

ISSN 0515 - 7803

# 愛知県衛生研究所報

Report of Aichi Prefectural Institute of Public Health


第 6 6 号

愛知県衛生研究所

平成 28 年 3 月

愛知衛所報

Rep. Aichi Inst. Pub. Hlth.

 愛知県



# 愛知県衛生研究所報

第 66 号 平成 28 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(第2報)-	1
中村瑞那、續木雅子、大参寛典、森 一明、広瀬かおる、皆川洋子	
下水及びイヌから検出されるコブウイルスの遺伝子解析	10
山下照夫、安達啓一、伊藤 雅、廣瀬絵美、中村範子、尾内彩乃、 安井善宏、小林慎一、皆川洋子	
愛知県におけるアデノウイルス検出状況と遺伝子型別(2009年~2015年)	20
廣瀬絵美、伊藤 雅、安達啓一、尾内彩乃、中村範子、秦 眞美 安井善宏、小林慎一、山下照夫、皆川洋子	
愛知県におけるヒト糞便からの extended-spectrum $\beta$ -lactamase 遺伝子 保有大腸菌の分離状況	28
田中佑三世、山田和弘、鈴木匡弘、松本昌門、山下照夫、皆川洋子	
愛知県における危険ドラッグ製品の分析調査	34
棚橋高志、安藤麗香、大野春香、猪飼誉友、皆川洋子	
愛知県住民の尿中金属濃度	43
山本優子、青木梨絵、小島美千代、白鳥浩美、小池恭子、猪飼誉友、 皆川洋子	
他誌掲載論文抄録	51

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

Volume 66, March 2016

Contents

Original Papers

Estimation of the future epidemiological situation of tuberculosis incidence in Japan and Aichi Prefecture - Second report – .....	1
Mizuna Nakamura, Masako Tsuzuki, Hironori Ohmi, Kazuaki Mori, Kaoru Hirose, Hiroko Minagawa	
Molecular detection and analysis of kobuviruses in sewage samples and canine feces .....	10
Teruo Yamashita, Hirokazu Adachi, Emi Hirose, Noriko Nakamura, Ayano Onouchi, Miyabi Ito, Yoshihiro Yasui, Shinichi Kobayashi, Hiroko Minagawa	
Detection and genotyping of human adenoviruses in Aichi Prefecture, 2009-2015 .....	20
Emi Hirose, Miyabi Ito, Hirokazu Adachi, Ayano Onouchi, Noriko Nakamura, Mami Hata, Yoshihiro Yasui, Shinichi Kobayashi, Teruo Yamashita, Hiroko Minagawa	
Prevalence of ESBL gene-carrying Escherichia coli in human stools in Aichi Prefecture, Japan .....	28
Yumiyo Tanaka, Kazuhiro Yamada, Masahiro Suzuki, Masakado Matsumoto, Teruo Yamashita, Hiroko Minagawa	
Dangerous Drugs analysis survey in Aichi Prefecture .....	34
Takashi Tanahashi, Reika Ando, Haruka Ohno, Yoshitomo Ikai, Hiroko Minagawa	
Study on urinary concentrations of metals in residents of Aichi Prefecture ...	43
Yuko Yamamoto, Rie Aoki, Michiyo Kojima, Hiromi Shiratori, Yasuko Koike, Yoshitomo Ikai, Hiroko Minagawa	
Summaries of papers accepted to other journals .....	51

---

---

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 (第2報) -

中村瑞那、續木雅子、大参寛典、森 一明、広瀬かおる、皆川洋子

### 要 旨

愛知県結核対策プラン策定に資する基礎資料作成を目的として、指数回帰モデルを用いた結核新登録患者数の将来予測を試み第1報として報告した。その結果、2015年の愛知県全体の罹患率(年換算暫定値 15.1)は推計罹患率(18.8)を下回ったものの、依然として中まん延状態である。本報ではより精度の高い罹患率予測を目指し、罹患率の減少速度に着目した2つのモデルを追加し予測を実施した。また、観察期間を2期間設定し、その組み合わせにより6種類の推計を行った。中位推計にあたるミックスモデルに基づく罹患率が10を下回り低まん延状態に到達するのは愛知県では2025年(罹患率 9.2)と全国の2020年より5年程遅れることが予測された。将来の結核患者は益々高齢者へと偏る一方で、20代女性の占める割合も相対的に拡大することが推測された。愛知県においても結核対策は公衆衛生上の重要な課題であり、罹患構造の変化に対応した対策を行っていく必要がある。今後も予測モデルの検討を行い対策策定及び評価に有用な情報構築を実施していく予定である。

キーワード：結核、罹患率、将来予測、高齢者結核

### 序 文

わが国の結核新登録患者数は2014年に19,615人と1961年登録開始以来初めて2万人を下回った。新登録結核患者罹患率(以下、罹患率)(人口10万対)も減少傾向が続いているが未だ15.4(対前年0.7減)と、世界保健機関(WHO)が低まん延状態とする10.0<sup>1)</sup>より高く、中まん延状態にある。感染源となりやすい喀痰塗抹陽性肺結核患者も2014年には7,651人が登録された<sup>2)</sup>。一方欧米等先進諸国の2014年罹患率は、アメリ

カ2.8、ドイツ5.1、オーストラリア5.4などとすでに低まん延状態に到達している。

名古屋市を含む愛知県(以下、愛知県全体)の2014年新登録者数(以下、罹患数)は1,305人、罹患率は17.5と依然として全国より高い<sup>3)</sup>。2015年の愛知県全体の罹患率(年換算暫定値 15.1<sup>4)</sup>)は愛知県結核対策プラン(2011年9月改正)<sup>5)</sup>に掲げられた2015年までの目標罹患率18.0を下回ったものの、75歳以上の高齢者が約半数を占める、名古屋市の2014年罹患率は23.2<sup>3)</sup>と依

表1 将来罹患率推計に用いた減少速度の算出法(モデルA及びB)及び観察期間

減少速度の算出法

モデルA (5年前の年齢階級別罹患率を同じ年齢階級別罹患率と比較)

$$(1 - \text{EXP} ( ( \text{Ln} ( \frac{X \text{年における各年齢階級別罹患率}}{(X - 5) \text{年における同じ年齢階級別罹患率}} ) ) / 5 ) ) \times 100$$

モデルB (5年前の5歳若い年齢階級(出生コホート)別罹患率と比較)

$$(1 - \text{EXP} ( ( \text{Ln} ( \frac{X \text{年における各年齢階級別罹患率}}{(X - 5) \text{年における5歳若い年齢階級別罹患率}} ) ) / 5 ) ) \times 100$$

に示す

期間1の場合、X = 1990, 1995, 2000, 2005, 2010

期間2の場合、X = 2005, 2010

観察期間

期間1; 1987年～2013年(1999年を除く)

期間2; 1998年～2013年(1999年を除く)

然として高い、などの課題は未解決である。著者らは2012年に愛知県結核対策プラン立案・評価に資する基礎資料作成を目的に指数回帰モデルによる将来予測を行い、第1報として報告した<sup>6)</sup>。その予測値と2015年実測値を比較したところ、全国、愛知県全体ともに、2015年実測値(年換算値全国14.0、愛知県15.1)は予測値(同14.9、18.8)を下回ったが、依然として中まん延状態を脱していない。本稿では、より精度の高い罹患率予測をめざし、新たに年平均減少速度を用いたモデルによる推計を試みたので報告する。

資料と方法

全国、愛知県及び名古屋市の新登録者数<sup>7)</sup>、並びに全国及び愛知県人口(外国人を含む総数)<sup>8)</sup>を用いて1987～2013年の性別・年齢階級別罹患率を算出した。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、以下の2方法にて2015年から2040年まで5年間隔の罹患率予測を行った。

1) 指数回帰式による予測(EXモデル)

性・年齢階級別罹患率に指数回帰式をあてはめ(以下EXモデルと表記)、罹患率を推

計した<sup>9)</sup>。さらにこの推計罹患率に全国及び都道府県別将来推計人口(中位推計、外国人含む)<sup>10)</sup>を乗じて性別・年齢階級別罹患数を算出した。前報では10歳階級別(20歳未満及び70歳以上はそれぞれ一括)に罹患率を算出したが、他の手法による結果と比較するため、本報では5歳階級別(20歳未満及び80歳以上はそれぞれ一括)に算出した。2)減少速度を用いたモデル(A・Bモデル)(表1)

結核研究所の全国の将来予測方法<sup>11)</sup>に準じ、罹患率減少速度の計算方法により2種類のモデル(A及びBモデル)を設定した。モデルAは、5年前の年齢階級別罹患率を同じ年齢階級別罹患率と比較し年平均減少速度を求める方法、モデルBは5年前の5歳若い年齢階級(出生コホート)別罹患率と比較し年平均減少速度を求める方法により罹患率減少速度を算出した。

1990年～2010年の5年間隔の罹患率から平均罹患率減少速度を性・年齢階級別に算出し、2015年～2040年までの5年間隔で将来予測を実施した。両モデルとも安定した年平均減少速度を求めるため5年分の実測値を指数変換した後、直線回帰式から求めた減少速度を使用した。

表2 前報の新登録者数予測値と実測値の比較

		新登録者数推計値	確定値 / 暫定値	推計罹患率 (E)	実測罹患率 (O)	E/O
		(2012年3月推計)		(2012年3月推計)		
全国	2010年	23,363	23,261	18.4	18.2	1.01
	2015年	18,717	17,756*	14.9	14.0**	1.06
愛知県	2010年	1,608	1,664	21.8	21.7	0.97
	2015年	1,390	1,123*	18.8	15.1**	1.24

