reviews*, 23(1), 74-98, 2010.
- 3) 菊田英明: ヒト・メタニューモウイルス, *ウイルス*, 56(2), 173-182, 2006
- 4) Kahn J S: Epidemiology of human metapneumovirus, *Clinical Microbiology Reviews*, 19(3), 546-557, 2006.
- 5) Schildgen V, van den Hoogen B, Fouchier R, Tripp R A, Alvarez R, Manoha C, Williams J, Schildgen O: Human metapneumovirus: lessons learned over the first decade, *Clinical Microbiology Reviews*, 24(4), 734-754, 2011.
- 6) Henrickson K J: Parainfluenza viruses, *Clinical Microbiology Reviews*, 16(2), 242-264, 2003.
- 7) Honda H, Iwabashi J, Kashiwagi T, Imamura Y, Hamada N, Anraku T, Ueda S, Kanda T, Takahashi T, Morimoto S: Outbreak of human metapneumovirus infection in elderly inpatients in Japan, *Journal of the American Geriatrics Society*, 54(1), 177-180, 2006.
- 8) 秦真美, 田中正大, 伊藤雅, 山下照夫, 皆川洋子: 愛知県におけるヒトメタニューモウイルス感染の状況, *愛知県衛生研究所報*, 59, 11-18, 2009.
- 9) Maziarz R T, Sridharan P, Slater S, Meyers G, Post M, Erdman D D, Peret T C, Taplitz R A: Control of an outbreak of human parainfluenza virus 3 in hematopoietic stem cell transplant recipients, *Biology of blood and marrow transplantation*, 16(2), 192-198, 2010.
- 10) Piralla A, Percivalle E, Di Cesare-Merlone A, Locatelli F, Gerna G: Multicenter nosocomial outbreak of parainfluenza virus type 3 infection in a pediatric oncohematology unit: a phylogenetic study, *Haematologica*, 94(6), 833-839, 2009.
- 11) Teo W Y, Rajadurai V S, Sriram B: Morbidity of parainfluenza 3 outbreak in preterm infants in a neonatal unit, *Annals of the Academy of Medicine Singapore*, 39(11), 837-842, 2010.
- 12) Peret T C, Boivin G, Li Y, Couillard M, Humphrey C, Osterhaus A D, Erdman D D, Anderson L J: Characterization of human metapneumoviruses isolated from patients in North America, *Journal of Infectious Diseases*, 185(11), 1660-1663, 2002.
- 13) Takao S, Shimozone H, Kashiwa H, Shimazu Y, Fukuda S, Kuwayama M, Miyazaki K: Clinical study of pediatric cases of acute respiratory diseases associated with human metapneumovirus in Japan, *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 56(3), 127-129, 2003.
- 14) Stockton J, Ellis J S, Saviile M, Clewley J P, Zambon M C: Multiplex PCR for typing and subtyping influenza and respiratory syncytial viruses, *Journal of Clinical Microbiology*, 36(10), 2990-2995, 1998.
- 15) Echevarría J E, Erdman D D, Swierkosz E M, Holloway B P, Anderson L J:

- Simultaneous detection and identification of human parainfluenza viruses 1, 2, and 3 from clinical samples by multiplex PCR, *Journal of Clinical Microbiology*, 36(5), 1388-1391, 1998.
- 16) Aguilar J C, Pérez-Breña M P, García M L, Cruz N, Erdman D D, Echevarría J E: Detection and identification of human parainfluenza viruses 1, 2, 3, and 4 in clinical samples of pediatric patients by multiplex reverse transcription-PCR, *Journal of Clinical Microbiology*, 38(3), 1191-1195, 2000.
- 17) Mizuta K, Abiko C, Aoki Y, Suto A, Hoshina H, Itagaki T, Katsushima N, Matsuzaki Y, Hongo S, Noda M, Kimura H, Ootani K: Analysis of monthly isolation of respiratory viruses from children by cell culture using a microplate method: a two-year study from 2004 to 2005 in Yamagata, Japan, *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 61(3), 196-201, 2008.
- 18) 水田克巳: 山形県および全国における呼吸器ウイルス(特にパラミクソウイルス)検出状況について, *病原微生物検出情報*, 29, 279-281, 2008.

# Improved detection of respiratory viruses from throat swabs by introducing additional RT-PCR protocols

Hirokazu Adachi, Emi Hirose, Noriko Fujiwara, Miyabi Ito, Yoshihiro Yasui, Shinichi Kobayashi, Teruo Yamashita, Mami Hata, Reiji Hiramatsu, Hiroko Minagawa

Acute respiratory infections (ARIs) have considerable impact especially on infants, elderly adults and immunocompromised individuals, and a wide range of viruses are known to cause ARIs. Specimens collected from patients with respiratory illness through the infectious agent surveillance in Aichi Prefecture have been tested for respiratory viruses for more than a decade. However, with the exception of influenza viruses, the detection rates of respiratory viruses are considerably low, compared to the enteric viruses. This is probably because the cell lines currently used in the virology laboratory tend to isolate enteric rather than respiratory viruses, and the range of respiratory viruses tested by molecular methods is rather limited. As an effort to improve the overall detection rate, we introduced RT-PCR assays for detection of human metapneumovirus (HMPV), respiratory syncytial virus (RSV) and human parainfluenza virus (PIV)-1, 2, 3 and 4, including multiplex assay for PIV-1-4. We evaluated 546 respiratory specimens collected from April 2009 to March 2011 for the presence of viral RNA mentioned above, and detected in 54 (9.9 %) of these samples. The positive rates of each virus were: HMPV 5.2 % ( 15/289 ), RSV 4.5 % ( 23/515 ), PIV 6.1 % ( PIV-2: 3/264, PIV-3: 12/264, PIV-4: 1/264 ) . Introduction of RT-PCR assays improved the detection rate of respiratory viruses, and will be useful in case of outbreak by these viruses.

**Key words:** surveillance, outbreak, human metapneumovirus, respiratory syncytial virus, human parainfluenza virus, PCR

---

## 調 査 研 究

---

# 愛知県における胃腸炎ウイルス検出状況(2010/11 シーズン)と 遺伝子解析

藤原範子、廣瀬絵美、安達啓一、伊藤 雅、安井善宏、  
小林慎一、山下照夫、平松礼司、皆川洋子

### 要 旨

2010年4月から2011年3月までに感染症発生動向調査事業協力医療機関で採取された胃腸炎患者の糞便及び吐物、計324検体について胃腸炎ウイルス検索を試み、189検体(58.3%、189/324)から病原ウイルスが検出された。検出ウイルスの内訳は、ノロウイルス(NoV)が124検体(65.6%、124/189)、A群ロタウイルス(ARV)が47検体(24.9%)、アストロウイルス(AstV)が20検体(10.6%)、サポウイルス(SaV)が2検体(1.1%)であった。5検体からは、2種類のウイルスが検出された。NoV陽性124検体中、122検体(98.4%)はGII陽性、3検体(2.4%)はGI陽性であり、1検体からはGIとGIIの両方が検出された。塩基配列決定に基づく遺伝子型別の結果、GI陽性の3検体全てはGI.4、GII陽性122検体中、GII.3が76検体(62.3%)、GII.4が27検体(22.1%)、GII.2が11検体(9.0%)、GII.13が5検体(4.1%)、GII.1、GII.6及びGII.12が各1検体(0.8%)であった。GII.4が優勢であった2006/07~2009/10シーズンと異なり、2010/11シーズンはGII.3が過半数を占めた。ARV陽性47検体のG血清型は、型別用PCR法の結果に基づいて決定した。G1が最多であり(57.4%、27/47)、G3(40.4%、19/47)、G2(2.1%、1/47)の順であった。AstV血清型別は、型特異的PCR法で行い、1型が15検体(75.0%)、3型が1検体(5.0%)、8型が4検体(20.0%)であった。SaVは遺伝子型GI.1及びGI.2を各1検体検出した。

NoV GII.4陽性27検体の構造タンパク遺伝子系統樹解析の結果、19検体が2006b型、1検体が2004型、7検体が2009a型に分類されたが、新たな系統樹に属するNoV GII.4変異株は検出されなかった。サーベイランスにより得られたウイルスの分子疫学解析情報は、愛知県における胃腸炎ウイルスの防疫対策に有用と考えられた。

キーワード：感染性胃腸炎、ウイルス遺伝子型解析、分子疫学、サーベイランス

### 序 文

わが国の感染症発生動向調査における感染性胃腸炎は細菌、ウイルス、原虫などの病原微生物を原因とした、下痢、嘔吐、腹

痛、発熱などを主症状とする感染症を指す<sup>1)</sup>。感染性胃腸炎は年間を通じて発生するが、例年晩秋から冬季にかけてピークとなる。感染性胃腸炎は年間を通じてみられる

が、冬季はウイルス性が中心であり、夏季は細菌性が主となっている。感染性胃腸炎は感染症法で5類感染症定点把握疾患に定められており、全国約3,000箇所うち愛知県182箇所(名古屋市を含む)の小児科定点医療機関での患者発生数が毎週国立感染症研究所で集計されている。

愛知県衛生研究所では愛知県感染症発生動向調査事業の一環として、愛知県衛生研究所ウェブページ

<http://www.pref.aichi.jp/eiseiken/>

にて、愛知県感染症情報の週報及び月報に患者報告数等を掲載するとともに、県内の病原体定点医療機関(名古屋市を除く)で採取された感染性胃腸炎患者検体の原因ウイルス検索を行っている。2006/07シーズンは全国でノロウイルス(NoV)による感染性胃腸炎が大流行し、老人施設、病院や学校でのNoV集団感染事例やNoV感染調理従事者を介した集団食中毒事件も多発し、大きな社会問題となった。感染性胃腸炎患者から検出されるウイルスは集団食中毒や集団感染の原因ウイルスともなることから、病原体の特定は防疫対策上有用な情報となる。

本稿では2010年4月から2011年3月までの1年間に、愛知県感染症発生動向調査事業により当所に搬入された感染性胃腸炎患者検体及び同様に採取・搬入された中核市病原体定点の検体について実施した、病原ウイルス検出と遺伝子型別等の結果に解析と考察を加えて報告する。

## 材料と方法

### 1. 検査検体

2010年4月から2011年3月までに感染症発生動向調査事業の病原体定点(中核市病原体定点含む)で採取された散発性感染性胃腸炎患者の糞便及び吐物、計324検体を用いた。

Veal infusion brothで糞便を10%乳剤、吐物は50%乳剤とした後、10,000 Gで遠心分離し、上清からHigh Pure Viral RNA Kit (Roche, Germany)を用いてウイルスRNAを抽出した。

### 2. ウイルス検査法

ノロウイルス(NoV)、A群ロタウイルス(ARV)及びアストロウイルス(AstV)についてはウイルス性下痢症診断マニュアル<sup>2)</sup>に収載されたプライマーを用いたRT-PCR(Reverse transcription-polymerase chain reaction: 逆転写ポリメラーゼ連鎖反応)法を用いてウイルス検出検査を実施した。

NoVの遺伝子型は、構造タンパク遺伝子のPCR増幅産物をWizard SV Gel and PCR Clean-up System (Promega, USA)及びBigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (ABI, USA)を用いたダイレクトシーケンス法で塩基配列を決定し、Katayamaらの方法<sup>3)</sup>に従い型別分類した。GII.4 NoV株については、さらにGII.4のクラスター分類を目的として既知のGII.4変異株との相同性を解析した。系統樹解析はClustalWを用いた近隣結合(NJ)法で行った。

ARVの外殻(カプシド)糖タンパク(VP7)の血清型(P型)及びAstVの血清型は、ウイルス性下痢症診断マニュアル<sup>2)</sup>の血清型別用プライマーを用いた遺伝子増幅法(PCR)に従って決定した。

サポウイルス(SaV)については、Okadaら方法<sup>4)</sup>に従い構造タンパク(カプシド)遺伝子を増幅後、塩基配列を決定し遺伝子型別した。

## 結果及び考察

### 1. 胃腸炎ウイルス検出状況

324検体中189検体(58.3%)から胃腸炎ウイルスが検出された。検出されたウイルスの内訳はNoVが124検体(65.6%)、ARVが47検体(24.9%)、AstVが20検体(10.6%)、SaVが2検体(1.1%)であった。

図1に胃腸炎ウイルスの月別検出状況を示した。感染症発生動向調査の感染性胃腸炎患者報告数が急増する11月~12月に、NoV GIIの検出頻度が高かった。その後2~3月にはNoV流行の終息と入れ替わるように、ARVが高頻度に検出され、NoVとARVの流行に季節性が認められた。

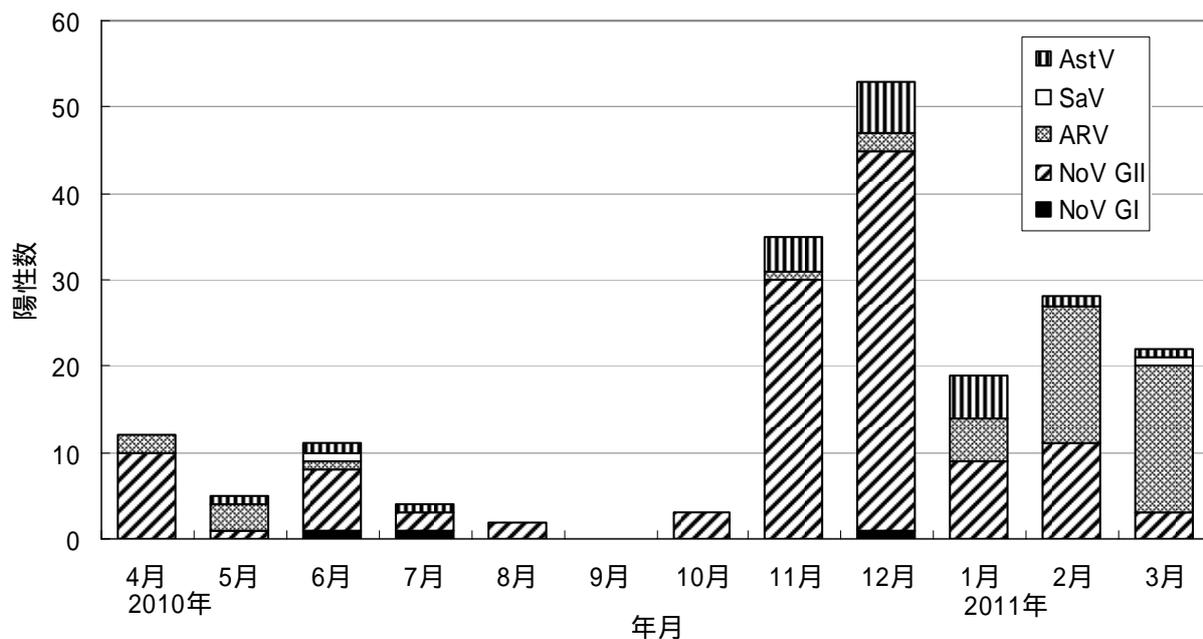


図1 発病月別ウイルス検出状況

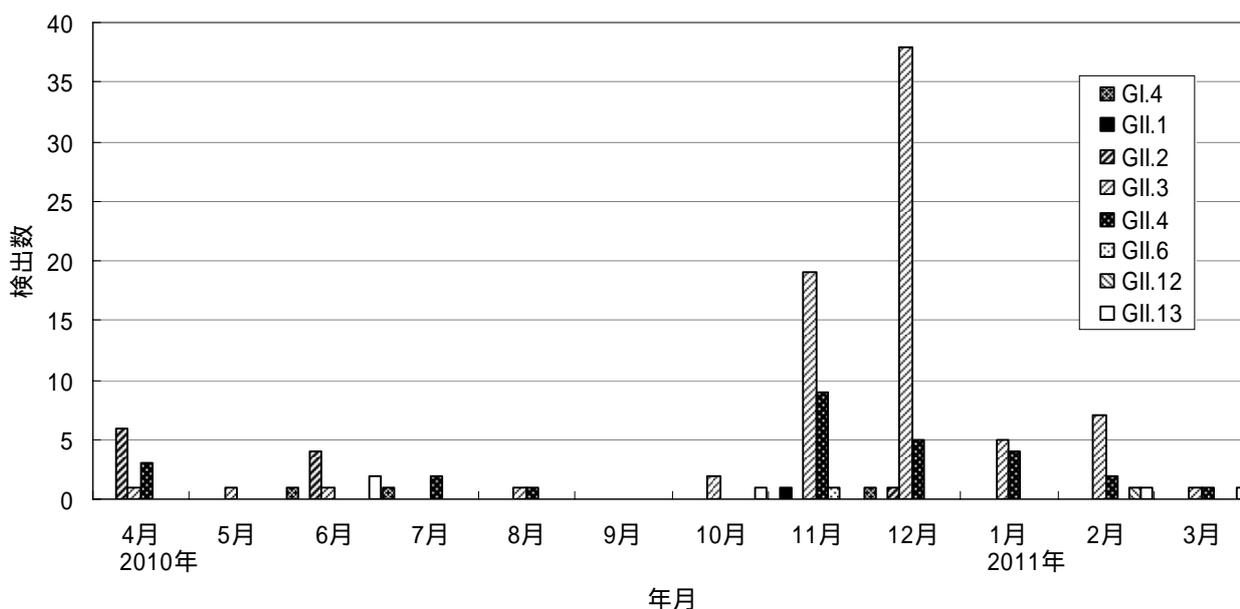


図2 月別ノロウイルス検出状況

AstV は 11 月から翌年の 1 月と NoV の流行期に一致して高頻度に検出された。SaV は 6 月と翌年の 3 月に各 1 株検出されたのみで、2009/10 シーズンの検出率 (0.7 %) とほぼ同率であった。