\*結核研究所9月報の1-9月累積新登録者数に基づく年換算新登録者数

\*\*結核研究所9月報の1-9月累積の年換算罹患率

表3 全国の結核推計罹患率・推計罹患数

モデル		2015	2020	2025	2030	2035	2040
推計罹患率	EX-1	15.4	13.1	11.3	10.1	8.5	7.1
	EX-2	14.5	11.9	9.9	8.6	7.1	5.7
	A-1	15.0	12.2	10.1	8.4	6.9	5.6
	A-2	14.2	11.1	8.8	7.1	5.5	4.2
	B-1	11.7	7.8	5.5	4.3	3.3	2.7
	B-2	11.7	7.5	4.9	3.5	2.4	1.7
	A-2・B-1平均	13.0	9.5	7.2	5.7	4.4	3.5
	推計罹患数	EX-1	19,484	16,222	13,681	11,737	9,582
EX-2		18,342	14,725	11,987	9,974	7,905	6,088
A-1		19,001	15,189	12,171	9,824	7,699	5,958
A-2		17,985	13,808	10,592	8,273	6,168	4,552
B-1		14,843	9,655	6,687	4,971	3,753	2,867
B-2		14,767	9,325	5,919	4,064	2,731	1,859
A-2・B-1平均		16,414	11,731	8,639	6,622	4,961	3,710

### 3) 観察期間 (表1)

観察期間を2種類設定した。期間1は1987年～2013年(電算化結核サーベイランス開始後)、期間2は1998年～2013年(活動性分類変更後)の2期間を観察期間とした。いずれも「緊急事態宣言」の影響で患者数が増加した1999年罹患率データは除外した。

EXモデル及びA・Bモデルと観察期間1・2の組み合わせによる6種類(EX-1、EX-2、A-1～B-2)の予測を行った。

### 結果

#### 1 前報の新登録者数予測値と実測値との比較(表2)

前報(2012年3月の報告)では1987～2009年の罹患データに基づきEXモデルにより将来予測を実施した。その予測値と実測値との比較を2010年及び2015年(結核

研究所発行の結核登録者情報調査月報報告2015年9月概況<sup>4)</sup>)について表2に示す。全国の2015年推計罹患数18,717人に対し、2015年暫定値17,756人、罹患率は推計値14.9に対して暫定値14.0であった。

愛知県の2015年推計罹患数1,390人に対し、2015年暫定値1,123人、罹患率は推計値18.8に対して暫定値15.1であった。全国・愛知県全体ともに、指数回帰による予測では、2015年実測値は予測値を下回った。

#### 2 全国における将来予測(表3)

全国における2015年推計罹患率は11.7～15.4とすべてのモデルにおいて10.0を上回り、その後、いずれのモデルでも推計罹患率は緩やかに減少した。モデルにより減少傾向に大きな差が生じることから、中位推計にあたるものとしてモデルA・Bの4種類のモデルのうち最も穏やかな減少と最も急速な減少のモデルを除き、中央の2つの

表4 愛知県全体の結核推計罹患率・推計罹患数

モデル		2015	2020	2025	2030	2035	2040
推計罹患率	EX-1	19.2	17.5	16.2	15.0	13.0	11.1
	EX-2	18.1	15.8	14.1	12.6	10.5	8.7
	A-1	18.7	16.0	13.8	11.9	9.7	8.0
	A-2	17.6	14.4	11.8	9.7	7.7	6.0
	B-1	13.8	9.1	6.6	5.2	4.1	3.6
	B-2	14.5	9.5	6.8	5.2	3.6	3.1
	A-2・B-1平均	15.7	11.8	9.2	7.4	5.9	4.8
推計罹患数	EX-1	1,434	1,302	1,191	1,080	914	764
	EX-2	1,349	1,178	1,038	910	743	598
	A-1	1,397	1,190	1,012	856	686	547
	A-2	1,314	1,074	866	698	540	411
	B-1	1,031	679	485	375	292	245
	B-2	1,081	705	499	375	252	213
	A-2・B-1平均	1,172	877	676	537	416	328

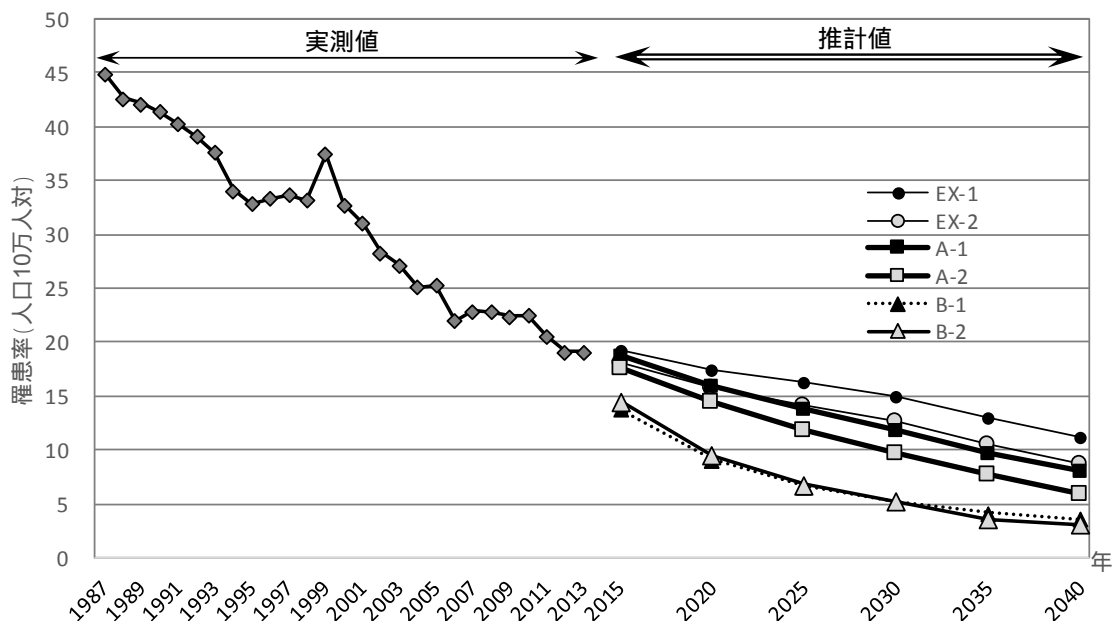


図1 愛知県全体の結核罹患率(実測値1987～2013年)及び将来推計値(2015～2040年)

モデル(A-2及びB-1)の平均をとってミックスモデル(Mixed)を設定した。2020年にはB-1において7.8、B-2で7.5、Mixedモデルで9.5、2025年にはEX-2において9.9、A-2で8.8、2030年にはA-1において8.4と、10.0を下回る低まん延状態レベルを達成すると予測された。低まん延状態達成が最も遅れると予測されたのはEX-1で、2035年に罹患率8.5であった。

2015年の推計罹患数では、最小がB-2の14,767人、最大がEX-1の19,484人と罹患率同様モデルにより大きな差が見られた。

年齢階級別罹患数は2014年(実測)では80歳以上の割合が男34.6%、女42.7%であ

った。2040年における予測ではモデルにより80歳以上の占める割合が大きく異なり、男ではEX-1とEX-2の平均(以下、EX平均)では71.9%と最も高く、次いでモデルA平均で54.7%、最も低いモデルB平均では18.3%であった。女の80歳以上の占める割合はEX平均では74.1%、モデルA平均では52.4%、モデルB平均では16.6%と男の高齢者と同じ傾向を示した。

3 愛知県全体における将来予測(表4、図1、図2-1～2、図3)

愛知県における結核罹患率の実測値及び将来推計結果を表4、図1、に示す。愛知県全体における2015年推計罹患率は13.8～



19.2 とすべてのモデルにおいて 10.0 を上回り、各モデルにおいて全国値を上回った。その後、いずれのモデルでも推計罹患率は緩やかに減少した。2020 年には B-1 において 9.1、B-2 で 9.5、2025 年には Mixed モデルで 9.2、2030 年には A-2 で 9.7、2035 年には A-1 において 9.7、2040 年には EX-2 において 8.7 と、低まん延状態レベルを達成すると予測された。しかし、EX-1 では 2040

年の時点でも罹患率 11.1 と今回の予測では低まん延状態を達成できないと予測された。

2015 年の推計罹患数は、最小が B-1 の 1,031 人、最大が EX-1 の 1,434 人とモデルにより大きな差が見られた。

2014 年の実測及び 2040 年の推計罹患数の性別年齢階級別割合を図 2-1、2-2 に示す。年齢階級別罹患数は 2014 年では 80 歳以上が男 38.7%、女 43.2%と全国と同様に 80 歳

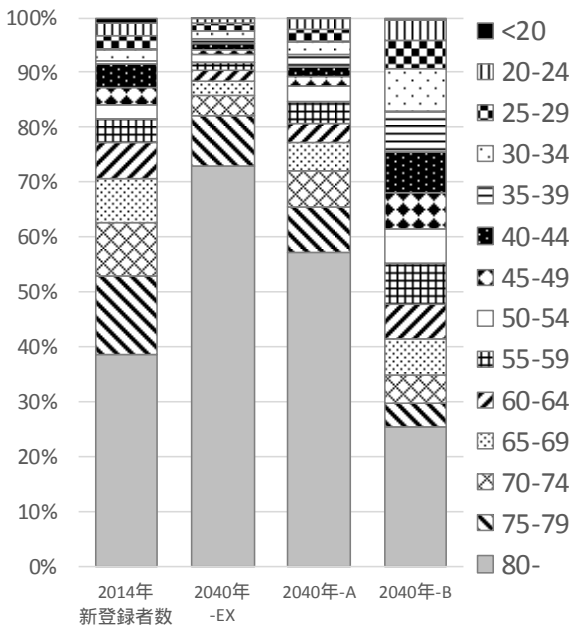


図2-1 2014年新登録者数実測値と2040年予測値 (EX, A, B各平均)の年齢階級別割合 (愛知県・男)