NoV の遺伝子群 (Genogroup) 別結果は、GI 陽性が 3 検体、GII 陽性が 122 検体であった (GI と GII の重複検出 1 例を含む)。遺伝子解析の結果、GI 陽性の 3 検体は GI.4 であった。GII 陽性の 122 検体中、GII.3

が 76 検体 (62.3 %)、次いで GII.4 が 27 検体 (22.1 %)、GII.2 が 11 検体 (9.2 %)、GII.13 が 5 検体 (4.1 %)、GII.1、GII.6 及び GII.12 が各 1 検体 (0.8 %) であった (図 2)。重複検出例の遺伝子型は GI.4 と GII.3 である。GII.4 は 2006/07 シーズンの大流行以降、2009/10 シーズンまで主流の遺伝子型であったが、2010/11 シーズンは GII.3 が主流となった (図 3)。現時点で NoV の培養増殖系や感染動物実験系が確立して

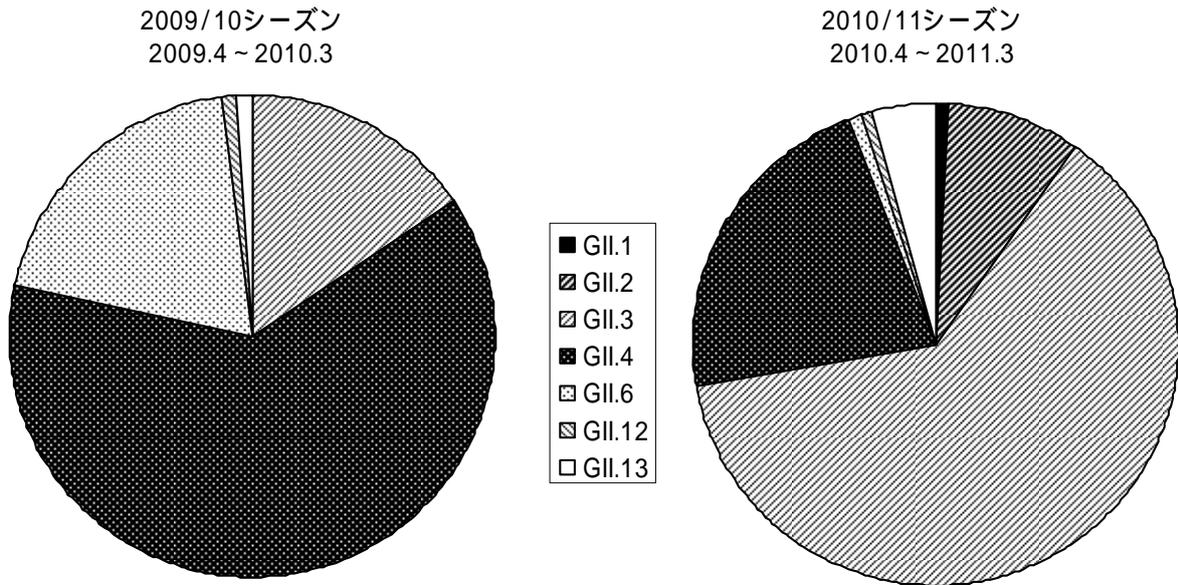


図3 NVG の遺伝子型別検出状況

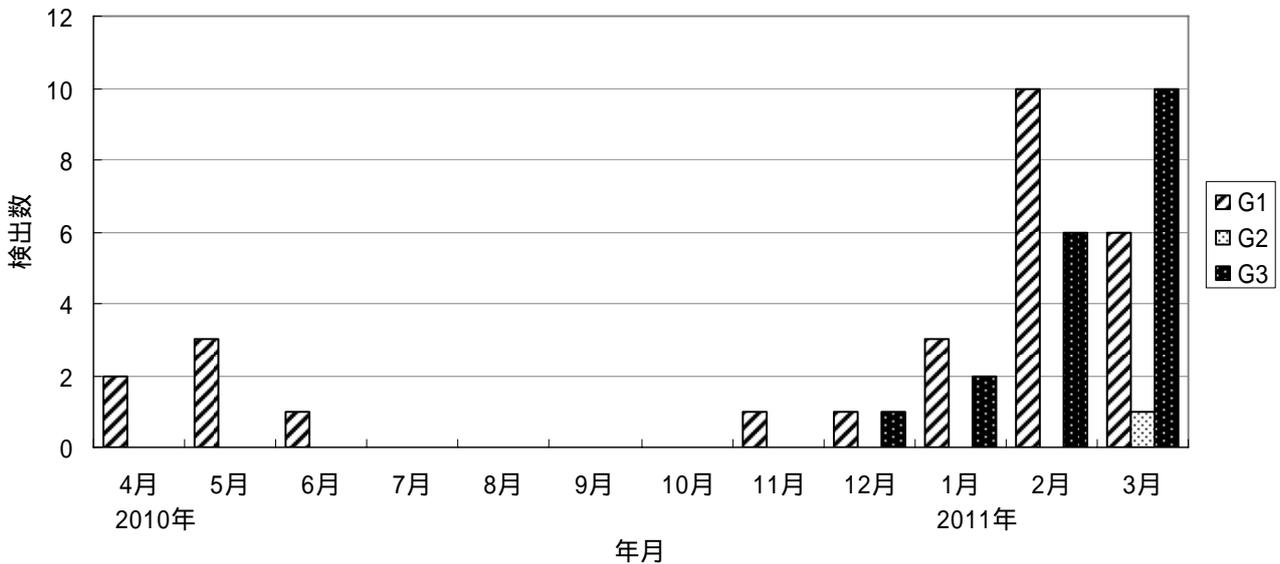


図4 月別ロタウイルス検出状況

いないため<sup>5)</sup>、遺伝子型による増殖能や病原性の比較検討は不可能である。GII.3 と GII.4 のような遺伝子型間の病原性やヒト中和抗体保有率を直接測定することはできないが、抗原に遺伝子組換えウイルス様粒子を用いる ELISA 法による抗体価<sup>6)</sup>などから一定の情報を得ることは可能である。愛知県では、本調査期間中に成人の GII.3 集団感染事例の発生は探知していない。調査対象の感染性胃腸炎患者の主体である小児からは高頻度に GII.3 が検出されたことから、GII.3 が 2006 年以前に流行して年長者

は免疫を保持している可能性若しくは年齢により GII.3 と GII.4 に対する感受性が変化する可能性が推察された。

ARV 陽性 47 検体の G 血清型別では、G1 が 27 検体 (57.4%)、G2 が 1 検体 (2.1%)、G3 が 19 検体 (40.4%) であった (図 4)。2006/07 ~ 2010/11 シーズンにおける愛知県の ARV G 血清型の年次推移をみると、主たる G 遺伝子型の年次変動を認めしたが、G1 が最も高頻度に検出され、以下、G3、G9、G2 の順で、G1 と G3 は 5 年間にわたり毎年検出された<sup>7)</sup>。2010/11 シーズンも過去 5

シーズンと同様の検出状況であることが確認された。近年、世界的に第二世代 ARV ワクチン導入が進められており、わが国でも 2011 年 11 月にロタリックス接種が開始され、ロタテックも承認申請の段階にある。ロタリックスは単価ヒトロタウイルス経口弱毒生ワクチン (G1P[8]) であり、ロタテックはウシ・ヒトロタウイルス組換えワクチン (G1~G4 と P[8] の 5 価) である。今後は、2 種の抗原性の異なるワクチン発症予防若しくは軽症化効果の把握及びワクチン株と野外株との遺伝子組換え (再集合) ウイルスの監視等を目的とした ARV の分離及び G 血清型の把握がワクチン導入後サーベイランスとして重要である。

AstV 陽性 29 検体の血清型別では、1 型が 15 検体 (51.7 %)、3 型が 1 検体 (3.4 %)、8 型が 4 検体 (16.0 %) であった。年間を通じて 1 型が検出されたが、2011 年 1 月に検出された AstV 4 検体については全て 8 型であり、一医療機関で採取された検体であったことから、地域流行を反映した結果と考えられた。病原微生物検出情報に掲載された 2010/11 シーズンの全国の AstV 検出報告数は 139 株<sup>8), 9)</sup> と NoV や ARV に比べて少ない。血清型別された AstV の中では 1 型が最も多く、次いで 4 型、3 型、8 型の順であった。愛知県でも同様に 1 型が大勢を占めていた。AstV 感染症の好発年齢は 0 ~ 4 歳とされる<sup>10)</sup>。本調査における AstV 陽性検体も乳幼児由来が大半を占めるが、8 型が検出された 4 検体は全て 12 ~ 16 歳の患者由来であった。2009 年長野県の食中毒疑い集団胃腸炎事例では従事者糞便より 8 型が検出されていることから<sup>11)</sup>、8 型は AstV の中でも罹患年齢や流行様式等の疫学的要因が他の血清型と異なることが推察され、今後ともその動向に注意する必要がある。

SaV の遺伝子群別及び遺伝子解析の結果は、GI.1 と GI.2 が各 1 検体であった。愛知県では 2010 年 1 月に、GI.2 による大規模食中毒事例を経験している<sup>12)</sup>。この事例以前に GI.2 が愛知県で検出されたことはなく、2009/10 シーズンの散発性感染性胃腸炎患者からも例年と異なる特徴を有するよう

SaV 流行は認められなかった。本シーズンでは GI.2 は 1 検体検出されたのみであり、地域流行には至らなかったと推察された。従来 SaV は小児の胃腸炎原因ウイルスと考えられてきたが<sup>11)</sup>、近年では成人の集団感染例が発生している<sup>12, 14) ~ 17)</sup>。わが国では GIV による食中毒事例 (横浜の修学旅行先での事例<sup>14)</sup>及び愛媛の結婚式場での事例<sup>15)</sup>) や、2010 年の GI.2 による愛知県<sup>12)</sup>及び川崎市<sup>16)</sup>の食中毒事例が報告されており、また、ヨーロッパ諸国<sup>17)</sup>でも SaV の流行が報告されている。SaV の感染源や感染経路等の疫学的な情報は依然不明とされているが<sup>13)</sup>、河川<sup>18)</sup>や下水<sup>19)</sup>などの環境水や二枚貝<sup>20)</sup>から SaV 検出が報告されていることから、SaV も NoV と同じ感染サイクルを有すると推察される。愛知県における SaV の流行は NoV ほど大きくはないものの、その動向には注視していく必要がある。

## 2. GII.4 株のクラスター解析

2006/07 シーズンに GII.4 の 2006b 型に分類される新たな変異株が出現し、世界的な大流行を起こした<sup>21)</sup>。それ以後、2009/10 シーズンまでの 4 シーズンに渡り 2006 型が主流株として流行してきた<sup>22)</sup>。この 4 シーズンの間には 2006a、2008a、2008b、2009a 型の新たな変異株の出現が確認されているが、いずれも大きな流行を引き起こすことなく経過している。しかし、2010/11 シーズンは GII.3 が台頭し、NoV の流行遺伝子型に変化を認めた。そこで、GII.4 の遺伝子変異解析を目的として GII.4 陽性の 27 株についてクラスター分類した結果、2006b 型が 19 株、2004 型が 1 株、2009a 型が 7 株であった (図 5)。大きくは 2 つのクラスターに分類されたが、GII.4 株に大きな遺伝子変異は起きていないことが確認された。従って、2006b 型が 4 シーズンに渡り流行してきたことから、GII.4 の流行規模の減少は免疫獲得による感受性者の減少がひとつの要因と推察された。今後、抗原性の異なる新たな GII.4 変異株が出現し、NoV 流行を引き起こすことも想定されることから、引き続き GII.4 変異株の出現に対する監視が必要である。

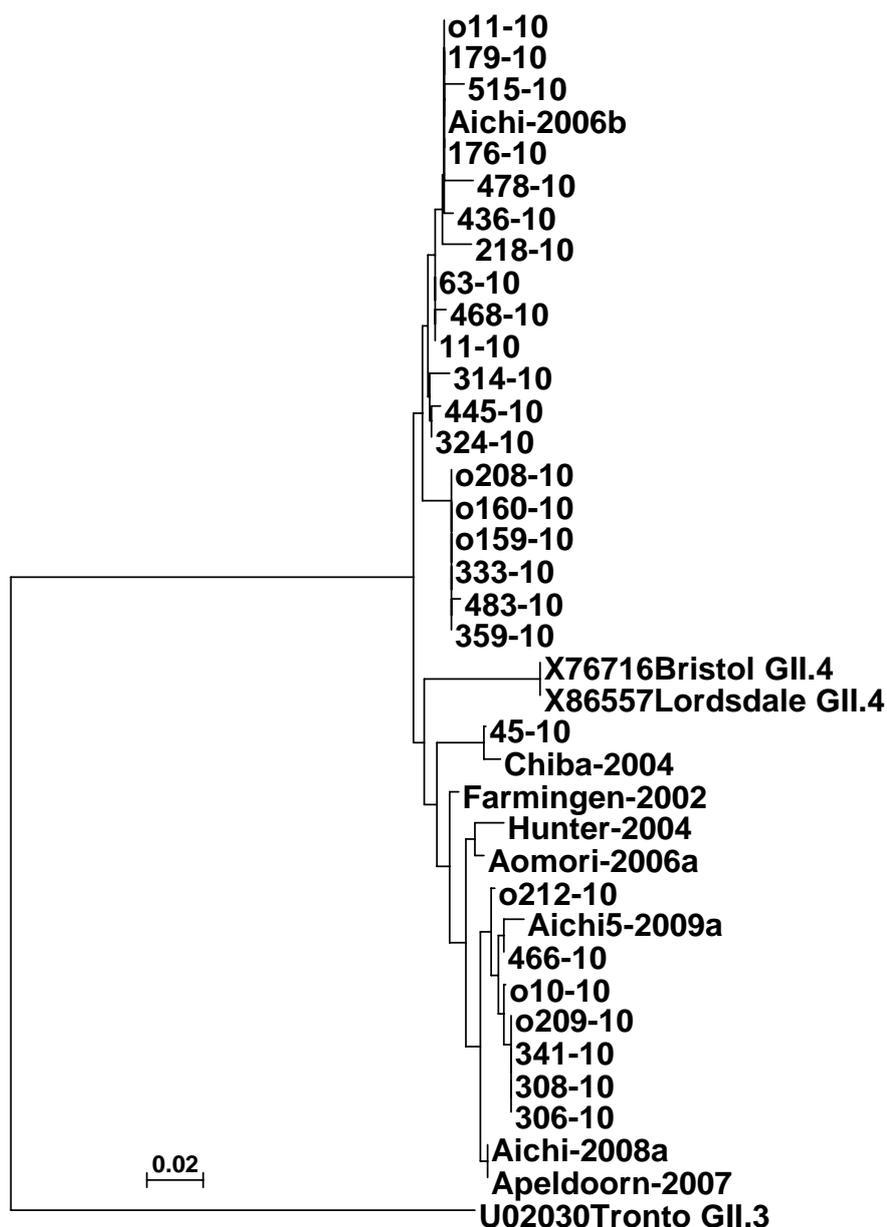


図5 GII.4 NoVのクラスター解析

まとめ

2010年4月から2011年3月までに感染症発生動向調査の病原体定点（愛知県と中核市）で採取された、散発性感染性胃腸炎患者の糞便および吐物、計324検体中189検体（58.3%）から胃腸炎ウイルスが検出された。今回、検出ウイルスの大勢はNoV GIIであったが、遺伝子解析の結果、流行遺伝子型に変化を認めた。今後、ロタウイルスワクチン接種の普及に伴いARVの流行