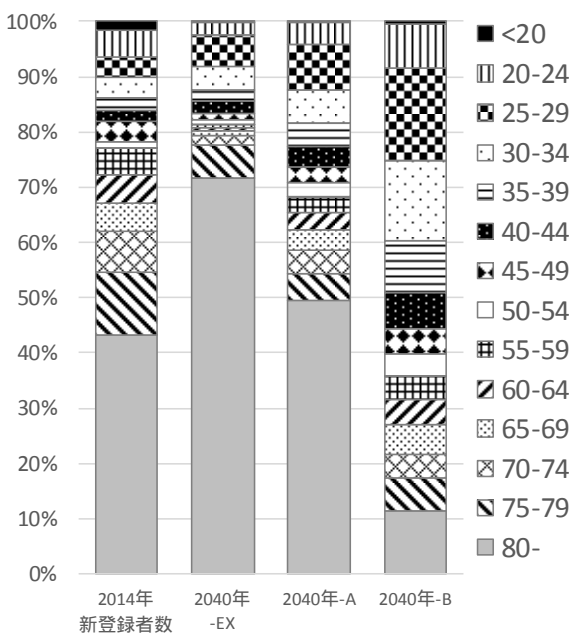


図2-2 2014年新登録者数実測値と2040年予測値 (EX, A, B各平均)の年齢階級別割合 (愛知県・女)

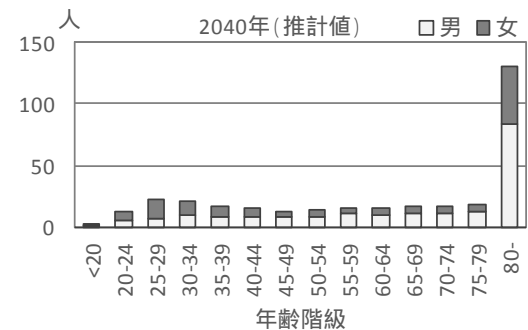
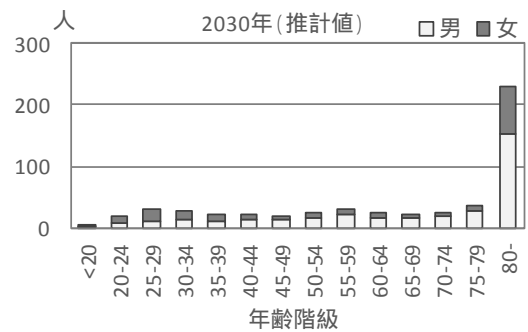
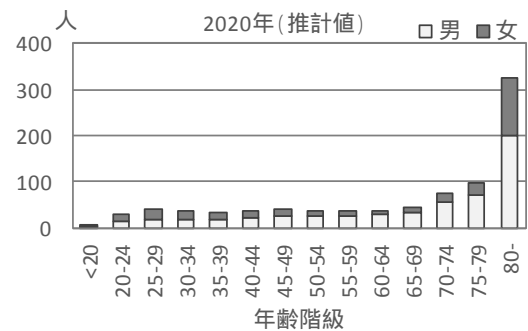
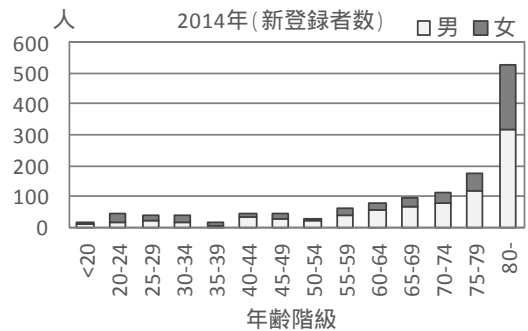


図3 愛知県における性別・年齢階級別新登録者数 (2014年)とA-2及びB-1のミックスモデルによる年齢階級別罹患数予測値 (2020年~2040年)

以上の高齢者が約 4 割を占めた。2040 年における予測では男の 80 歳以上割合は、EX 平均で 73.0%と最も高く、次いでモデル A 平均で 57.4%、最も低いモデル B 平均では 25.6%であり、全国と同様にモデルにより、80 歳以上の占める割合が大きく異なった。女の 80 歳以上の占める割合は EX 平均では 71.5%、モデル A 平均では 49.2%、モデル B 平均では 11.5%と男と同じ傾向を示した。

性別・年齢階級別新登録患者数のミックスモデルによる予測値を図 3 に示す。80 歳以上の高齢者への偏在化が進むことが確認された。また、女では 20 代女性患者の相対的拡大が認められた。

### 考 察

未だ中まん延国レベルにあるわが国において、現状の結核対策を継続した場合、10 年後、20 年後には患者がどれだけ発生するのか、どのような性・年齢等の特性をもつ患者が相対的に増加するのかといった予測は、将来の結核対策のあり方を検討する上で非常に重要な情報となる。

WHO は 1991 年から将来予測を開始している<sup>12)</sup>。さらに WHO の DOTS 戦略の効果を探るため年齢構成を基礎とした数学モデルを開発し継続的な評価を行っている<sup>13,14)</sup>。わが国では 1970 年代から対策要因も考慮した数学モデル<sup>15,16)</sup>や出生コホートを考慮した予測<sup>17)</sup>が試みられてきた。われわれは愛知県結核対策プラン策定にあたり基礎資料作成のため指数回帰式を当てはめた予測を実施した<sup>6)</sup>。その結果、全国レベルでは比較的よい予測値が得られたものの、愛知県における予測値は実測値を上回り、遠い未来になるほど実測値との乖離が観察された。そこで、罹患率減少速度を活用した結核研究所による全国の将来予測方法<sup>11)</sup>に準じて、愛知県における結核罹患の将来予測を試みた。モデル A は公益財団法人結核

予防会により公表される「結核の統計」などの解説で、年齢階層別罹患率の増減率（例：20 歳代の罹患率は前年に比べて何パーセント減少）等の算定に使用されている方法で、減少速度を 5 年経過した時点で 5 歳加齢した年齢グループの減少速度を当てはめており結果として加齢の影響が強く現れた。これに対しモデル B は減少速度を 5 年前の 5 歳若い年齢層との比較をしており、出生コホートという視点ではより妥当な方法と考えられる。モデル A とは対照的に観察期間の出生コホートの傾向が超高齢まで影響することが考えられる。例えば 2040 年に 80 歳になる者の罹患率減少傾向を 50 歳までの傾向で予測することになるので結果として遠い将来ほど高齢者の罹患率が急速に減少することになる。最も減少の早いモデル B-2 では 80 歳以上の男の罹患率は 2020 年、2030 年、2040 年にそれぞれ 60.6、18.7、15.4 と予測され、2040 年時点での予測はモデル A-1 の約 4 分の 1 との結果になった。

さらに今回は観察期間についても 1987 年～2013 年、1998 年～2013 年の 2 期間を設定した。1998 年には活動性分類の変更がなされ、非結核性抗酸菌陽性が別掲として集計されることとなった。このため後者の期間 2 では罹患率が低くなったことに加え、結核緊急事態宣言を受けて自治体の結核対策の取り組み強化や日本版 DOTS の普及が図られた結果罹患率が急速に低下したと考えられる。従って、A-2、B-2 モデルによる将来予測では罹患率の低下が速い。また、B-2 モデルでは減少速度の低下を 2000 年～2010 年の短期間の罹患率から算出することになるので有用な予測値が得られないおそれがある。

予測精度に関して、予測値の結合<sup>18)</sup>、つまり予測精度の向上をはかるには単一の予測モデルを利用するより各種の予測法による

複数の予測値を結合するほうが好ましい、との考え方がある。本報においても、将来の結核対策の資料として実用的な罹患率として活用するためミックスモデルを設定した。ミックスモデルでは2種類の減少速度の計算方法と2種類の期間が同時に考慮されており、人口の将来予測などでも提示される高位、中位、低位推計の考え方からもミックスモデルの方がA-1～B-2の単独モデルより代表値として適しているものと思われる。ミックスモデルに基づく罹患率が10を下回り低まん延状態に到達するのは愛知県では2025年(罹患率9.2)と全国の2020年より5年程遅れることが予測された。

今回の解析結果から患者の高齢者への益々の偏在化が明らかとなった。1950年以前に出生した高齢者の多くは既感染者であり、加齢とともに再燃する可能性の高い発病予備群と考えられる。今後は高齢者施設の利用率が上昇することが見込まれるので、院内感染とともに施設内感染対策も重要となる。また、高齢結核患者の治療は身体障害、糖尿病、認知症をはじめとする基礎疾患の合併割合が高く、病態が複雑化して標準治療が困難になりがちである。将来の結核の疫学像は高齢結核患者の影響を強く受けることが推察される。

また、患者の高齢者への偏りの一方で、20代女性の占める割合が相対的に拡大することが推測された。男女とも20～40代の罹患率減少速度は遅く、これら社会的に活動している年齢層への診断・治療・感染対策など課題が多様化することが予想される。名古屋市を除く愛知県においても結核対策が依然として公衆衛生上の重要な課題であるとの認識にたち、体制の維持・強化が望まれる。愛知県基幹地方情報センターとしてサーベイランスデータを活用した解析を継続し、今後も愛知県における結核対策の

策定及び評価に貢献したい。

## 文 献

- 1) Clancy L, Rieder HL, Enarson DA et al.: Tuberculosis elimination in the countries of Europe and other industrialized countries. *European Respiratory Journal* 4:1288-1295, 1991.
- 2) 結核研究所疫学情報センター:平成26年結核登録者情報調査年報のポイント(文章編) [http://www.jata.or.jp/rit/ekigaku/index.php/download\\_file/-/view/3135/2014nenpo\\_point\\_bunsho.pdf](http://www.jata.or.jp/rit/ekigaku/index.php/download_file/-/view/3135/2014nenpo_point_bunsho.pdf)
- 3) 結核研究所疫学情報センター:都道府県・市別掲、新登録結核罹患数(率) [http://www.jata.or.jp/rit/ekigaku/index.php/download\\_file/-/view/3388/2014nenpo\\_kenshi.xlsx](http://www.jata.or.jp/rit/ekigaku/index.php/download_file/-/view/3388/2014nenpo_kenshi.xlsx)
- 4) 結核研究所疫学情報センター:結核登録者情報調査月報報告-平成27年(2015年)9月概況-[http://www.jata.or.jp/rit/ekigaku/index.php/download\\_file/-/view/3404/2015.09.pdf](http://www.jata.or.jp/rit/ekigaku/index.php/download_file/-/view/3404/2015.09.pdf)
- 5) 愛知県:愛知県結核対策プラン, 2011年9月. <http://www.pref.aichi.jp/uploaded/attachment/8177.doc>
- 6) 續木雅子、櫻井博貴、広瀬かおる、大西賢治郎、皆川洋子: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,愛知県衛生研究所報,62:1-10,2012.
- 7) 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/)
- 8) 総務省統計局:人口推計 各年10月1日現在人口及び長期時系列データ <http://www.e-stat.go.jp/SG1/estat/NewList.do?tid=000000090001>
- 9) 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 ( 大島明、黒石哲生、田島和雄編 ): 219-234, 2004, 篠原出版, 東京 .
- 10) 国立社会保障・人口問題研究所 : 日本の地域別将来推計人口 ( 平成 25 ( 2013 ) 年 3 月推計 ) . <http://www.ipss.go.jp/pp-shicyoson/j/shicyoson13/t-page.asp>
- 11) 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: 365-377 , 2008 .
- 12) Dolin PJ, Raviglione MC, Kochi A: A review of current epidemiological data and estimation of future tuberculosis incidence and mortality. WHO/TB/93.173:1-34,1993.
- 13) Dye C, Garnet GP, Sleeman K, et al.: Prospects for worldwide tuberculosis control under the WHO DOTS strategy. The Lancet 352:1886-1891, 1998.
- 14) Dye C, Watt CJ, Bleed DM, et al.: Evolution of tuberculosis control and prospects for reducing tuberculosis incidence, prevalence, and deaths globally. Journal of American Medical Association 293: 2767-2775, 2005.
- 15) 遠藤昌一、青木国雄 : 日本における結核まん延のシステム分析 . 結核 46:99-111, 1971.
- 16) 東義國 : 単純な疫学モデルによる日本の結核の疫学的推移分析の試み . 結核 50: 199-207, 1975.
- 17) 柳川洋、重松逸造、加藤孝之 : わが国における結核死亡率の将来予測に関する試み . 結核 46 : 173-178, 1971.
- 18) Mahmoud E. Accuracy in forecasting a survey. Journal of Forecasting 3:139-159, 1984.

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

## - Second report

Mizuna Nakamura, Masako Tsuzuki, Hironori Ohmi, Kazuaki Mori,  
Kaoru Hirose, 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. In order to clarify the emerging/urgent issues of TB control and eventual elimination, we reported the estimation of TB incidence rates utilizing the exponential model in 2012. Furthermore, we have made another attempt taking into account the reduction rates of incidence.

Two different models (A and B) have been adopted. In model A, the reduction rate was calculated by using two groups of the same age group but different members by calendar year. In model B, the reduction rate was calculated by using the same birth cohort but different age by calendar year. We also adopted two sub-model by the observation period of past trends. The incidence rates for the period from 1987 to 2013 were used in period 1 and in another model (period 2) the incidence rates for the period from 1998 to 2013 were used. The incidence rate in 1999 was excluded from both period 1 and 2, because the TB incidence rate dramatically increased due to the declaration of a state of emergency concerning TB. The sex-age-specific incidence rates were estimated for the years 2015 to 2040 in 5 year intervals, on the basis of annual report of TB registrations observed past trends (1987 – 2013). We predicted the 6 patterns by the combination of the model (exponential, A and B models) and the period (period 1 and 2).

The future number of TB patients and incidence rates by sex and age were discussed based on a mixed model which used the middle series of estimates, and was obtained by combing model A-2 and B-1. The year when the TB incidence rate will reach the level of low-incidence countries, which is defined as a country with a TB incidence rate of less than 10 per 100,000 population, might be around 2025 in Aichi Prefecture. At that time, the age composition of TB patients will be dominated by very old (i.e., 80 years old and over) patients, and the percentage of female patients aged 20's will become higher.

Key words : tuberculosis, incidence rate, estimation, elderly patients

---

## 調 査 研 究

---

# 下水及びイヌから検出されるコブウイルスの遺伝子解析

山下照夫、安達啓一、伊藤 雅、廣瀬絵美、中村範子、尾内彩乃、  
安井善宏、小林慎一、皆川洋子

### 要 旨

2006年～12年に県内の下水処理場で採水された流入下水 338件について、コブウイルス遺伝子の有無を VP1 領域を標的とする RT-PCR 法で調べた。219件(64.8%)からコブウイルス遺伝子が検出された。その内訳は、アイチウイルス A 型遺伝子 (AiV-A) が 155件(70.8%)、AiV-B が 70件(32.0%)、イヌコブウイルス (CKV) が 17件(7.8%)であった。系統樹解析の結果、AiV-A は 4つの系統が同じ年に検出されたが、AiV-B は 1株を除き、全て 2008年に中国で検出された Chshc7 株に近縁であった。AiV-B が我が国に流行している可能性がある。また、イヌ 342頭中 41頭(12.0%)の糞便から CKV 遺伝子が検出された。系統樹解析の結果、これらは 2つのグループに分かれ、1グループは下水から検出されたものと良く似た配列であった。我が国におけるイヌからの検出としては最初の報告である。

キーワード：コブウイルス、アイチウイルス、イヌコブウイルス、下水

### 序 文

アイチウイルス (AiV) は胃腸炎患者の糞便から分離されたウイルスで<sup>1)</sup>ピコルナウイルス科コブウイルス属に分類される<sup>2)</sup>。約 8.3kb のプラス一本鎖 RNA を遺伝子に持つ。粒子の直径が約 30nm の球形(正二十面体)ウイルスで、酸耐性、50～30分の加熱でも不活化されない<sup>1,3)</sup>。胃腸炎患者からの検出率は低いが世界中で報告例がある<sup>4-11)</sup>。5歳以下の抗体保有率は 5%と低い<sup>12)</sup>が 40歳上では 80%以上となり<sup>12)</sup>、下水からも良く検出されることが知られている<sup>13-16)</sup>。血清型は 1種類だが遺伝子型により A、B 及び C 型に区別されている<sup>7,17)</sup>。

イヌコブウイルス (CKV) は、AiV、マウスコブウイルス (MKV)<sup>18)</sup>とともに *Aichivirus*

A 種に属するウイルスで<sup>2)</sup>、胃腸炎症状の犬糞便より検出された<sup>19, 20)</sup>。その後、世界各国から検出報告があり<sup>21-23)</sup>、アフリカではハイエナやジャッカルからも検出されているが<sup>24)</sup>、日本の犬からの検出報告はない。

筆者らは下水中から高頻度に AiV 遺伝子が検出されるとともに CKV 遺伝子の存在を明らかとした<sup>25)</sup>。本研究では、その後に採水された下水からの AiV と CKV の検出について、VP1 領域を標的とするプライマーを用いて行い、流行株の遺伝的特徴を既知のものと比較した。また、イヌ糞便からのウイルス検出及び分離を試みた。

### 材料と方法

#### 1. 下水とイヌ糞便検体

表1 流入下水からのコブウイルスVP1遺伝子の検出成績

年	検体数	陽性数	AiV-A	AiV-B	CKV
2006	29	15	15		
2007	51	34	34		
2008	53	28	17	11	1
2009	51	41	27	12	5
2010	51	19	18	2	
2011	52	38	19	17	5
2012	51	44	25	28	6
Total (%)	338	219 (64.8)	155 (70.8)	70 (32.0)	17 (7.8)

AiV-A: アイチウイルス遺伝子型A

CKV: イヌコブウイルス

2006年～12年に境川浄化センターにて、毎週1回採水された流入下水(338件)を10,000 x G、20分遠心分離した上清にポリエチレングリコール6,000を加え10%溶液として4℃、一晚静置後、3,500 x G、20分遠心分離し、沈渣を精製水で溶解し10倍に濃縮した。

イヌ糞便は2012年～14年に、動物保護管理センターにて確保された犬由来の332件を検査材料として用いた。糞便をVeal Brothにて10%乳剤とし、10,000 x G、20分遠心分離した上清をVero細胞とMDCK細胞に接種してウイルス分離を試みるとともに、下水同様に遺伝子検査材料とした。