形態の変動も想定されることから、感染性胃腸炎の病原ウイルスの動向に注目が必要である。

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、生活衛生課の皆様へ深謝いたします。

#### 参考文献

- 1) 谷口清州：感染症の話・感染性胃腸炎，感染症週報 (IDWR)，5(11)，14-16，2003.
- 2) 国立感染症研究所：病原体検出マニュアル ウイルス性下痢症検査マニュアル (第3版)，2003.
- 3) Katayama K, Shirato-Horikoshi H, Kojima S, Kageyama T, Oka T, Hoshino F B, Fukushi S, Shinohara M, Uchida K, Suzuki Y, Gojobori T, Takeda N: Phylogenetic Analysis of the Complete Genome of 18 Norwalk-like Viruses, *Virology*, 299, 225-239, 2002.
- 4) Okada M, Yamashita Y, Oseto M, Shinozaki K: The detection of human sapovirus with universal and genogroup-specific primers, *Archives of Virology*, 151, 2503-2509, 2006.
- 5) Duizer E, Schwab K J, Neill F H, Atmar R L, Koopmans M P G, Estes M K: Laboratory efforts to cultivate noroviruses, *Journal of General Virology*, 85, 79-87, 2004.
- 6) Kobayashi S, Fujiwara N, Takeda N, Minagawa H: Seroepidemiological study of norovirus infection in Aichi Prefecture, Japan. *Microbiology and Immunology*, 53, 356-359, 2009.
- 7) 小林慎一，藤原範子，安井善宏，伊藤雅，山下照夫，藤浦明，皆川洋子：2005～2009年の5年間におけるA群ロタウイルス検出状況 - 愛知県，病原微生物検出情報，32，72-73，2011.
- 8) 国立感染症研究所感染症情報センター：最新のウイルス検出状況・集計表・地研からの報告・月別・胃腸炎ウイルス(2012年2月28日作成) <http://idsc.nih.go.jp/iasr/virus/virus-j.html>
- 9) 国立感染症研究所感染症情報センター：過去のウイルス検出状況・集計表・地研からの報告・月別・胃腸炎ウイルス(2011年6月23日更新) <http://idsc.nih.go.jp/iasr/virus/pvirus-j.html>
- 10) 大石 功，左近直美：胃腸炎ウイルス 4. アストロウイルス，ウイルス，50(2)，197-207，2000.
- 11) 長野県環境保全研究所：アストロウイルス血清型8型の検出 - 長野県，病原微生物検出情報，30(1)，14-15，2009.
- 12) 小林慎一，藤原範子，水谷絵美，安達啓一，伊藤 雅，安井善宏，山下照夫，平松礼司，下岸 協，皆川洋子，大鷲誠司，林 克巳，野田耕平，丹羽哲久，子安春樹：給食弁当を原因としたサポウイルスによる大規模食中毒事例 - 愛知県，病原微生物検出情報，31(11)，322-323，2010.
- 13) 片山和彦：胃腸炎関連カリシウイルス (ノロウイルス、サポウイルス) 総論，病原微生物検出情報，24，312-314，2003.
- 14) 宇宿秀三，熊崎真琴，野口有三，八木雅代，改田千恵，木上喜博：修学旅行時に発生したサポウイルスによる集団食中毒事例 - 横浜市，28，294-295，2007.
- 15) 大塚有加，近藤玲子，市川高子，山下育孝，大瀬戸光明，関谷安正，上田哲郎，芝 信明，岡 智一郎，片山和彦，武田直和：結婚式場におけるサポウイルスを原因とする食中毒事例 - 愛媛県，病原微生物検出情報，29，198-200，2008.
- 16) 飯高順子，松島勇紀，加納敦子，石丸陽子，清水英明：中華料理店で認められたサポウイルスによる食中毒事例 - 川崎市，31，323-324，2010.
- 17) Svraka S, Vennema H, Veer B, Hedlund K O, Thorhagen M, Siebenga J, Duizer E, Koopmans M: Epidemiology and Genotype Analysis of Emerging Sapovirus-Associated Infections across Europe, *Journal of Clinical Microbiology*, 48(6), 2191-2198, 2010.
- 18) Kitajima M, Oka T, Haramoto E, Katayama H, Takeda N, Katayama K, Ohgaki S: Detection and Genetic Analysis of Human Sapoviruses in River Water in Japan, *Applied and Environmental Microbiology*, 76(8)，

- 2461-2467, 2010.
- 19) Kitajima M, Haramoto E, Phanuwat C, Katayama H: Genotype Distribution of Human Sapovirus in Wastewater in Japan, *Applied and Environmental Microbiology*, 77(12), 4226-4229, 2011.
- 20) Ueki Y, Shoji M, Okimura Y, Miyota Y, Masago Y, Oka T, Katayama K, Takeda N, Noda M, Miura T, Sano D, Omura T: Detection of Sapovirus in oysters, *Microbiology and Immunology*, 54(8), 483-486, 2010.
- 21) Motomura K, Oka T, Yokoyama M, Nakamura H, Mori H, Ode H, Hansman G S, Katayama K, Kanda T, Tanaka T, Takeda N, Sato H: Identification of monomorphic and divergent haplotypes in the 2006-2007 norovirus GII/4 epidemic population by genomewide tracing of evolutionary history, *Journal of Virology*, 82(22), 11247-11262, 2008.
- 22) Motomura K, Yokoyama M, Ode H, Nakamura H, Mori H, Kanda T, Oka T, Katayama K, Noda M, Tanaka T, Takeda N, Sato H: Divergent evolution of norovirus GII/4 by genome recombination from May 2006 to February 2009 in Japan, *Journal of Virology*, 84(16), 8085-8097, 2010.

# Prevalence and genetic analysis of gastroenteritic viruses between April 2010 and March 2011 in Aichi prefecture

Noriko Fujiwara, Emi Hirose, Hirokazu Adachi, Miyabi Ito, Yoshihiro Yasui,  
Shinichi Kobayashi, Teruo Yamashita, Reiji Hiramatsu, Hiroko Minagawa

From April 2010 to March 2011, 324 samples, i.e., stools and vomits from gastroenteritic patients were collected at pediatric sentinel clinics in Aichi prefecture, and were tested for gastroenteritic viruses. Of the tested samples, 189 (58.3 %, 189/324) showed positive results. Norovirus (NoV) was detected in 124 samples (65.6 %, 124/189), group A rotavirus (ARV) in 47 (24.9 %), astrovirus (AstV) in 29 (15.3 %), sapovirus (SaV) in 2 samples (1.1 %). More than one virus type were identified in 5 samples. Among 124 NoV strains identified, 122 (98.4 %) belonged to genogroup II (GII) and 3 (2.4 %) were genogroup I (GI). One sample was positive for both GI and GII. The nucleotide sequence analyses revealed that all three NoV GI strains were classified into GI.4. Of 122 NoV GII strains, 76 (62.2 %) were genotyped as GII.3, 27 (22.1 %) as GII.4, 11 (9.2 %) as GII.2, 5 (4.1 %) as GII.13, 1 (0.8 %) as GII.1, 1 (0.8 %) as GII.6 and 1 (0.8 %) as GII.12. In 2010/11 season, NoV GII.3 was the most commonly detected genotype, followed by GII.4, contrasting with the preceding four seasons in which GII.4 predominated. Genotypes of 47 ARV-positive samples were determined by type-specific PCR. G1 was predominant (57.4 %, 27/47), followed by G3 (40.4 %, 19/47) and G2 (2.1 %, 1/47). AstV genotyping was carried out by PCR with serotype specific primers. In 20 AstV-positive samples, 15 (75.0 %) were identified as AstV-1, 1 (5.0 %) was AstV-3 and 4 (20.0 %) were AstV-8. By nucleotide sequence analysis of the partial capsid gene of SaV, one was genotyped as GI.1 and the other as GI.2. Phylogenetic study of sequences of NoV GII.4-positive 27 strains indicated that 19 strains grouped with 2006b type, one strain grouped with 2004 type and 7 strains grouped with 2009a type. New NoV GII.4 variant was not detected. Information obtained from molecular epidemiological surveillance described above is useful for designing prevention strategies of gastroenteritic viruses in Aichi prefecture.

**Key words:** infectious gastroenteritis, virus genotyping, molecular epidemiology, surveillance



---

---

調 査 研 究

---

---

## 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（第2報）

井上知美、上野英二、大野春香、渡邊美奈恵、猪飼誉友、林留美子

### 要 旨

ブロスNPD方式ガスクロマトグラフィー(GC・ブロスNPD)による食品中の多成分残留農薬分析法について、試料にハウレンソウを用いて再検討した。試料からアセトニトリル抽出・水層分離法、次いで酢酸エチル再溶解・脱水法により粗抽出液を得たのち、ゲル浸透クロマトグラフィー(GPC)/グラファイトカーボンカラムクロマトグラフィー、次いでシリカゲル/PSAカートリッジカラムクロマトグラフィーにより精製し、GC・ブロスNPDで測定した。今回、対象農薬の見直しを行い、新たに15種類を加えた48種類の含窒素農薬につ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は、それぞれ0.01~0.03%(平均0.01%)、0.7~3.4%(平均1.2%)、検量線の直線範囲は3オーダー以上( $r^2$  0.995)、検出限界は1~5 ng/gであった。また、ハウレンソウからの48農薬の添加回収率は、クロロタロニル、キノメチオネートおよびアクリナトリンを除いて75.2~105.6%(相対標準偏差<8.4%)と良好であった。

キーワード：残留農薬、食品、デュアルカラム、ガスクロマトグラフィー、ブロスNPD

### 序 文

食品に残留する農薬等のポジティブリスト制度(平成18年5月29日施行)の導入に伴い、従来の高感度窒素リン検出器(nitrogen phosphorus detector、NPD)を始めとして、含まれる元素に特異的な感度を有する選択型検出器を装備したガスクロマトグラフ(gas chromatograph、GC)に加えて、比較的気化しやすい広範の農薬成分の一斉分析を可能とする質量分析計(mass spectrometer、MS)を装備したGC-MSの普及が公設試験研究機関においても進んでいる<sup>1,2)</sup>。しかし、GC-MSは夾雑物の影響により農薬成分のイオン化効率が変動する場合が

あるなど定量性の点で問題も指摘されている<sup>3)</sup>。このため著者らは、GC-MSに比べ選択性では劣るが、比較的安価かつ装置のメンテナンスやデータ解析の容易さにおいて優る選択型検出器付きGCの利用価値は、試料調製法およびGCシステムの構成次第では今後も高いと考え、シングルインジェクション、デュアルカラムおよびブロスNPD方式ガスクロマトグラフィー(以下、GC・ブロスNPD)による多成分分析法について検討を続けている<sup>4)</sup>。

今回、GC・ブロスNPDシステムの更新による測定条件等の変更を契機に、農作物への適用農薬および違反事例の情報など<sup>5,6)</sup>を

参考にして対象農薬の見直しを行い、日常の食品中残留分析への適用性について再検討したので報告する。

## 実験方法

### 1. 試料

試料(生鮮ホウレンソウ、約 1 kg)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、原則としてトルエンに溶解して 1 mg/mL 標準原液とした。標準原液を Table 1 に示したように、含窒素農薬 N1 および N2 の 2 グループに分けてアセトンで希釈し、添加回収試験用の混合標準溶液とした。また、アセトン-ヘキサン(1:1)で適宜希釈して検量線作成用の溶媒混合標準溶液とした。さらに、ホウレンソウのブランク試験溶液 200  $\mu$ L をわずかな窒素気流下で乾固させたのち、溶媒混合標準溶液 200  $\mu$ L に溶解して検量線作成用のマトリックス混合標準溶液とした。

グラファイトカーボンカラムは、Varian 社製リザーバー(6 mL)に、グラファイトカーボン(Supelco社製 Supelclean ENVI-Carb) - 微結晶セルロース(Merck 社製 Avicel)(1:2)0.5 g、次いで無水硫酸ナトリウム 0.5 g を充てんしたものをゲル浸透クロマトグラフ(gel permeation chromatograph, GPC)システムのコレクションチューブに装着して用いた<sup>1)</sup>。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。

### 3. 装置および条件

GPC システム:(株)島津製作所製 GPC クリーンアップシステムを用いた。GPC 条件は、既報<sup>1)</sup>に準じて設定した。

GC・プロス NPD システム: Agilent Technologies 社製 7890A GC システム(7693

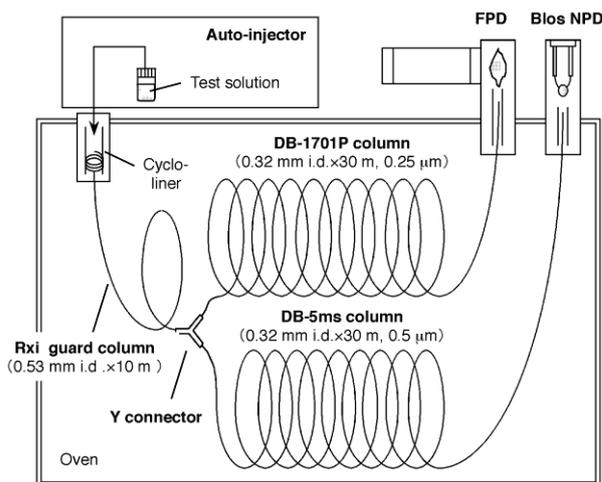


Fig. 1. Single-injection, dual-column GC-bios NPD

オートサンプラー、GC ケミステーション Rev. B.04 付)に、Restek 社製の不活性処理済みサイクロ型ライナー、Rxi ガードカラム(内径 0.53 mm、長さ 10 m)および Y コネクター、デュアルカラム Agilent Technologies 社製 DB-5ms(内径 0.32 m、長さ 30 m、膜厚 0.5  $\mu$ m) - プロス NPD、デュアルカラム Agilent Technologies 社製 DB-1701P (内径 0.32 mm、長さ 30 m、膜厚 0.25  $\mu$ m) - FPD (P モード)を装着して用いた (Fig. 1)。測定条件は、注入口温度 250、カラム温度 60 (1 min) 12 /min 180 5 /min 280 (23 min)、キャリアガス He 線速度 40 cm/sec (41 min) (40 cm/sec)/min 80 cm/sec (12 min)、プロス NPD (温度 280、 $H_2$  流量 2 mL/min、Air 流量 120 mL/min、メイクアップ  $N_2$  + キャリヤガス He 流量 15 mL/min、Offset 調整 20 pA)、FPD (温度 250、 $H_2$  流量 75 mL/min、Air 流量 100 mL/min、メイクアップ  $N_2$  + キャリヤガス He 流量 60 mL/min)、注入量 2  $\mu$ L、注入モード パルスドスプリットレス (130 kPa、1 min) に設定した。