## 2. RNAの抽出とRT-PCR

High Pure Viral RNA Kit(Roche)により下水濃縮液及びイヌ糞便材料からRNA抽出を行った。遺伝子増幅は、AiVとCKV遺伝子のVP1領域を標的とするプライマーKBP1P: 5'-CAGCCMCGCACCACYTTCSASTAC-3'及びKBP1N: 5'-GAAGTAKGARGTGGGRATRGCWGA-3'を用い1stRT-PCRを、KBVP1-5: 5'-CACCTTTGAGTACACCGARAA-3'及びKBP1Nを用いてセミネストPCR法を実施した。温度条件は、1st、2nd PCRとも94℃ 30秒、50℃ 30秒、72℃ 1分を35サイクル実施した。

## 3. 遺伝子解析

RT-PCR法陽性検体はWizard Plus SV Miniprep DNA Purification System(Promega)を用いて精製後pGEM-Tベクター(Promega)にクローニングし、塩基配列を

SequiTherm Long-Read Cycle Sequence Kit-LCを用いModel 4000 Automated DNA Sequencer(Li-Cor)にて決定した。系統樹解析はMEGA 5による近隣結合法(NJ法)<sup>26)</sup>にて実施した。参照として、AiVのA型遺伝子(AiV-V)がAB040749(A846/88), EU159257(E1818/2007 France), JX564249(kvgh99012632/2010 Taiwan), GQ927711(D/V12287/2004 Germany), EU143277(T-132 Thailand), AiV-BがFJ8905237(Chshc7/2008 China), DQ028632(GO/03/01/Brazil), AB712380(N1277/91 Japan), GQ927704(D/V12169/2004 Germany), AiV-CがEU159259(Rn48/2002), CKVがJN911763(US-PC0082 USA), KC161964(UK003 UK), KF781167(Fox Italy), KM068048(DD2 Tanzania), KM068049(Jackal Tanzania), AB861494(Y12/2002 JPN), KF924623(12D049 SK), MKVがJF755427(M-5/USA/2010), ネココブウイルス(FeKV)がKM091960(Italy), KJ958930(SK)を用いた。

## 結果

### 1. 下水からのウイルス検出

下水338件中219件(64.8%)からコブウイルス遺伝子が検出された。その内訳は、AiV-Aが155件(70.8%)、AiV-Bが70件(32.0%)、CKVが17件(7.8%)であった。AiV-Aは毎年検出されたが、AiV-Bは2008年から検出された。2011年～12年はAiV-AとAiV-Bの検出数がほぼ同じであった(表1)。

表2 A型アイチウイルス遺伝子検出成績（年別）

Strains	Total	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012
E1818/2007 France	88	8	18	9	6	9	14	24
kvgh99012632/2010 Taiwan	77	7	19	9	23	8	6	5
D/VI2287/2004 Germany	11	3	4	3	0	1	0	0
T-132 Thailand	3	1	0	2	0	0	0	0
Others	5	1	0	0	2	0	1	1
Total	184	20	41	23	31	18	21	30

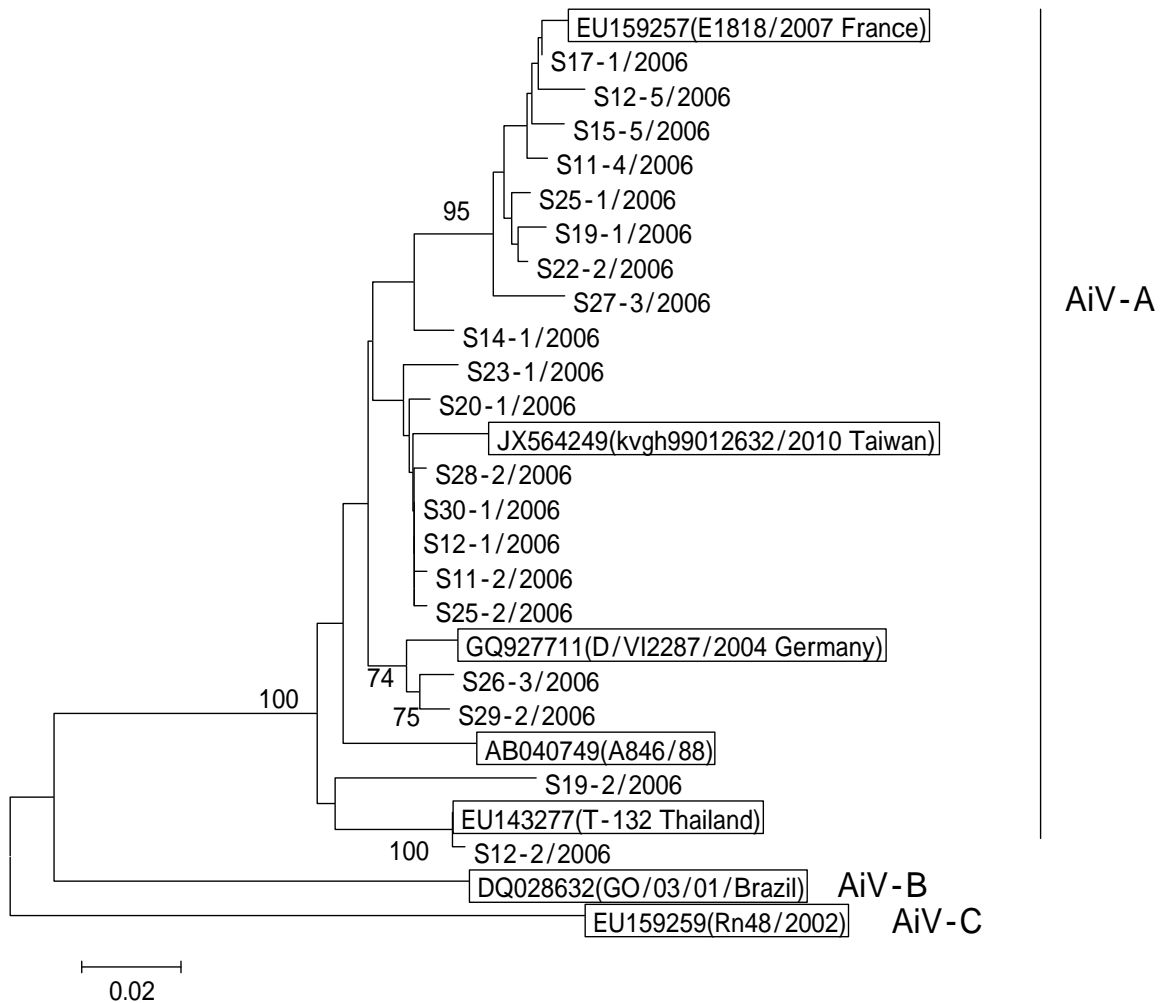


図1 2006年に下水より検出されたA型アイチウイルスの系統樹解析（NJ法）  
参照株を      で囲った。

## 2. 遺伝子解析

系統樹解析の結果 AiV-A は多様な型が毎年検出されたが、大きく 4 グループに分かれた（表 2、図 1）。一方、AiV-B は 1 株を除き、全て 2008 年に中国で検出された Chshc7 株に近縁であった（図 2）。CKV 遺伝子は、多様で同じ配列のものはほとんどなかった