### 4. 分析操作

#### (1) 試験溶液の調製

細切試料 50 g から既報<sup>1)</sup>に準じてアセトニトリル抽出・水層分離法、次いで酢酸エチル再溶解・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 3,100 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カラムクロマトグラフィーにより精製し、

Table 1. Recoveries of 48 nitrogen-containing pesticides from fortified spinach

Pesticide	Recovery <sup>a)</sup> , %					
	Spiking level, µg/g	Group	Solvent standard		Matrix standard	
			Mean	RSD, %	Mean	RSD, %
Fenobucarb	0.05	N1	83.6	4.1	73.9	4.1
Desmedipham *	0.1	N1	105.6	4.2	93.5	4.2
Chlorothalonil	0.05	N2	32.5	14.3	27.8	14.2
Simeconazole *	0.1	N2	85.8	4.4	83.1	4.4
Carbaryl	0.05	N1	92.2	3.9	77.5	3.9
Metalaxyl	0.05	N2	84.6	4.5	84.6	4.5
Bromacil *	0.1	N1	87.8	2.5	82.8	2.5
Linuron *	0.05	N2	87.2	5.7	89.2	5.7
Quinoclamine *	0.1	N2	79.8	7.2	71.1	7.2
Diethofencarb	0.1	N1	83.5	3.2	79.3	3.2
Thiobencarb *	0.1	N2	87.9	4.8	85.2	4.8
Tetraconazole	0.05	N2	82.4	3.9	79.5	3.9
Triadimefon	0.025	N1	83.0	3.8	81.4	3.8
Fipronil *	0.1	N1	76.5	4.4	75.1	4.4
Thiabendazole	0.05	N2	85.7	7.5	82.4	7.5
Procymidone *	0.1	N1	83.2	2.2	79.7	2.2
Chinomethionat	0.05	N1	64.8	15.0	58.2	14.9
Fenothiocarb	0.05	N1	84.9	2.6	81.5	2.6
Fludioxonil *	0.05	N2	82.6	5.2	81.2	5.2
Imazalil	0.1	N1	81.2	2.8	71.3	2.6
Hexaconazole *	0.1	N2	84.4	4.7	83.0	4.7
Myclobutanil	0.025	N2	85.6	3.9	86.4	3.9
Buprofezin	0.025	N2	82.9	2.8	85.3	2.8
Kresoxim-methyl	0.1	N1	83.8	3.8	81.3	3.8
Chlorfenapyr	0.05	N1	77.0	4.6	77.5	4.6
Oxadixyl	0.05	N2	86.1	5.1	85.5	5.1
Fluacrypyrim *	0.1	N1	75.2	5.0	74.8	5.0
Acetamiprid	0.025	N1	89.6	5.3	79.8	5.3
Iprodion	0.05	N2	82.8	5.2	87.8	5.2
Fenpropathrin	0.05	N1	90.8	4.2	85.4	4.2
Fenamidone *	0.1	N2	105.3	5.9	85.6	5.8
Tebufenpyrad	0.05	N1	78.2	3.8	76.4	3.8
Cyhalothrin	0.1	N1	80.9	5.2	74.2	5.2
Fenarimol	0.1	N1	81.9	5.1	77.8	5.1
Acrinathrin	0.05	N2	52.7	6.4	45.3	6.4
Bitertanol	0.1	N2	90.9	8.4	81.6	8.4
Pyridaben	0.1	N1	78.2	5.6	76.0	5.6
Cyfluthrin	0.1	N1	85.8	5.8	76.3	5.8
Cypermethrin	0.1	N2	86.0	5.9	83.3	5.9
Flucythrinate	0.1	N1	82.5	5.7	78.0	5.7
Flumioxazin *	0.1	N2	87.4	5.8	82.1	5.8
Fenvalerate	0.1	N1	80.2	5.0	75.4	5.0
Pyraclostrobin *	0.1	N1	92.8	4.8	88.4	4.8
Fluvalinate	0.1	N2	79.8	4.9	77.3	4.9
Difenoconazole	0.1	N1	82.9	5.3	80.7	5.3
Tralomethrin	0.1	N2	93.9	3.6	91.8	3.6
Azoxystrobin	0.1	N2	85.0	5.5	86.2	5.5
Dimethomorph *	0.1	N1	83.3	5.2	82.9	5.2

\* Additional compounds.

<sup>a)</sup> Average of 5 experiments.

さらにシリカゲル/PSA カートリッジカラムクロマトグラフィーにより精製したのち、アセトン・ヘキサン(1:1)で2 mLに定容して試験溶液(試料濃度5 g/mL)とした。

## (2) 定性および定量

GC ケミステーションのデータ解析画面上で、プロス NPD により得られた混合標準溶液と試験溶液のクロマトグラムをそれぞれ並列させ、目視により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. GC・プロス NPD システムの検証

近年、従来の有機リン系農薬およびカーバメート系農薬に代わって、より低毒性で、かつ高い活性を有するフィプロニル(殺虫剤)、ピラクロストロピン(殺菌剤)およびフルミオキサジン(除草剤)などの含窒素農薬が開発され、適用が拡大されてきている<sup>5,6)</sup>。そこで今回は、NPD で検出される蓋然性が高いなど新たに15種類を加えた48種類の含窒素農薬を対象とした。

GC・プロス NPD(Fig. 1)は、前報<sup>4)</sup>で用いた Agilent Technologies 社製の 6890GC システムから 7890A GC システムへの更新に伴い、実験方法に示したように測定条件等の見直しを行った。特に、対象農薬の中には、デスメディファム、ピラクロストロピンを始めとして GC 注入部で熱分解しやすいものも少なくない。そこで、従来のウール入ライナーから、内部がらせん構造になっており気化効率が高く、サンプルが混合しやすいサイクロ型ライナーに変更した。また、ガードカラムには、耐久性に優れ、より不活性とされるものを採用し、長さは従来の 2 m から 10 m に変更した。

試験溶液 2  $\mu$ L をスプリットレスモードで注入し、Y コネクターで2種類のカラムに分岐させたときの分配率およびプロス NPD の再現性を検証するために、0.125 ~ 0.5  $\mu$ g/mL 混合標準溶液を10回連続して測定する GC・プロス NPD の性能評価試験を実施し、その結果を Table 2 に示した。保

持時間とピーク面積の相対標準偏差(変動係数)は、それぞれ 0.01 ~ 0.03 % (平均 0.01%)、0.7 ~ 3.4 % (平均 1.2%) と再現性は前システムよりも向上し、非常に良好であった。また、検量線は 10 ~ 10,000 ng/g の範囲で寄与率( $r^2$ )0.995 ~ 1.000 と3オーダー以上の広い濃度範囲で優れた直線性が確認された。検出限界は 1 ~ 5 ng/g であり、多くの農薬でポジティブリスト制度下における一律基準(0.01  $\mu$ g/g)レベルを検出可能であった。

### 2. 測定条件の検討

本法を日常の残留農薬分析に応用して検証したところ、試験溶液中の高沸点物質がカラムに残存し、次回に注入して得られたクロマトグラム上に出現することがあった。特に、多くの農薬成分を一斉に測定する条件では、これらが一部の農薬ピークと重なるばかりでなく、農薬成分の保持時間の再現性に影響を与えることも判明した。このような高沸点物質を完全に溶出させるためには、カラム温度を上げることが一般に行われる。しかし、採用している DB-1701P カラムの最高使用温度は 280 °C であり、これ以上の昇温は避けるべきと考えられた。

そこで、実験方法に示したように農薬成分がすべて溶出した保持時間 41 分以降に、キャリアガス線速度が 40 cm/秒から 80 cm/秒になるように注入口圧力を昇圧させたところ、高沸点物質は保持時間 53 分までに完全に溶出した。

### 3. 添加回収試験

細切したホウレンソウ 50 g に混合標準溶液 500  $\mu$ L を添加後、30 分間放置したものについて試験溶液を調製し、GC・プロス NPD により測定して回収率を求めた (Table 1)。その結果、食品成分の共存下で分解しやすいクロロタロニル、キノメチオネート<sup>7)</sup>および GPC での溶出が早いアクリナトリン<sup>1)</sup>を除く 45 種類の農薬成分で 75.2 ~ 105.6 % の回収率(相対標準偏差 < 8.4%) が得られ本分析法の優れた定量性が確認された。

なお、GC 注入部などの活性部位で生じるマトリックス効果による見かけ上の回収率

Table 2. Retention time, repeatability, linearity, and detection limit of compounds by GC-bios NPD

Compound	RT, min	Repeatability (n=10)		Linearity <sup>a)</sup>			Detection limit <sup>b)</sup> , ng/g
		RT, min RSD, %	Area RSD, %	Slope (×10)	Intercept (/10)	r <sup>2</sup>	
Fenobucarb	13.271	0.01	0.9	11	2	1.000	1
Desmedipham *	14.817	0.01	2.1	2	2	1.000	5
Chlorothalonil	16.051	0.01	1.4	8	1	0.999	1
Simeconazole *	17.509	0.01	1.5	12	-4	1.000	1
Carbaryl	17.696	0.02	1.9	11	-9	0.999	1
Metalaxyl	17.730	0.01	1.1	4	6	0.999	2
Bromacil *	18.313	0.01	0.9	8	-4	1.000	1
Linuron *	18.464	0.01	1.1	9	-5	1.000	2
Quinoclamine *	18.675	0.02	0.7	3	-6	1.000	3
Diethofencarb	18.793	0.01	0.9	3	1	0.999	3
Thiobencarb *	18.852	0.01	1.1	10	0	1.000	1
Tetraconazole	19.095	0.01	0.8	8	-8	1.000	1
Triadimefon	19.132	0.01	0.9	17	3	1.000	1
Fipronil *	19.930	0.01	1.2	7	8	0.999	1
Thiabendazole	20.491	0.02	2.9	20	-19	0.999	1
Procymidone *	20.526	0.01	0.9	10	2	0.999	1
Chinomethionat	21.072	0.01	1.4	12	2	0.999	1
Fenothiocarb	21.276	0.01	1.0	13	4	1.000	1
Fludioxonil *	21.796	0.01	1.1	10	0	1.000	1
Imazalil	21.826	0.02	1.9	14	-7	0.999	1
Hexaconazole *	21.844	0.01	1.2	11	5	1.000	1
Myclobutanil	22.283	0.01	0.7	17	-1	0.999	1
Buprofezin	22.413	0.01	0.8	14	0	1.000	1
Kresoxim-methyl	22.414	0.01	0.7	4	6	0.999	3
Chlorfenapyr	22.676	0.01	0.9	6	4	1.000	2
Oxadixyl	23.532	0.01	1.0	12	-3	1.000	1
Fluacrypyrim *	23.846	0.01	0.7	4	4	1.000	3
Triphenyl phosphate <sup>c)</sup>	25.556	0.01	0.7	-	-	-	-
Acetamiprid	26.255	0.03	3.4	28	-15	0.999	3
Iprodion	26.272	0.01	1.3	3	-3	0.999	3
Fenpropathrin	26.958	0.01	0.8	4	4	1.000	2
Fenamidone *	26.978	0.01	1.0	10	1	1.000	1
Tebufenpyrad	27.139	0.01	1.0	10	9	1.000	1
Cyhalothrin 1	28.144	0.01	1.2	3	2	0.999	3
Cyhalothrin 2	28.487	0.01	1.1	-	-	-	-
Fenarimol	28.820	0.01	1.0	13	2	1.000	1
Acrinathrin	28.836	0.01	1.4	3	2	1.000	3
Bitertanol 1	29.870	0.02	1.5	10	-3	0.999	1
Bitertanol 2	30.089	0.02	1.6	-	-	-	-
Pyridaben	30.324	0.01	0.7	4	2	0.999	3
Cyfluthrin 1	31.061	0.01	1.2	4	-2	1.000	3
Cyfluthrin 2	31.265	0.01	1.1	-	-	-	-
Cyfluthrin 3	31.376	0.01	1.2	-	-	-	-
Cyfluthrin 4	31.469	0.01	1.3	-	-	-	-
Cypermethrin 1	31.723	0.01	1.2	4	-2	0.999	4
Cypermethrin 2	31.960	0.01	1.1	-	-	-	-
Cypermethrin 2	32.069	0.01	1.4	-	-	-	-
Flucythrinate 1	32.099	0.01	0.8	4	1	0.999	4
Cypermethrin 4	32.168	0.01	1.1	-	-	-	-
Flucythrinate 2	32.558	0.01	0.8	-	-	-	-
Flumioxazin *	33.750	0.01	1.4	6	-1	0.999	2

Table 2. Continued

Compound	RT, min	Repeatability (n=10)		Linearity <sup>a)</sup>			Detection limit <sup>b)</sup> , ng/g
		RT, min RSD, %	Area RSD, %	Slope (×10)	Intercept (/10)	r <sup>2</sup>	
Fenvalerate 1	33.878	0.01	0.8	5	4	0.999	4
Pyraclostrobin *	34.106	0.01	1.5	2	6	1.000	5
Fluvalinate 1	34.220	0.01	0.9	6	-3	1.000	4
Fenvalerate 2	34.426	0.01	1.0	-	-	-	-
Fluvalinate 2	34.460	0.02	0.8	-	-	-	-
Difenoconazole 1	35.134	0.01	1.4	5	-6	0.996	2
Difenoconazole 2	35.326	0.01	1.5	-	-	-	-
Tralomethrin	36.154	0.01	1.3	2	1	0.995	5
Azoxystrobin	36.706	0.02	1.7	10	-11	0.998	1
Dimethomorph 1 *	37.104	0.01	1.1	7	-2	0.998	3
Dimethomorph 2 *	38.302	0.01	1.1	-	-	-	-

\* Additional compounds.

<sup>a)</sup> 10-10,000 ng/g.

<sup>b)</sup> Detection limits calculated for a signal-to-noise ratio of 3 for standard solution (S/N=3).

<sup>c)</sup> Retention index.

の上昇を抑制する手法<sup>8)</sup>として、マトリックス混合標準溶液によって検量線を作成し、回収率を求めた (Table 1)。その結果、GC 注入部で熱分解しやすいデスメディファム、試料由来の妨害ピークと重なったフェンアミドンで回収率に改善がみられたが、多くの農薬で溶媒混合標準溶液によって得られた回収率と大きな差はなかった。このことから本 GC・プロス NPD システムでは、内径 0.32 mm のデュアルカラム方式と相まって、キャリアガスの初期流量が 10 mL/min (GC-MS の 5~10 倍) と多く、気化した試験溶液が瞬時にカラムに導入されることから、高度に不活性化処理されたサイクロ型ライナーなどの採用と、それらを汚さない試料調製法との相乗効果<sup>1)</sup>もあって、マトリックス効果が大幅に抑制されるものと考えられた。

#### まとめ

GC・プロス NPD システムの更新に伴い、対象農薬および測定条件等の見直しを行った。その結果、シングルインジェクション、デュアルカラムおよびプロス NPD 方式 GC は、夾雑物を効率よく除去する試料調製法及び測定条件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。

#### 文献

- 1) Ueno E, Oshima H, Saito I, Matsumoto H, Yoshimura Y, Nakazawa 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(4), 1003-1015, 2004.
- 2) 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(その 1) 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.
- 3) 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(5), J-309 - J-313, 2008.
- 4) 上野英二, 大野春香, 棚橋高志, 大島晴美, 三上栄一: プロス 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.
- 5) 社団法人日本植物防疫協会編: 農薬適用

一覧表 2010 年版, 2010 .

- 6)厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知  
“平成 22 年度輸入食品監視指導計画に  
基づく監視指導結果及び平成 22 年度輸  
入食品監視統計の公表について”,平成  
23 年 9 月 9 日付け食安発第 0909 第 5 号,  
2011 .
- 7)中央法規出版(農薬残留分析法研究班

編):最新農薬の残留分析法,164-165,  
189-191,2006 .

- 8)Brunete C S, Albero B, Martin G, Tadeo  
J L: Determination of pesticide residues  
by GC-MS using analyte protectants to  
counteract the matrix effect, Analytical  
Sciences, 21(11), 1291-1296, 2005.

# Multi-residue analysis of pesticides in foods by gas chromatography with blos NPD (Part )

Tomomi Inoue, Eiji Ueno, Haruka Ohno, Minae Watanabe, Yoshitomo Ikai,  
Rumiko Hayashi

We reinvestigated a multi-residue method of pesticides in foods by gas chromatography with blos nitrogen-phosphorus detection (GC-blos NPD). 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/graphitized carbon column solid-phase extraction (SPE) and silica gel/PSA cartridge column SPE. The test solution was determined by GC-blos NPD. In all cases, the repeatability studies (n=10) of retention time and peak area yielded RSD values lower than 0.03% (average of 0.01%) and lower than 3.4% (average of 1.2%), respectively, and calibration curves (10-10,000 ng/g) were linear with correlation coefficients higher than 0.995. Sensitivity of the method was obtained with limits of detection ranging from 1 to 5 ng/g. Average recoveries of pesticides, except for chlorothalonil, chinomethinat and acrinathrin, from fortified spinach sample ranged from 75.2 to 105.6% with RSD values of <8.4%.

Key words: pesticide residue, food, dual-column, GC, blos NPD

---

---

調 査 研 究

---

---

## 愛知県感染症発生動向調査における定点把握疾病の動向 - (2) 長期動向の視覚化及び 2011 年にみられた流行

広瀬かおる、續木雅子、山下照夫、櫻井博貴、大西賢治郎、皆川洋子

### 要 旨

2012 年 2 月現在「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律」に基づく感染症発生動向調査には全数報告が 75 疾病、定点把握は週報告 18 疾病及び月報告 8 疾病が指定されている。愛知県分の情報は、国への報告後速やかに「愛知県感染症情報」として還元しているが、愛知県衛生研究所企画情報部では報告数動向把握がより容易となるよう情報処理及び還元手法の改良に取り組んでいる。本報では 2000 年から 2011 年まで定点あたり報告数の長期動向をグラフ化するとともに、2011 年における定点把握疾病の流行状況を過去 5 年間の同時期の週別比較を行い検討した。とくに患者報告数が多かった伝染性紅斑ならびに手足口病の動向について生物学部による病原体検索の所見を交えて考察した。

キーワード：感染症発生動向調査、視覚化、定点把握、伝染性紅斑、手足口病

### 序文

平成 11(1999)年 4 月施行の「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律」において、感染症患者発生状況の正確な把握、分析、情報提供、及び公開から成る感染症発生動向調査は感染症対策の基本とされ、愛知県衛生研究所企画情報部に指定都市(名古屋市)及び中核市(豊橋市、岡崎市、豊田市)を含む愛知県の基幹地方感染症情報センターが設置された。愛知県では愛知県感染症発生動向調査事業実施要綱に基づき、小児科定点 182 か所、インフルエンザ定点 195 か所、眼科定点 35 か所、基幹定点 14 か所、STD(性感染症)定点 54 か所(2012 年 2 月現在)から報告されたデータを国へ報告すると同時に「愛知県感染症情報」(週報)を発行(<http://www.pref.aichi.jp/eiseiken/2f/kansen.html>)し、各疾病の最新の患者報告数情報を過去数年間のデータとともに一部グラフ化して還元している。

2010 年には、過去 5 年間の同時期の定点あたり報告数の平均を算出し、2009 年の定点把握疾病の流行状況と比較検討した<sup>1)</sup>。本稿では 2000 年以降の患者報告数推移をグラフ化するとともに、2011 年の流行状況について同様の検討を行った。

### 資料および方法

1 愛知県感染症発生動向調査事業実施要綱に基づき指定届出機関(小児科定点 182 か所、インフルエンザ定点 195 か所、眼科定点 35 か所、基幹定点 14 か所)から報告された定点把握対象の五類感染症のうち 14 疾病(表 1)のデータを用いた。

### 2 定点把握疾病の長期動向

各疾病別に 2000 年(RS ウイルス感染症は 2004 年)から 2011 年の週別定点あたり報告数を視覚化した(図 1)。

表 1 対象疾病

---

インフルエンザ定点対象疾病
インフルエンザ
小児科定点対象疾病
RS ウイルス感染症
咽頭結膜熱
A 群溶血性レンサ球菌咽頭炎
感染性胃腸炎
水痘
手足口病
伝染性紅斑
突発性発しん
百日咳
ヘルパンギーナ
流行性耳下腺炎
眼科定点対象疾病
急性出血性結膜炎
流行性角結膜炎

---

### 3 過去 5 年間の発生状況の比較

米国疾病予防対策センター(CDC)の手法を国立感染症研究所感染症情報センターが改変した方法<sup>2)3)4)</sup>を用いて既報<sup>1)</sup>と同様にグラフ化した。過去データの祝日等に伴うばらつきを補正した上で 2011 年のデータと比較するために、当該週の過去 5 年間の平均値(2006-2010 年の前週、当該週、後週の合計 15 週の平均)と標準偏差(SD)を算出してグラフ中に $\pm 1SD$  及び $\pm 2SD$  幅を示し、2011 年における週別患者報告数(棒グラフ)と比較した(図 2)。患者報告数は正規分布に従うと仮定し、2SD(95% 範囲)を超えた場合に当該週について例年より有意に多いと判断した。

#### 結果および考察

##### 1 定点把握疾病の長期動向(図 1)

インフルエンザのピークは 2009 年(新型インフルエンザ)を除いて 1-2 月にみられた。RS ウイルス感染症は 2005 年以降インフルエンザに先行してピークを形成している。咽頭結膜熱は 2006 年の大流行以後大きな流行はない。感染性胃腸炎は 2009 年を除く毎年 12 月にピークがみられ、2007 年に最高値を記録している。百日咳は 2008 年に多数報告された。

##### 2 過去 5 年間の発生状況の比較(2011 年)

2011 年に 2SD を超える高値を 10 週以上記録した疾患は伝染性紅斑、手足口病、RS ウイルス感染症であった(図 2)。伝染性紅斑は 6 月に過去最高値を記録した。手足口病は例年よりピークが右寄りであり、2012 年に入っても報告の多い状況が続いている。病原体検索結果からは夏と秋に異なるウイルスが検出<sup>6)</sup>されており、2 度罹患の報告も目立った。手足口病と同じエンテロウイルス感染症のヘルパンギーナは例年よりやや少ないが、手足口病との鑑別に迷うとの声が聞かれた。

今後も感染症発生動向調査データを活用した調査研究を推進するとともに、近い将来の感染症関連施策形成に役立つ解析に努めたい。

#### 文 献

- 1) 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.
- 2) 国立感染症研究所感染症情報センター: 読者のコーナー, IDWR2000 年第 2 週(1 月 10 日~16 日).
- 3) 長谷川伸作: 感染症発生動向調査情報の迅速還元と流行予測. 情報処理学会論文誌 データベース, 40, 132-140, 1999.
- 4) Stroup D F, Wharton M, Kafadar K, Dean A G: Evaluation of a method for detecting aberrations in public health surveillance data. American Journal of Epidemiology, 137, 373-380, 1993.
- 5) 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.
- 6) 愛知県衛生研究所: 疾患別ウイルス検出情報(速報), <http://www.pref.aichi.jp/eiseiken/67f/prompt.html>

図1 定点把握疾病(14疾病)の定点当たり報告数の経年変化(愛知県、2000年～2011年)[その1]

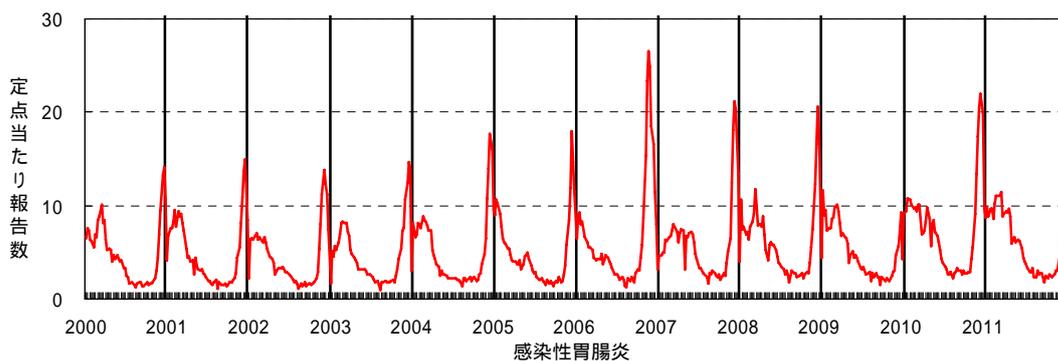
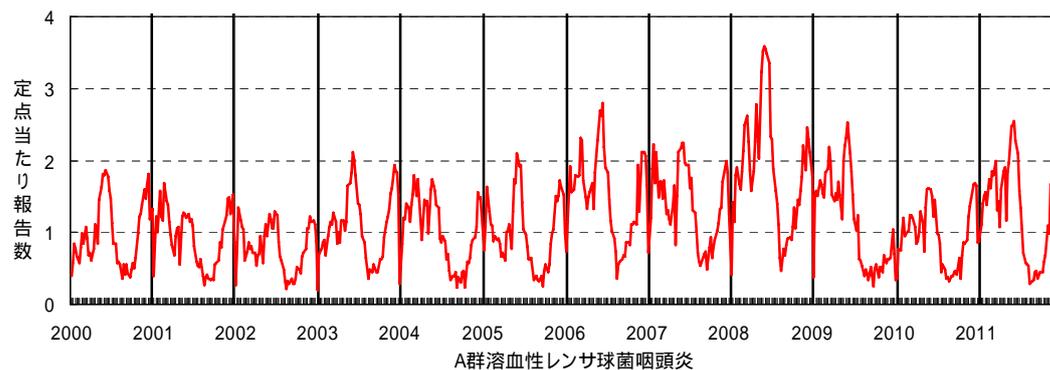
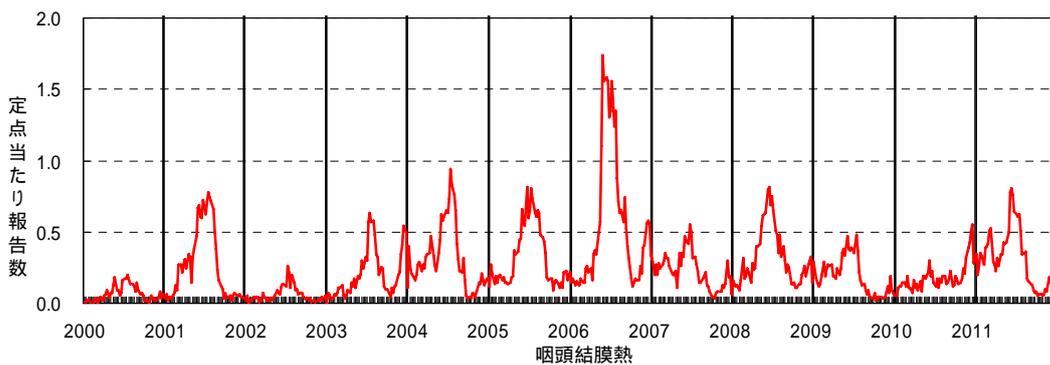
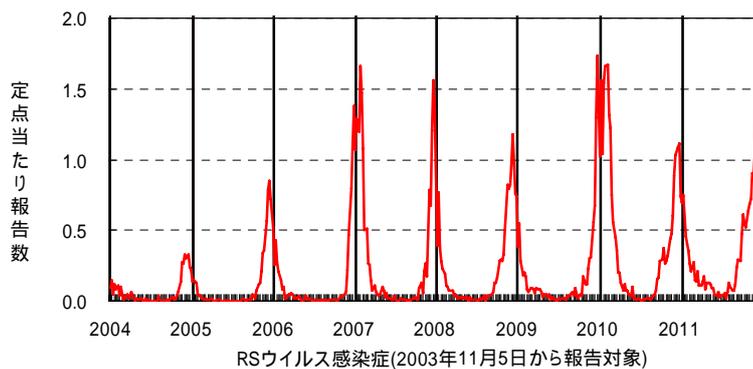
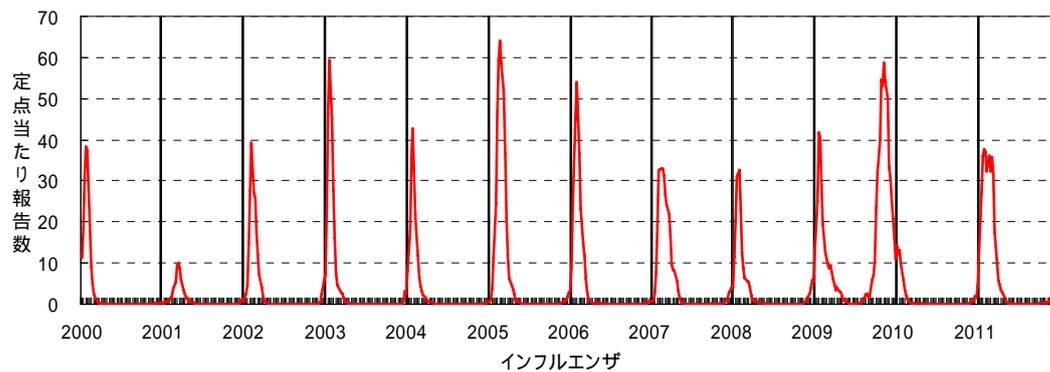


図1 定点把握疾病(14疾病)の定点当たり報告数の経年変化(愛知県、2000年～2011年)[その2]

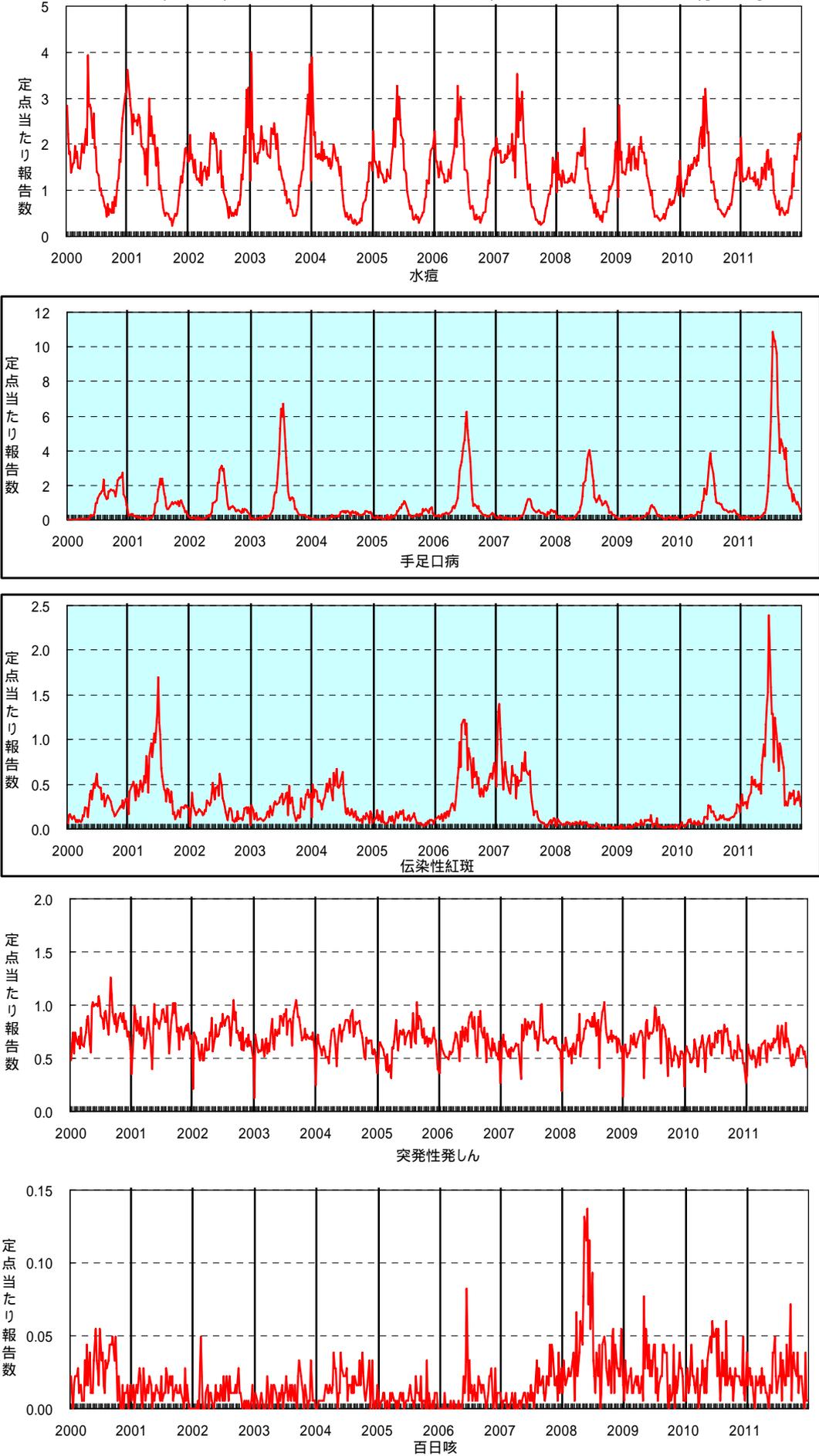


図1 定点把握疾病(14疾病)の定点当たり報告数の経年変化(愛知県、2000年～2011年)[その3]