が、2003 年にイギリスの犬から検出された株に近いグループと、2012 年に韓国の犬から検出された株に近いグループにわかれた（図 3）。

## 3. イヌ糞便からのウイルス検出

一方、イヌ 342 頭中 41 頭（12.0%）の糞便から CKV 遺伝子が検出された（表 3）。系



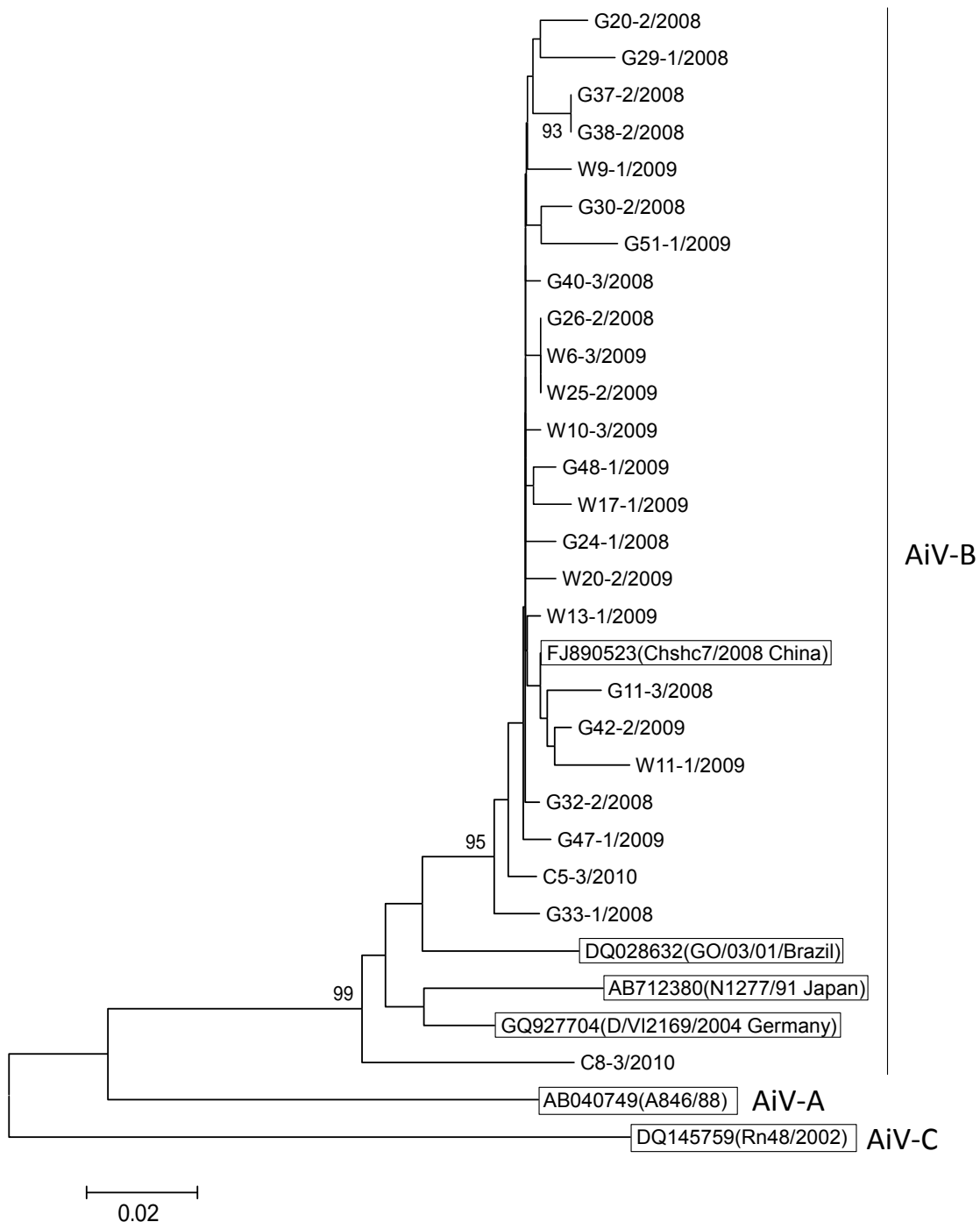


図2 2008年～2010年に下水より検出されたB型アイチウイルスの系統樹解析 (NJ法) 参照株を □ で囲った。

系統樹解析の結果 CKV 遺伝子は、検出時期とイヌの捕獲地区の違いで配列が異なっていたが、下水から検出される CKV 遺伝子ほど多様ではなかった (図 4)。また、同一地区で同時に確保された 4 例 (13-156d ~ 13-159d) を除いて UK003 株に近い配列で、その多くが下水から検出された遺伝子 (E4-