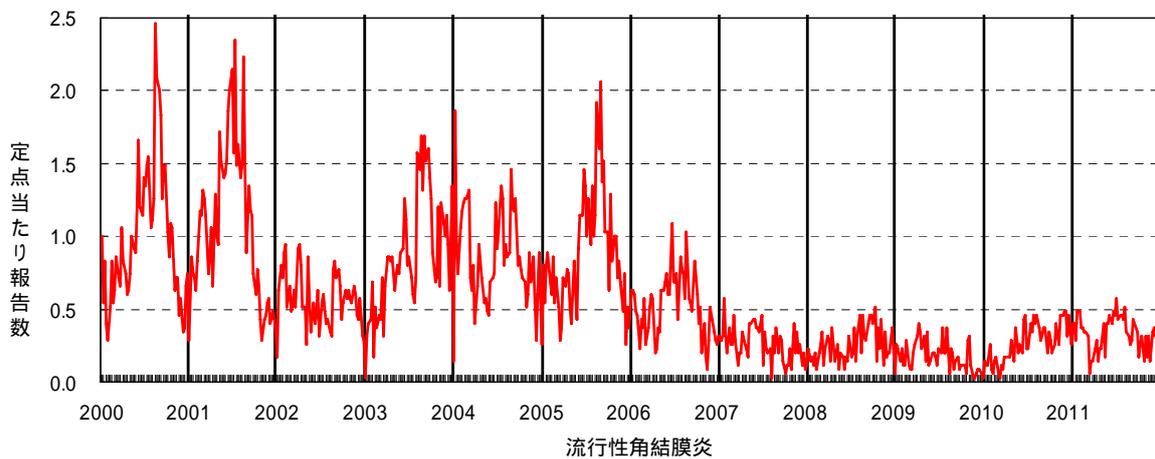
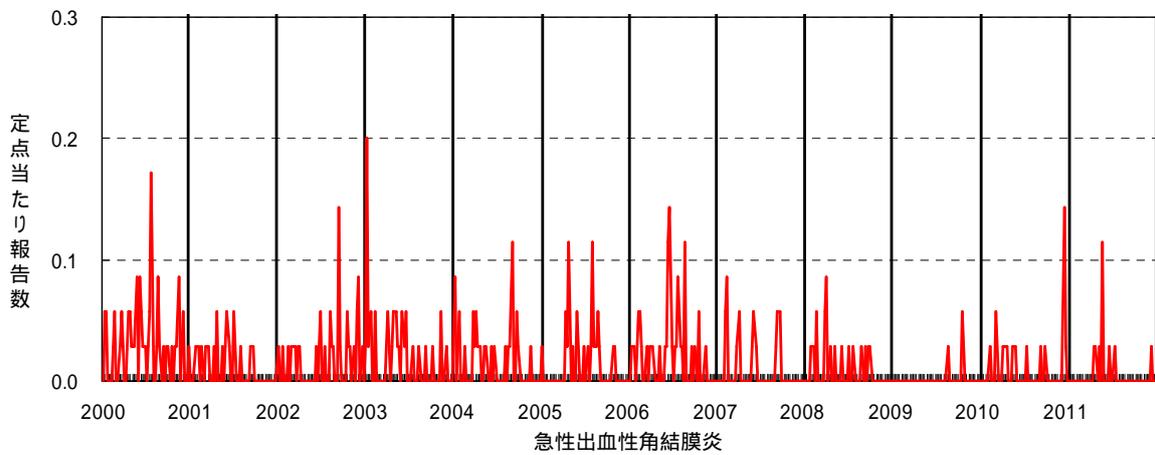
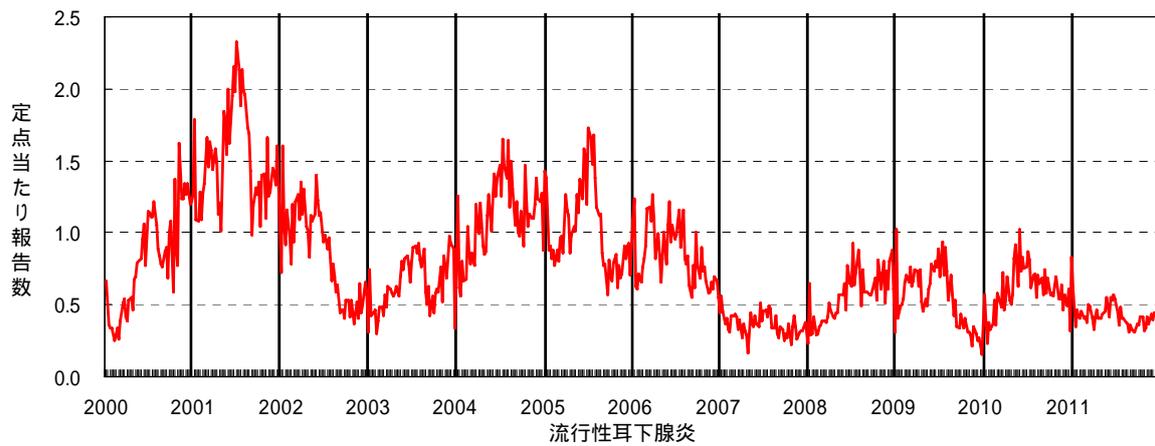
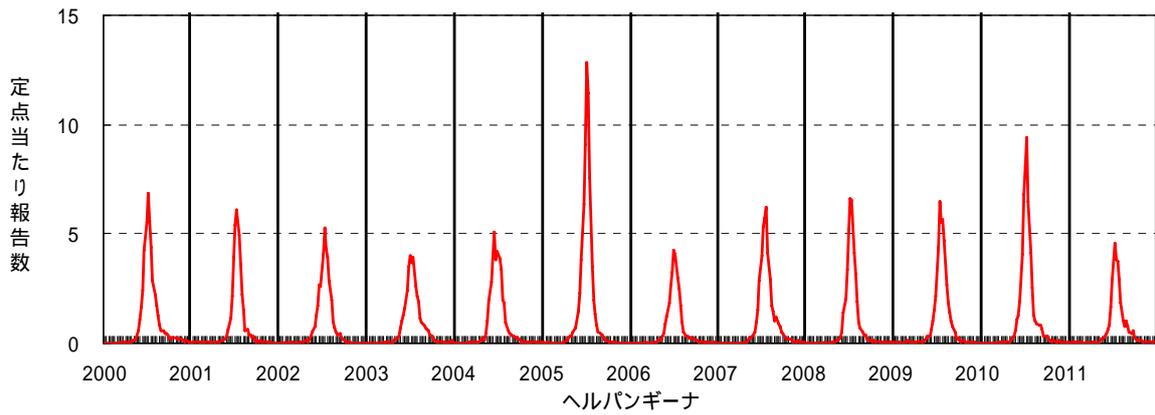


図2 定点把握疾病(14疾病)の2011年における定点当たり報告数と過去5年間(2006～2010年)の同時期との比較 (愛知県、診断週別) [その1]

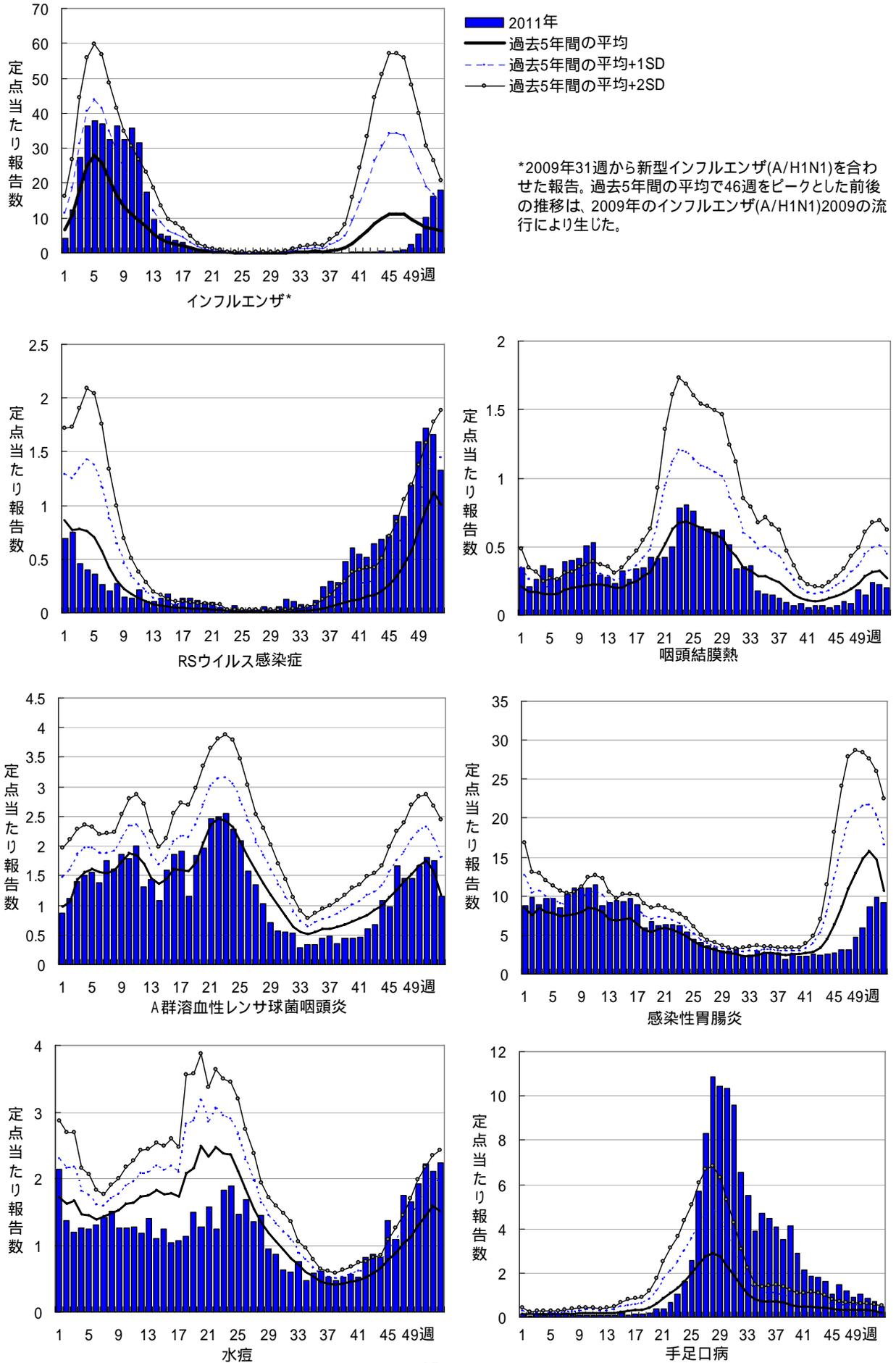
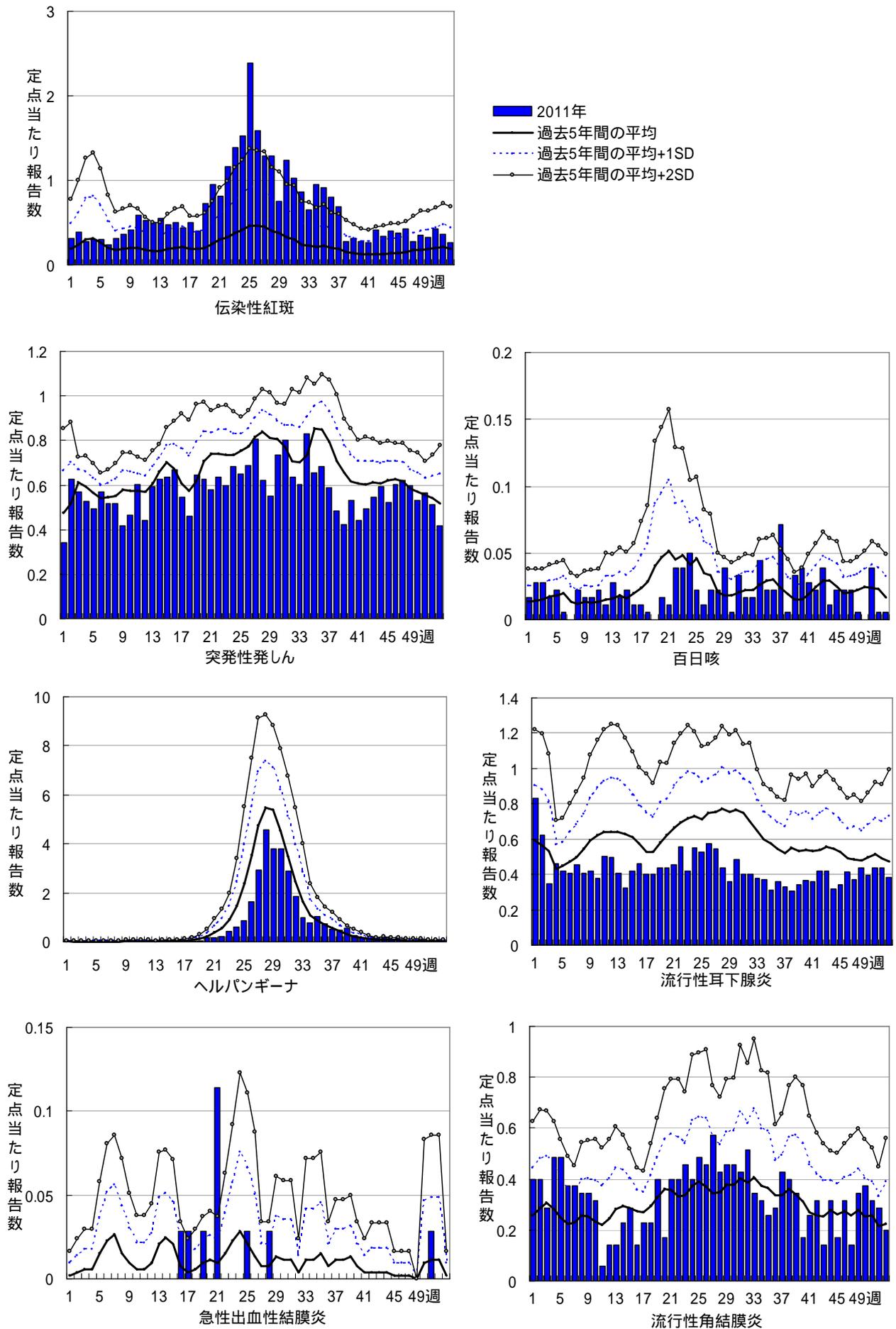


図2 定点把握疾病(14疾病)の2011年における定点当たり報告数と過去5年間(2006～2010年)の同時期との比較 (愛知県、診断週別) [その2]



# Infectious disease surveillance in Aichi Prefecture -(2) visualization of long-term trends and 2011 epidemics observed with sentinel-based surveillance-

Kaoru Hirose, Masako Tsuzuki, Teruo Yamashita, Hiroki Sakurai,  
Kenjiro Ohnishi, Hiroko Minagawa

Enforced by the Law Concerning the Prevention of Infectious Diseases and Medical Care for Patients of Infections in April 1999, sentinel-based infectious disease surveillance is incorporated into the national epidemiological surveillance for infectious disease (NESID) in combination with national notifiable diseases surveillance, and serves as an important component for disease control. In order to strengthen the surveillance system based on analysis of the incidence and the trend of infectious diseases, effective and timely feedback of such information to the general public as well as those working in medical fields are required. In this paper, the weekly sentinel-based surveillance data for 14 infectious diseases in Aichi Prefecture in the period from 2000 to 2011 were visualized in order to comprehend the overall trend of each disease. Furthermore, we applied the method provided by National Institute of Infectious Diseases to compare reported rates with the average from the 15 weeks observed during previous 5 years including each and antero-posterior weeks for the 14 diseases in the year of 2011. Of the 14 diseases, 'RS virus infection', 'erythema infectiosum' and 'hand, foot, and mouth disease' were epidemic in 2011 and weekly numbers were significantly higher than previous 5 years for more than 10 weeks.

**Key words :** surveillance of infectious diseases, visualization, sentinel-based reporting, Erythema infectiosum, Hand, foot and mouth disease

---

 他誌掲載論文抄録
 

---

## 2012 年麻疹排除に向かって 現状と未来

皆川洋子

愛知県小児科医会会報 94: 3-11, 2011

麻疹は、1980 年代まで国内で年間推定 100 万人発生していたが、2010 年には 457 人まで減少した。日本における麻疹制御はアメリカに比べ遅く、2007 年まではワクチン未接種のまま渡航した若者が欧米で発症して麻疹の「輸出国」と非難された。2006 年に麻疹・風疹混合ワクチンの 2 回接種導入、2008 年には全数報告疾患としてサーベイランス強化が図られ、平成 20 年度から 5 年間で 1 と高 3 相当年齢に SIA (supplementary immunization activity) を実

施中である。国内麻疹ウイルス遺伝子型解析の結果 2007 年流行時には主流を占めた常在型は 2010 年 5 月を最後に検出報告がない。

日本の属する世界保健機関西太平洋地域 (WPR) における 2012 年麻疹排除という目標達成には予防接種率のさらなる向上や全数報告に基づく積極的な感染拡大防止が必要である。予防接種の徹底による「排除」が現実味を帯びてきた麻疹の現状と今後の取り組みについて、感染症発生動向調査データを中心に解説した。

## 愛知県における 2009/10 シーズンインフルエンザ発生の特徴

長谷川総一郎<sup>1</sup>、宮澤孝彦<sup>1</sup>、判治岳史、皆川洋子<sup>1</sup>春日井保健所

現代医学 59(2): 291-293, 2011

愛知県における 2009/10 シーズンのインフルエンザ流行状況の特徴を把握することを目的として、インフルエンザ定点(名古屋市除く県内 125 定点)から寄せられた、インフルエンザ報告数及びコメントを週別に集計し、過去 5 シーズンとの比較を行った。2009/10 シーズンのインフルエンザ報告数のピークは過去 5 シーズンより 10~14 週早い 46 週という異例の動向を示した。2009/10 シーズンの報告数とコメ

ントに基づく症例数は極めて類似した傾向を示した。A 型が全体の 98.7% 以上を占め、かつピークの訪れが通常シーズンの非流行期あたることから、同シーズンは新型インフルエンザが流行した可能性が示唆された。インフルエンザ発生の傾向を知り、保健医療対策の参考となるように、今後もインフルエンザ発生動向の検索を継続していきたい。

## Weight gain during adulthood and body weight at age 20 are associated with the risk of endometrial cancer in Japanese women

Satoyo Hosono<sup>1</sup>, Keitaro Matsuo<sup>1</sup>, Kaoru Hirose, Hidemi Ito<sup>1</sup>, Takeshi Suzuki<sup>2</sup>, Takakazu Kawase<sup>1</sup>, Miki Watanabe<sup>1</sup>, Toru Nakanishi<sup>3</sup>, Kazuo Tajima<sup>4</sup>, Hideo Tanaka<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Division of Epidemiology and Prevention, Aichi Cancer Center Research Institute,

<sup>2</sup>Department of Medical Oncology and Immunology, Nagoya City University Graduate School of Medical Science, <sup>3</sup> Department of Gynecologic Oncology, Aichi Cancer Center Hospital,

<sup>4</sup>Aichi Cancer Center Research Institute

Journal of Epidemiology 21(6): 466-473, 2011

Current obesity is an established risk factor for endometrial cancer; however, the roles of weight gain during adulthood and obesity in early adulthood on endometrial cancer have not been elucidated. Here, we conducted a case-control study comprising 222 histologically diagnosed incident endometrial cancer cases and 2162 age- and menstrual-status matched non-cancer controls. Subjects were classified into 3 groups according to change in body mass index (BMI, kg/m<sup>2</sup>) from age 20 years to enrollment ( $\leq 0$  [reference], 0–3, and  $>3$  kg/m<sup>2</sup>). The effects of adult BMI change and obesity in early adulthood were evaluated using an unconditional logistic regression model adjusted for potential confounders. A

high BMI at age 20 (BMI  $\geq 25$ , BMI  $<25$  as reference) was significantly positively associated with endometrial cancer risk (P = 0.005), as was a BMI increase during adulthood (0–3 BMI change, multivariate odds ratio [OR] = 1.28, 95% confidence interval [CI] = 0.88–1.87;  $>3$  BMI change, OR = 2.02, 95% CI = 1.38–2.96; P-trend  $< 0.001$ ). Parity and BMI at age 20 appeared to modify the effect of weight gain on cancer risk, albeit without statistical significance. This positive association of weight gain with risk was observed only for endometrioid adenocarcinoma. The results show that endometrial cancer is positively associated with obesity at age 20 and weight gain during adulthood among Japanese women.

### Family *Picornaviridae*

Knowles NJ, Hovi T, Hyypiä T, King AMQ, Lindberg M, Pallansch MA, Palmenberg AC, Simmonds P, Skern T, Stanway G, Teruo Yamashita, Zell R.

Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. (Ed: King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ.) Academic Press-Elsevier (London, Waltham, San Diego) pp 855-880, 2011

The family *Picornaviridae* belongs to the order *Picornavirales* and consists of 12 genera: *Enterovirus*, *Cardiovirus*, *Aphthovirus*, *Hepatovirus*, *Parechovirus*, *Erbovirus*, *Kobuvirus*, *Teschovirus*, *Sapelovirus*, *Senecavirus*, *Tremovirus* and *Avihepatovirus*. The two original human

rhinovirus species have been moved to the genus *Enterovirus*; the genus *Rhinovirus* no longer exists. The *Sapelovirus*, *Senecavirus*, *Tremovirus* and *Avihepatovirus* genera (along with a number of new picornavirus species) were formally recognised by the ICTV in August 2009.

One-step real-time reverse transcription-PCR assays for detecting and subtyping pandemic influenza A/H1N1 2009, seasonal influenza A/H1N1, and seasonal influenza A/H3N2 viruses.

Nakauchi M<sup>1</sup>, Yoshihiro Yasui, Miyoshi T<sup>2</sup>, Hiroko Minagawa, Tanaka T<sup>2</sup>, Tashiro M<sup>1</sup>, Kageyama T<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>National Institute of Infectious Diseases, <sup>2</sup>Sakai City Institute of Public Health  
Journal of Virological Methods 171(1): 156-162, 2011

A previous one-step real-time reverse transcription-PCR (rRT-PCR) assay for detecting Pandemic influenza A/H1N1 2009 (A/H1N1pdm) virus (H1pdm rRT-PCR assay) was improved since the former probe had a low melting temperature and low tolerance to viral mutation. To help with the screening, rRT-PCR assays were also developed for detecting human seasonal A/H1N1 (H1) and A/H3N2 (H3) influenza viruses and were evaluated using in vitro-transcribed control RNA, isolated viruses, and other respiratory pathogenic viruses. They were shown to have high sensitivity, good linearity ( $R(2)=0.99$ ), and high specificity. In addition, the improved H1pdm rRT-PCR assay could detect two

viral strains of A/H1N1pdm, namely, A/Aichi/472/2009 (H1N1)pdm and A/Sakai/89/2009 (H1N1)pdm, which have mutation(s) in the probe-binding region of the hemagglutinin gene, without loss of sensitivity. Using the three rRT-PCR assays developed, 90 clinical specimens collected between May and October 2009 were then tested. Of these, 26, 20, and 2 samples were identified as positive for A/H1pdm, A/H3, and A/H1, respectively, while 42 samples were negative for influenza A viruses. The present results suggest that these highly sensitive and specific H1pdm, H1, and H3 rRT-PCR assays are useful not only for diagnosing influenza viruses, but also for the surveillance of influenza viruses.

## 単純ヘルペス脳炎における HSV 再活性化の機序

皆川洋子

最新医学 66(5): 953-958, 2011

初感染後神経細胞に潜伏感染を樹立した単純ヘルペスウイルス(HSV)は、再活性化の結果単純ヘルペス脳炎を発症することがある。神経細胞におけるウイルス再活性化に対し、CD8+T細胞など宿主免疫系による細胞傷害を伴わな

い制御メカニズムの存在が想定される。脳炎の増悪要因としても注目される炎症反応とは一線を画する免疫による制御反応の解明が実現すれば、発症予防や治療成績の向上に結びつくことが期待される。

## ヒトパレコウイルス(HPeV)感染症

皆川洋子、伊藤雅、山下照夫

臨床とウイルス 39(3): 139-146, 2011

ヒトパレコウイルス Human Parechovirus には8血清型が知られており、HPeV-3及びHPeV-6は日本の分離株が標準株となっている。パレコウイルス陽性患者の臨床像は多彩で、乳幼児急性胃腸炎や呼吸器感染症のみならず、乳児突然死症候群(SIDS)や中枢神経症状の報告が集積しつつある。重症例からの検出は HPeV-3 が多いが HPeV-1 もみられる。

1999 年以降感染症発生動向調査等の目的で愛知県内から当所に搬入された糞便約 5000 検

体について検索したところ、約 2%が HPeV 陽性、HPeV-1 と HPeV-3 に混じって HPeV-4 及び HPeV-6 も少数検出した。HPeV-1 は主に感染性胃腸炎症例から、HPeV-3 は胃腸炎症例に加え呼吸器症状を呈する患者からも検出した。血清抗体価保有状況をみると、大部分のヒトが乳児期に免疫を獲得する HPeV - 1 に比べ HPeV-3 に対する抗体保有率はやや低く、HPeV-3 感染症の侵入は、HPeV-1 に比べて最近起こったと考えられる。

## アイチウイルス

山下照夫

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

アイチウイルスは、1989 年、牡蠣が原因と推定された胃腸炎の集団発生において、患者の糞便から分離されたものである。ウイルス粒子の直径は約 30nm で表面構造が認められる(図)。

エンベロープは持たない。8,280 塩基のプラス一本鎖 RNA を遺伝子に持ち、酸 (pH3) 耐性、熱 (50、30 分) 耐性である。56、30 分で不活化する。その遺伝子構造からピコルナウイ

ルス科に属する新型ウイルスで、コブウイルス属アイチウイルス種とされた。コブは日本語の瘤に由来し、アイチウイルスが同じピコルナウイルス科のエンテロウイルスと比べて粒子の表面が瘤のようにゴツゴツしていることから

名づけられた。コブウイルス属には他にウシ由来のウシコブウイルス種が存在する。最近、下痢症のブタの糞便からコブウイルス遺伝子が検出され、ブタコブウイルス種も加わる予定である。

## Monitoring and Characterization of Oseltamivir-Resistant Pandemic (H1N1) 2009 Virus, Japan, 2009-2010

Makoto Ujike<sup>1</sup>, Miho Ejima<sup>1</sup>, Akane Anraku<sup>1</sup>, Kozue Shimabukuro<sup>1</sup>, Masatsugu Obuchi<sup>1</sup>, Noriko Kishida<sup>1</sup>, Xu Hong<sup>1</sup>, Emi Takashita<sup>1</sup>, Seiichiro Fujisaki<sup>1</sup>, Kazuyo Yamashita<sup>1</sup>, Hiroshi Horikawa<sup>2</sup>, Yumiko Kato<sup>2</sup>, Akio Oguchi<sup>2</sup>, Nobuyuki Fujita<sup>2</sup>, Masato Tashiro<sup>1</sup>, Takato Odagiri<sup>1</sup>, the Influenza Virus Surveillance Group of Japan (including Yoshihiro Yasui)

<sup>1</sup>National Institute of Infectious Diseases, <sup>2</sup>National Institute of Technology and Evaluation  
Emerging Infectious Diseases 17(3): 470-479, 2011

To monitor and characterize oseltamivir-resistant (OR) pandemic (H1N1) 2009 virus with the H275Y mutation, we analyzed 4,307 clinical specimens from Japan by neuraminidase (NA) sequencing or inhibition assay; 61 OR pandemic (H1N1) 2009 viruses were detected. NA inhibition assay and M2 sequencing indicated that OR pandemic (H1N1) 2009 virus was resistant to M2 inhibitors, but sensitive to zanamivir. Full-genome sequencing showed OR and oseltamivir-sensitive (OS) viruses had high sequence similarity, indicating that domestic OR virus was derived from OS pandemic

(H1N1) 2009 virus. Hemagglutination inhibition test demonstrated that OR and OS pandemic (H1N1) 2009 viruses were antigenically similar to the A/California/7/2009 vaccine strain. Of 61 case-patients with OR viruses, 45 received oseltamivir as treatment and 10 received it as prophylaxis, which suggests that most cases emerged sporadically from OS pandemic (H1N1) 2009, due to selective pressure. No evidence of sustained spread of OR pandemic (H1N1) 2009 was found in Japan; however, 2 suspected incidents of human-to-human transmission were reported.

## Rapid discrimination of oseltamivir-resistant 275Y and -susceptible 275H substitutions in the neuraminidase gene of pandemic influenza A/H1N1 2009 virus by duplex one-step RT-PCR assay

Nakauchi M<sup>1</sup>, Ujike M<sup>1</sup>, Obuchi M<sup>1</sup>, Takashita E<sup>1</sup>, Takayama I<sup>1</sup>, Ejima M<sup>1</sup>, Oba K<sup>1</sup>, Konomi

N<sup>1</sup>, Odagiri T<sup>1</sup>, Tashiro M<sup>1</sup>, Kageyama T<sup>1</sup>, the Influenza Virus Surveillance Group of Japan (including Yoshihiro Yasui)

<sup>1</sup>National Institute of Infectious Diseases

Journal of Medical Virology 83(7):1121-1127, 2011

Pandemic influenza A/H1N1 2009 (A/H1N1pdm) virus caused significant outbreaks worldwide. Oseltamivir-resistant A/H1N1pdm viruses possessing an H275Y substitution in the neuraminidase (NA) protein were reported sporadically in several countries including Japan, but they were sensitive to zanamivir and did not spread in the community. To monitor rapidly and simply oseltamivir-resistant A/H1N1pdm viruses possessing H275Y, a duplex one-step RT-PCR assay (H275Y RT-PCR assay) was developed based on an endpoint genotyping analysis method. H275Y RT-PCR assay evaluated using several subtypes/types of influenza A and B viruses and other respiratory pathogenic viruses and shown to have high sensitivity and high specificity.