1/2012 及び E15-3/2012) とほぼ同じ配列であった。細胞培養によるウイルス分離は全て陰性であった。

#### 考 察

AiV-A は、過去に我が国の食中毒事例から検出された AiV の殆どを占めていた<sup>12)</sup>。

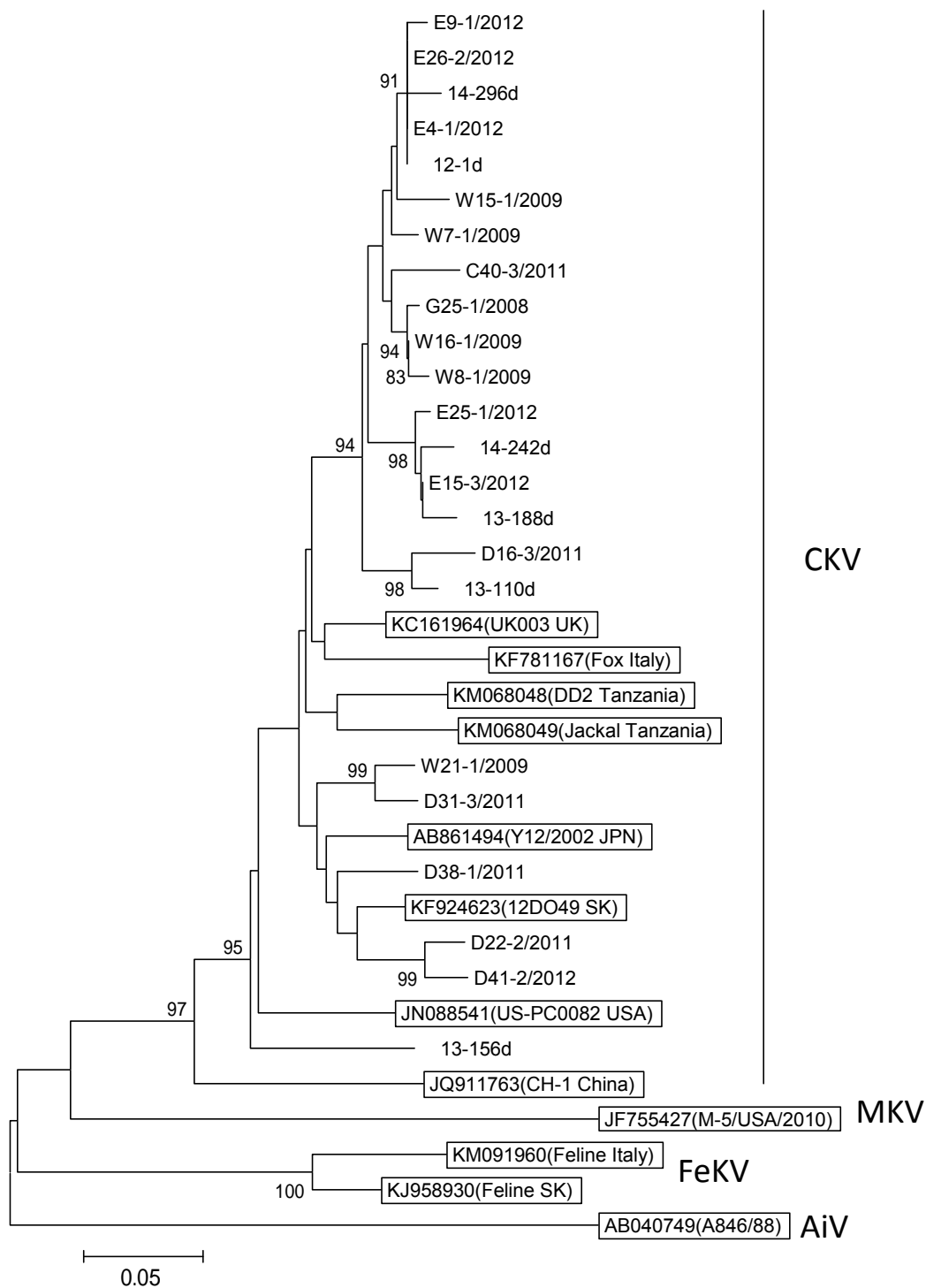


図3 下水より検出されたイヌコブウイルスの系統樹解析 (NJ法)  
 参照株を   で囲い、イヌ糞便から検出された遺伝子の代表を   で示した。

表3 イヌ糞便からのイヌコブウイルス検出成績

採取年	検体数	陽性数	%
2012	74	16	21.6
2013	150	19	12.7
2014	118	6	5.1
Total	342	41	12.0

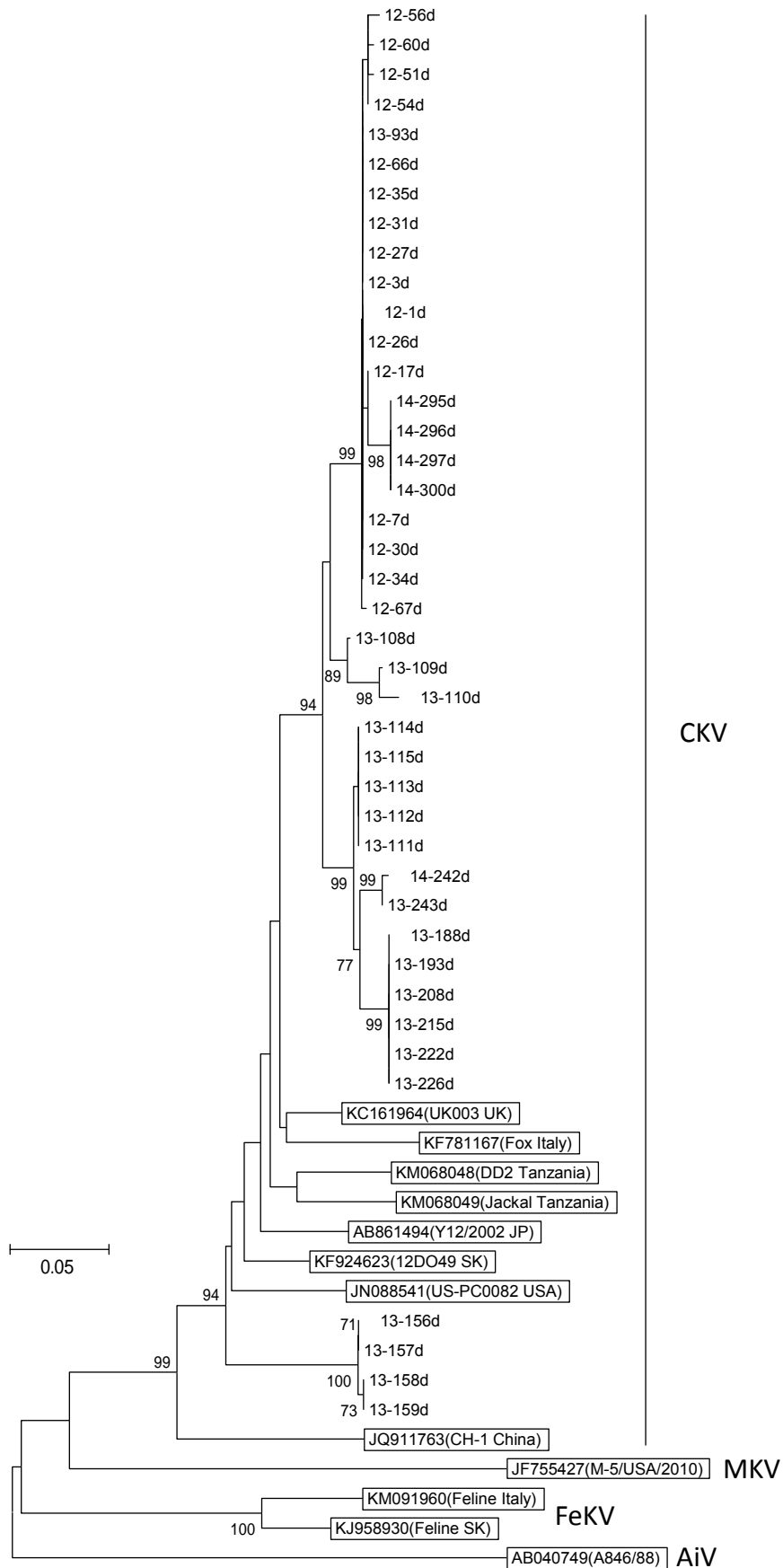


図4 イヌ糞便より検出されたイヌコブウイルスの系統樹解析 (NJ法) 参照株を   で囲った。  
: 図3に用いた代表株

2001年から2005年に下水から検出されたAiV陽性検体137件全てからもAiV-A遺伝子が検出されていることから<sup>25)</sup>、我が国に以前から存在し変異を繰り返しながらヒトの間で感染を繰り返しているものと考えられた。一方、AiV-Bは各国から様々な遺伝子型が報告されているが<sup>6, 7, 11, 27, 28)</sup>、我が国で検出された例は非常に少なく<sup>17)</sup>、2001年から2005年に調べた下水からは1件検出されたのみであった<sup>25)</sup>。今回、AiV-B遺伝子が2008年に採水した下水検体から採れはじめ、2011年、12年の検体からはAiV-Aとほぼ同じ割合で検出されている事が判明した。その塩基配列は、1例を除き2008年に中国の胃腸炎患者から検出されたものに近縁のものであった。このことは、東南アジア等から侵入したAiVが我が国に定着しつつあることを示唆している。AiV-AとAiV-Bで中和抗原性に差は認められないので<sup>12, 17)</sup>両者が置き換わる可能性もある。両者の病原性の差は知られていないが、今後の動向に注目したい。

イヌ糞便からCKVが検出されたことで、我が国のイヌの間でも流行が起こっていることが初めて確認された。海外の報告例は胃腸炎症状を示していたが<sup>19-22)</sup>我々の検体は動物保護管理センターにて確保されたものであり、多くが健康なイヌであった。ヒト由来のAiVと同様に不顕性感染の多いウイルスと考えられた。また、下水から検出されるCKVは多様な株が存在し、様々な株が流行を起こしていると推察された。

コブウイルス属には*Aichivirus A*、*B*及び*C*種が存在する。*Aichivirus B*種にはウシ、ヒツジ及びフェレットコブウイルスが、*Aichivirus C*種にはブタコブウイルスが分類されている<sup>2)</sup>。最近、新たに*Aichivirus A*種の仲間としてネコ由来のFeKVが報告された<sup>21, 29, 30)</sup>。今回の研究では、AiVとCKVを対象にプライマーを設計し検出を行ったが、ヒトやイヌ以外のコブウイルスが下水中に存在する可能性もある。我々の調査では、ウシコブウイルスは下水から検出されなかったが<sup>25)</sup>、今後、MKV及びFeKV等のコブウイルス用プライマーを設計して下水中

での存在の有無を調べ、我が国における流行を把握したいと考える。

#### 謝 辞

流入下水の採取にご協力いただいた愛知水と緑の公社下水道部境川事業所並びに愛知県衣浦東部保健所、及びイヌ糞便の採取にご協力いただいた愛知県動物保護管理センター尾張支所の皆様にお礼申し上げます。

#### 文 献

- 1) Yamashita T, Kobayashi S, Sakae K, Nakata S, Chiba S, Ishihara Y, Isomura S: Isolation of cytopathic small round viruses with BS-C-1 cells from patients with gastroenteritis. *The Journal of Infectious Diseases* 164(11):954-957, 1991.
- 2) Knowles N J, Hovi T, Hyypiä T, King A M Q, Lindberg A M, Pallansch M A, Palmenberg A C, Simmonds P, Skern T, Stanway G, Other authors (2012): Picornaviridae. *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses* (King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ eds), 855-880, 2012, Elsevier, San Diego.
- 3) Yamashita T, Sakae K, Tsuzuki H, Suzuki Y, Ishikawa N, Takeda N, Miyamura T, Yamazaki S: Complete nucleotide sequence and genetic organization of Aichi virus: a distinct member of the *Picornaviridae* associated with gastroenteritis in humans. *Journal of Virology* 72(10): 8408-8412, 1998.
- 4) Yamashita T, Sakae K, Kobayashi S, Ishihara Y, Miyake T, Agboatwalla M, Isomura S: Isolation of cytopathic small round virus (Aichi virus) from Pakistani children and Japanese travelers from Southeast Asia. *Microbiology and Immunology* 39(6):

- 433-435, 1995.
- 5) Oh, D Y, Silva P A, Hauroeder B, Diedrich S, Cardoso D D, Schreier E: Molecular characterization of the first Aichi virus isolation in Europe and in South America. *Archives of Virology* 151(6):1199-1206, 2006.
  - 6) Pham N T, Khamrin P, Nguyen T A, Kanti D S, Phan T G, Okitsu S, Ushijima H: Isolation and molecular characterization of Aichi viruses from fecal specimens collected in Japan, Bangladesh, Thailand, and Vietnam. *Journal of Clinical Microbiology* 45(7):2287-2288, 2007.
  - 7) Ambert-Balay K, Lorrot M, Bon F, Giraudon H, Kaplon J, Wolfer M, Lebon P, Gendrel D, Pothier P: Prevalence and genetic diversity of Aichi virus strains in stool samples from community and hospitalized patients. *Journal of Clinical Microbiology* 46(4):1252-1258, 2008.
  - 8) Sdiri-Loulizi K, Gharbi-khelifi H, de Rougemont A, Chouchane S, Sakly N, Ambert-Balay K, Hassine M, Guediche M N, Aouni M, Pothier P: Acute infantile gastroenteritis associated with human enteric viruses in Tunisia. *Journal of Clinical Microbiology* 46(4):1349-1355, 2008.
  - 9) Sdiri-Loulizi K, Hassine M, Gharbi-khelifi H, Sakly N, Chouchane S, Guediche M N, Pothier P, Aouni M, Ambert-Balay K: Detection and genomic characterization of Aichi virus in stool samples from children in Monastir, Tunisia. *Journal of Clinical Microbiology* 47(7):2275-2278, 2009.
  - 10) Reuter G, Boldizar A, Papp G, Pankovics P: Detection of Aichi virus shedding in a child with enteric and extraintestinal symptoms in Hungary. *Archives of Virology* 154(9):1529-1532, 2009.
  - 11) Kaikkonen S, Rasanen S, Ramet M, Vesikari T: Aichi virus infection in children with acute gastroenteritis in Finland. *Epidemiology and Infection* 138(8):1166-1171, 2010.
  - 12) Yamashita T, Sakae K, Ishihara Y, Isomura S, Utagawa E: Prevalence of newly isolated cytopathic small round structured virus (Aichi strain) in Japan. *Journal of Clinical Microbiology* 31(11):2938-2943, 1993.
  - 13) Alcalá A, Vizzi E, Rodríguez-Díaz J, Zambrano J L, Betancourt W, Liprandi F: Molecular detection and characterization of Aichi viruses in sewage-polluted waters of Venezuela. *Applied and Environmental Microbiology* 76(12):4113-4115, 2010.
  - 14) Sdiri-Loulizi K, Hassine M, Aouni Z, Gharbi-khelifi H, Sakly N, Chouchane S, Guediche M N, Pothier P, Aouni M, Ambert-Balay K: First molecular detection of Aichi virus in sewage and shellfish samples in the Monastir region of Tunisia. *Archives of Virology* 155(9):1509-1513, 2010.
  - 15) Kitajima M, Haramoto E, Phanuwat C, Katayama H: Prevalence and genetic diversity of Aichi virus in wastewater and river water in Japan. *Applied and Environmental Microbiology* 77(6):2184-2187, 2011.
  - 16) Lodder W J, Rutjes S A, Takumi K, deRoda Husman A M: Aichi virus in sewage and surface water, the Netherlands. *Emerging Infectious Diseases* 19(8):1222-1230, 2013.
  - 17) Yamashita T, Sugiyama M, Tsuzuki H, Sakae K, Suzuki Y, Miyazaki Y: Application of a RT-PCR for Identification and Differentiation of Aichi Virus, a New Member of the Picornavirus Family Associated with Gastroenteritis in Humans. *Journal of*