Forty-four clinical specimens were tested after RNA purification using the H275Y RT-PCR assay, resulting in one clinical specimen being found to contain a virus possessing the H275Y mutation. Seventy-three clinical isolates were then tested with the H275Y assay by using clinical isolates in the cultured supernatants without RNA purification, and the results were consistent with the NA sequencing. Since the H275Y RT-PCR assay could detect the H275Y mutation in clinical isolates without RNA purification, as well as a H275Y mutated virus in clinical specimens after RNA purification, the assay was considered a powerful tool for surveillance screening of oseltamivir-resistant A/H1N1pdm virus activity.

#### Antimicrobial ointments and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300

Masahiro Suzuki, Kazuhiro Yamada, Miki Nagao<sup>1, 2</sup>, Etsuko Aoki<sup>3</sup>, Masakado Matsumoto, Tatsuya Hirayama, Hiroaki Yamamoto, Reiji Hiramatsu, Satoshi Ichiyama<sup>1, 2</sup>, Yoshitsugu Iinuma<sup>1, 2, 4</sup>

<sup>1</sup>Kyoto University Hospital, <sup>2</sup>Kyoto University, Graduate School of Medicine, <sup>3</sup>National Hospital Organization Nagoya Medical Center, <sup>4</sup>Kanazawa Medical University

Emerging Infectious Diseases 17(10): 1917-1920, 2011

We tested 259 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates and 2 USA300 ATCC type strains for susceptibility to bacitracin and neomycin contained in over-the-counter antibacterial ointments.

Resistance to both bacitracin and neomycin was found only in USA300. The use of over-the counter antimicrobial drugs may select for the USA300 clone.

## Variation in M protein production among *Streptococcus pyogenes* strains according to *emm* genotype

Masakado Matsumoto, Masahiro Suzuki, Kaoru Hirose, Reiji Hiramatsu, Hiroko Minagawa, Masaaki Minami<sup>1</sup>, Ichiro Tatsuno<sup>1</sup>, Akira Okamoto<sup>2</sup>, Michio Ohta<sup>3</sup>, Tadao Hasegawa<sup>1</sup>

Microbiology and Immunology 55(6): 379-387, 2011

<sup>1</sup>Department of Bacteriology, Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences,

<sup>2</sup>Department of Molecular Bacteriology, Nagoya University Graduate School of Medicine,

<sup>3</sup>Department of Nursing, Sugiyama Jogakuen University

M protein is an important virulence determinant in *Streptococcus pyogenes*, but the amounts of M protein in various strains of the species remain to be elucidated. To assess the amount of M protein in strains of each *emm* genotype, dot blot analysis was performed on 141 clinically isolated strains. Among the cell membrane-associated proteins, M protein was present in greater quantities in the *emm1*, *3*, and *6* strains than in the other *emm* strains. In addition three strains, one each of the *emm1*, *3*, and *6* types, showed prolific M protein production (M protein-high producers). These three *emm* genotypes are frequently isolated in clinical practice. Sequencing of the *csrRS* gene, one of the two-component signal transduction systems implicated in

virulence, was performed on 25 strains bearing different amounts of M protein. CsrS mutations, in contrast to CsrR protein, were detected in 11 strains. The M protein-high producer strain of *emm1* type carried two amino acid substitutions, whereas the other three *emm1* strains carried only one substitution each. The M protein-high producer expressed its *emm* gene more strongly than the corresponding M protein-low producer did according to TaqMan RT-PCR. These observations suggest that the accumulation of amino acid substitutions in CsrS protein may contribute, at least in part, to the large amount of M protein production seen in several *emm* genotypes.

## Prevalence of a Streptococcal Inhibitor of a Complement-Mediated Cell Lysis-Like Gene (*sicG*) in *Streptococcus Dysgalactiae* subsp. *Equisimilis*.

Masaaki Minami<sup>1</sup>, Mariko Ichikawa<sup>1</sup>, Hideyuki Matsui<sup>1</sup>, Nanako Hata<sup>1</sup>, Naoki Wakiyama<sup>1</sup>, Masakado Matsumoto, Michio Ohta<sup>2</sup>, Tadao Hasegawa<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Bacteriology, Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences,

<sup>2</sup>Department of Nursing, Sugiyama Jogakuen University

Current Microbiology 62(3): 884-887, 2011

*Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* isolates (n = 110) were analyzed by PCR to determine whether the gene encoding SICG, a homolog of *Streptococcus pyogenes* SIC, was present. Nineteen strains (17%) had this gene of which 11 (55%) were isolated from patients with invasive disease. All 19 strains possessed group G carbohydrate. Molecular characterization of *emm* type revealed that the majority of *emm*

sequences were stG643 and stG2078. Only the N-terminal sequence of SICG was similar to that of SIC in *S. pyogenes*. Although we found no significant relationship between pathogenic severity and *sicG* possession, further investigation into the mechanism of SICG may elucidate the virulence in *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* infection.

## GC-マイクロECDによる魚介類中のPCB, 有機塩素系農薬およびクロルデン類の一斉分析

大野春香、上野英二、渡邊美奈恵、大島晴美、三上栄一  
食品衛生学雑誌 52(4): 251-257, 2011

魚介類中のPCB、有機塩素系農薬およびクロルデン類の一斉分析法を検討した。試料からアセトン-ヘキサンで抽出し、GPC およびグラフトカーボン/PSA 二層式カラムにより精製後、シリカゲルカラムにより精製・分画し、デュアルカラムGC-マイクロECDで測定した。添加回収率は、PCBで84~109% (RSD≤21.6%)、

有機塩素系農薬で74~117% (RSD≤14.6%)、クロルデン類で69~114% (RSD≤12.9%)とおおむね良好であった。本法は、1つのクロマトグラムによりPCBを総量で定量でき、GC-MSに比べてデータ解析が容易であるなど、魚介類中の有機塩素系汚染物質のモニタリングに有用と考えられる。

## LC-MSによる畜水産物中のスピノサドの分析

上野英二、大野春香、渡邊美奈恵、大島晴美、三上栄一、根本 了<sup>1</sup>、松田りえ子<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>国立医薬品食品衛生研究所  
食品衛生学雑誌 52(6): 330-335, 2011

畜水産物中のスピノサドの活性成分であるスピノシンAおよびスピノシンDを定量するための分析法を検討した。牛筋肉、うなぎ、はちみつなど11種類の試料(5~20g)に、1mol/L

リン酸水素二カリウム水溶液を加えて、アセトン-ヘキサンでホモジナイズ抽出し、多孔性ケイソウ土カラムを用いたオンカラム液々分配法、次いでSAX/PSA連結ミニカラムクロマトグ

ラフィーにより脱脂・精製したのち、フラグメンター電圧をスイッチングさせながら、生じたイオンをESI-SIM モードLC-MSで同時測定した。

回収率は0.01  $\mu\text{g/g}$  添加で76.1 ~ 93.8 % (RSD 8.7 %)、0.05  $\mu\text{g/g}$  添加で75.1 ~ 104.1% (RSD 8.6%) と良好であった。

## 実験技術講座 前文：農薬残留分析編

上野英二

日本農薬学会誌 36 (4) :553, 2011

日本農薬学会誌では、農薬科学の領域で広く応用できる実験技術あるいは実験方法についてやさしく解説した「実験技術講座」を連載している。第35巻第1号～第4号では農薬残留分析編として、“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(上野

英二)”などを掲載した。そして、第36巻第4号より農薬残留分析編として、近年、農薬の残留分析分野において急速に普及してきている質量分析法(mass spectrometry)を取り上げ、5回に分けたシリーズでそれぞれ専門の先生に解説していただく予定である。

## 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(その1) GC-MSおよびGC-MS/MSを用いた食品中の農薬残留分析(講座)

上野英二

日本農薬学会誌 36 (4) :554-558, 2011

食品に残留する農薬等のポジティブリスト制度の導入に伴い、比較的気化しやすい広範の農薬成分の一斉分析を可能とする質量分析計を装備したGC-MSが普及している。さらに、平成20年1月に発覚した中国製冷凍ギョーザに混入されたメタミドホスによる中毒事案もあって、生鮮農産物のみならず、複雑な成分で構成される加工食品中の微量農薬の一斉分析を可能とすべく、より選択的で高感度なタンデム型質量分析

計を装備したGC-MS/MSが普及してきている。しかし、対象となる農薬成分は、物理的・化学的にさまざまな性質を有する物質群であるうえに、複雑なマトリックスの中から微量の農薬成分を分離して定性・定量することは、GC-MS/MSをもってしても決して容易なことではない。そこで、主に四重極型質量分析計を装備したGC-MS(/MS)の具体的な応用例を紹介しながら、分析上のノウハウなどについて解説した。

## GC-MS/MSによるダイエット健康食品中の医薬品成分分析法の検討

山本新也<sup>1,2</sup>、墨岡成治<sup>1</sup>、藤岡正信<sup>1</sup>、三上栄一、宮本謙一<sup>2</sup>

<sup>1</sup>豊橋市保健所、<sup>2</sup>金沢大学大学院医学系研究科  
食品衛生学雑誌 52 (6) :363-369, 2011

健康食品の中には、より確実な効果を期待して医薬品成分が添加された製品もあり、摂取した消費者に健康被害を惹起させることがある。このような無承認無許可医薬品による健康被害事例に迅速かつ正確に対応するため、ダイエット健康食品中のフェンフルラミン、N-ニトロソフェンフルラミン、シブトラミン、マジンドール、フェノールフタレイン(PHP)の5種の医薬品成分についてGC-MS/MSを使用した一斉分

析法を検討した。添加量1 µg/mg (PHPについては4 µg/mg)での回収率は、EI法で85.0~110.7%、CI法においても80.3~102.2%、100 µg/mg (PHPについては200 µg/mg)添加での回収率は、EI法で94.9~102.9%、CI法で92.8~103.2%であった。また、本法を市販健康食品分析に適用したところ、すべての成分について検出することが可能であった。

## Epigenetic Assessment of Environmental Chemicals Detected in Maternal Peripheral and Cord Blood Samples

Yoshikazu Arai<sup>1</sup>, Jun Ohgane<sup>1</sup>, Shintaro Yagi<sup>1</sup>, Rie Ito<sup>2</sup>, Yusuke Iwasaki<sup>2</sup>, Koichi Saito<sup>2</sup>, Kazuhiko Akutsu<sup>3</sup>, Satoshi Takatori<sup>3</sup>, Rie Ishii<sup>4</sup>, Rumiko Hayashi, Shun-Ichiro Izumi<sup>5</sup>, Norihiro Sugino<sup>6</sup>, Fumio Kondo<sup>7</sup>, Masakazu Horie<sup>4</sup>, Hiroyuki Nakazawa<sup>2</sup>, Tsunehisa Makino<sup>8</sup>, and Kunio Shiota<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Cellular Biochemistry, Animal Resource Sciences/Veterinary Medical Sciences, The University of Tokyo, <sup>2</sup>Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hoshi University, <sup>3</sup>Division of Food Chemistry, Osaka Prefectural Institute of Public Health, <sup>4</sup>Saitama Prefectural Institute of Public Health, <sup>5</sup>Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine, Tokai University, <sup>6</sup>Department of Obstetrics and Gynecology, Yamaguchi University Graduate School of Medicine, <sup>7</sup>Department of Pharmacology, School of Medicine, Aichi Medical University, <sup>8</sup>Toubu Hospital

Journal of Reproduction and Development 57(4) :507-517, 2011

Epigenetic alteration is an emerging paradigm underlying the long-term effects of chemicals on gene functions. Various chemicals, including organophosphate insecticides and heavy metals, have been detected in the human fetal environment. Epigenetics by DNA methylation and histone modifications, through dynamic

chromatin remodeling, is a mechanism for genome stability and gene functions. To investigate whether such environmental chemicals may cause epigenetic alterations, we studied the effects of selected chemicals on morphological changes in heterochromatin and DNA methylation status in mouse ES cells (ESCs). Twenty-five

chemicals, including organophosphate insecticides, heavy metals, and their metabolites were assessed for their effect on the epigenetic status of mouse ESCs by monitoring heterochromatin stained with 4',6-diamino-2-phenylindole (DAPI). The cells were surveyed after 48 or 96 h of exposure to the chemicals at the serum concentrations of cord blood. The candidates for epigenetic mutagens were examined for the effect on DNA methylation at genic regions. Of the 25 chemicals, five chemicals (diethylphosphate (DEP), mercury (Hg), cotinine, selenium (Se), and octachlorodipropyl ether (S-421)) caused

alterations in nuclear staining, suggesting that they affected heterochromatin conditions. Hg and Se caused aberrant DNA methylation at gene loci. Furthermore, DEP at 0.1 ppb caused irreversible heterochromatin changes in ESCs, and DEP-, Hg-, and S-421-exposed cells also exhibited impaired formation of the embryoid body (EB), which is an *in vitro* model for early embryos. We established a system for assessment of epigenetic mutagens. We identified environmental chemicals that could have effects on the human fetus epigenetic status.

## Barium Promotes Anchorage-Independent Growth and Invasion of Human HaCaT Keratinocytes via Activation of c-SRC Kinase

Nguyen Dinh thang<sup>1,2</sup>, Ichiro Yajima<sup>1</sup>, Mayuko Y. Kumasaka<sup>1</sup>, Shoko Ohnuma<sup>3</sup>, Takeshi Yanagishita<sup>2</sup>, Rumiko Hayashi, Hossain U. Shekhar<sup>1</sup>, Daisuke Watanabe<sup>2</sup>, Masashi Kato<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Units of Environmental Health Sciences, Department of Biomedical Sciences, College of Life and Health Sciences, Chubu University, <sup>2</sup>Department of Dermatology, School of Medicine, Aichi Medical University, <sup>3</sup>Voluntary Body for International Health Care in Chubu University  
PLoS ONE 6(10) :e25636, 2011. DOI

Explosive increases in skin cancers have been reported in more than 36 million patients with arsenicosis caused by drinking arsenic-polluted well water. This study and previous studies showed high levels of barium as well as arsenic in the well water. However, there have been no reports showing a correlation between barium and cancer. In this study, we examined whether barium (BaCl<sub>2</sub>) may independently have cancer-related effects on human

precancerous keratinocytes (HaCaT). Barium (5- 50 μM) biologically promoted anchorage-independent growth and invasion of HaCaT cells *in vitro*. Barium (5 μM) biochemically enhanced activities of c-SRC, FAK, ERK and MT1-MMP molecules, which regulate anchorage-independent growth and/or invasion. A SRC kinase specific inhibitor, protein phosphatase 2 (PP2), blocked barium-mediated promotion of anchorage-independent growth and invasion with

decreased c-SRC kinase activity. Barium (2.5-5  $\mu$ M) also promoted anchorage-independent growth and invasion of fibroblasts (NIH3T3) and immortalized nontumorigenic melanocytes (melan-a), but not transformed cutaneous squamous cell carcinoma (HSC5 and A431) and malignant melanoma (Mel-ret)

cells, with activation of c-SRC kinase. Taken together, our biological and biochemical findings newly suggest that the levels of barium shown in drinking well water independently has the cancer-promoting effects on precancerous keratinocytes, fibroblast and melanocytes *in vitro*.



編集情報運営委員会

委員長 : 大西 賢治郎 (企画情報部)  
委員 : 井村 守邦 (総務課)  
広瀬 かおる・續木 雅子 (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)  
秦 眞美 (生物学部・医動物研究室)  
渡邊美奈恵 (衛生化学部・医薬食品研究室)  
小島美千代 (衛生化学部・生活科学研究室)

愛知県衛生研究所報

第 62 号

平成 24(2012)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 052-910-5654

ウイルス研究室 052-910-5674

細菌研究室 052-910-5669

医動物研究室 052-910-5654

衛生化学部長 052-910-5638

医薬食品研究室 052-910-5639

生活科学研究室 052-910-5643

FAX : 052-913-3641

e-mail: [eiseiken@pref.aichi.lg.jp](mailto: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)