- Clinical Microbiology 38(8):2955-2961, 2000.
- 18) Phan T G, Kapusinszky B, Wahg C, Rose R K, Lipton H L, Delwart E L: The Fecal flora of wild rodents. *PLoS Pathogens* 7(9):e1002218, 2011.
  - 19) Kapoor A, Simmons P, Dubovi E J, Qaisar N, Henriquez J A, Medina J, Shields S, Lipkin W I: Characterization of a canine homolog of human Aichivirus. *Journal of Virology* 85(21): 11520-11525, 2011.
  - 20) Li L, Pesavento P A, Shan T, Leutenegger C M, Wang C, Delwart E: Viruses in diarrhoeic dogs include novel kobuviruses and sapoviruses. *Journal of General Virology* 92(11): 2534-2541, 2011.
  - 21) Carmona-Vicente N, Buesa J, Brown P A, Merga J Y, Darby A C, Stavisky J, Sadler L, Gaskell M, Dawson S, Radford A D: Phylogeny and prevalence of Kobuvirus in dogs and cats in the UK. *Veterinary Microbiology* 164(3-4): 246-252, 2013.
  - 22) Di Martino B, Di Felice E, Ceci C, Di Profio F, Marsilio F: Canine kobuviruses in diarrhoeic dogs in Italy. *Veterinary Microbiology* 166(1-2): 246-249, 2013.
  - 23) Oem J K, Choi J W, Lee M H, Lee K K, Choi K S: Canine Kobuvirus in Korean dogs. *Archives of Virology* 159(10): 2751-2755, 2014.
  - 24) Olarte-Castillo X A, Heeger F, Mazzoni C J, Greenwood A D, Fryumagwa R, Moehlman P D, Hofer H, East M L: Molecular characterization of canine Kobuvirus in wild carnivores and the domestic dog in Africa. *Virology* 477: 89-97, 2015.
  - 25) Yamashita T, Adachi H, Hirose M, Nakamura N, Ito M, Yasui Y, Kobayashi S, Minagawa H: Molecular detection and nucleotide sequence analysis of a new Aichi virus closely related to canine Kobuvirus in sewage samples. *Journal of Medical Microbiology* 63(4): 715-720, 2014.
  - 26) Tamura K, Peterson D, Peterson N, Strecher G, Nei M, Kumar S: MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28(10):2731-2739, 2011.
  - 27) Drexler J F, Baumgarte S, de Souza Luna L K, Eschbach-Bludau M, Lukashev A N, Drosten C: Aichi virus shedding in high concentrations in patients with acute diarrhea. *Emerging Infectious Diseases* 17(8): 1544-1548, 2011.
  - 28) Yang S, Zhang W, Shen Q, Yang Z, Zhu J, Cui L, Hua X: Aichi virus strains in children with gastroenteritis, China. *Emerging Infectious Diseases* 15(10):1703-1705, 2009.
  - 29) Chung J Y, Kim S H, Kim Y H, Lee M H, Lee K K, Oem J K: Detection and genetic characterization of feline kobuviruses. *Virus Genes* 47(3): 559-562, 2013.
  - 30) Di Martino B, Di Profio F, Melequari I, Marsilio F, Martella V: Detection of feline Kobuvirus in diarrhoeic cats, Italy. *Veterinary Microbiology* 176(1-2): 186-189, 2015.

# Molecular detection and analysis of kobuviruses in sewage samples and canine feces

Teruo Yamashita, Hirokazu Adachi, Emi Hirose, Noriko Nakamura,  
Ayano Onouchi, Miyabi Ito, Yoshihiro Yasui, Shinichi Kobayashi,  
Hiroko Minagawa

Between 2006 and 2012, 338 raw sewage samples were collected at the inflow of a sewage treatment plant in Aichi Prefecture, Japan. Of the 338 sewage samples, 219(64.8%) were found to be positive for amplification of kobuvirus nucleotide using RT-PCR with specific primers in VP1 region corresponding to the nucleotide sequence of Aichi virus (AiV) and canine kobuvirus (CKV). AiV genotype A (AiV-A), and B (AiV-B) sequences were detected in 155(70.8%), and 70(32.0%) samples, respectively. CKV sequences were also detected from 17(7.8%) samples. The phylogenetic tree indicated that 4 types of AiV-A sequences were detected in the same year. All AiV-B sequences except one clustered into a single clade with Chshc7/2008 isolated in China. AiV-B may have been prevalent in Japan. CKV sequences were also detected from 41 (12.0%) of 342 feces samples of dogs in animal protection control center of Aichi Prefecture. The phylogenetic tree indicated that 41 samples from dogs were divided into two groups. The one group was closely related sewage samples. This is the first report of CKV detection from Japanese dogs.

Key words: kobuvirus, Aichi virus, canine kobuvirus, sewage

---

---

## 調 査 研 究

---

---

# 愛知県におけるアデノウイルス検出状況と遺伝子型別 (2009年～2015年)

廣瀬絵美、伊藤 雅、安達啓一、尾内彩乃、中村範子、秦 眞美  
安井善宏、小林慎一、山下照夫、皆川洋子

### 要 旨

ヒトアデノウイルス (human adenovirus: AdV) は咽頭結膜熱、流行性角結膜炎、感染性胃腸炎、出血性膀胱炎など多様な疾患の病原ウイルスである。2009年4月から2015年3月までに感染症発生動向調査事業協力医療機関にて採取された検体のうち、臨床症状からAdV感染の疑われた感染症患者2,515名の糞便、咽頭ぬぐい液、吐物、尿など計2,954検体についてAdVの検出を試みた。ウイルス分離及び遺伝子検出を併用し、468名の488検体から16遺伝子型のAdVが検出された。感染性胃腸炎患者からの検出数が最も多く(53.8%、252/468)、次いで、上気道炎、流行性角結膜炎及び咽頭結膜熱が多かった。陽性検体すべてを血清型若しくは遺伝子型別可能であり、多く検出された型はAdV-2(35.9%、175/488)、AdV-3(24.0%、117/488)及びAdV-41(18.2%、89/488)であった。新型とされるAdVは、AdV-53が2件、AdV-54が5件、AdV-56が13件検出され、20件中11件が流行性角結膜炎患者由来であった。

キーワード：ヒトアデノウイルス、感染症発生動向調査、ウイルス分離、遺伝子型別

### 序 文

ヒトアデノウイルス (human adenovirus: AdV) は、感染症発生動向調査において病原体検索対象疾患とされている咽頭結膜熱、流行性角結膜炎の主な病原体であるほか、ノロウイルスやロタウイルスと並んで感染性胃腸炎の病原体としても重要であり、さらに出血性膀胱炎、脳炎や肝炎等重篤な感染症の病原体としても知られる一方、症状のないヒトの上気道や糞便からも検出される。2015年現在A～G種の7種、60以上の型に分類されており、引き起こす疾患との関連が明らかにされつつある<sup>1)</sup>。感染力が強く、以前は眼科医や医療従事者を介した院内感染が多くみられたが、現在では職場、

家庭内などで集団発生もみられている。わが国の感染症発生動向調査においても毎年さまざまな型の検出報告がある<sup>2)</sup>他、先進国を含む各国より集団発生等の報告もあり<sup>3)</sup>、動向に注意が必要なウイルスである。

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して正式に始まり、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が実施され、現在、当所は同事業による5類定点把握対象疾患患者を中心に病原ウイルス



検索を担当している。AdV に関しては、培養細胞を用いたウイルス分離に加えて 2003 年からは PCR 法を用いた AdV 遺伝子検出を実施しており、2008 年には 2003～2007 年の感染性胃腸炎及び流行性角結膜炎患者からの AdV 検出成績を報告した<sup>4)</sup>。

本稿では 2009 年 4 月から 2015 年 3 月までの 6 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）において採取された検体からの AdV 検出状況を報告する。

## 材料と方法

### 1. 検査検体

2009 年 4 月から 2015 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検体のうち、感染性胃腸炎、咽頭結膜熱、流行性角結膜炎など臨床症状から AdV 感染の疑われた感染症患者 2,515 名の糞便 1,803 検体、咽頭ぬぐい液 442 検体、その他（吐物、尿、髄液、血液等）709 検体、計 2,954 検体を用いた。

### 2. 検査方法

#### 2.1 分離及び血清型別

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（牛血清アルブミン）を添加した Veal infusion broth で 10% 乳剤、吐物は 50% 乳剤とした後、咽頭ぬぐい液及び尿は攪拌後 10,000 rpm で 20 分間遠心した。分離上清 200  $\mu$ L を試験管に培養した Vero 細胞、HeLa 細胞及び RD 細胞に接種し、3～4 日毎に抗生物質及び 2% FCS（牛胎児血清）を添加した Eagle's MEM 維持培地を交換し、37  $^{\circ}$ C 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、AdV 様の細胞変性効果（CPE: cytopathic effect）の有無を観察した。CPE 陽性の場合、96 穴マイクロプレート法を用いた AdV-1～7、11、19、31 又は 37 抗血清（デンカ生研）による中和試験により同定した。

#### 2.2 PCR 法による遺伝子検出及び遺伝子型別

2.1 で得られた分離上清 200  $\mu$ L からウ

イルス DNA を抽出し、PCR（polymerase chain reaction）法（Takara Ex Taq, Japan）を用いて AdV のヘキソン C4 領域<sup>5)</sup>の遺伝子を増幅した。PCR 増幅産物について 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た。但しヘキソン C4 領域のみでは型別判定が困難な AdV-11 と AdV-35（C4 領域配列が同一）、及び AdV-37 と AdV-53（相同性が高く判別不能）に関しては、ヘキソン Loop1 領域<sup>6)</sup>の塩基配列についても決定し、型別に用いた。

さらに 2.1 で得られた CPE 陽性株のうち、中和試験で型別不能な株についても、10,000 rpm で 10 分間遠心後上清 200  $\mu$ L からウイルス DNA を抽出し、遺伝子型別を実施した。

## 結果

### 1. ヒトアデノウイルス検出結果（表 1）

患者 2,515 名から採取された 2,954 検体中 488 件から 16 遺伝子型の AdV が検出された。そのうち、遺伝子検出のみ陽性であった検体は 284 件（58.2%）、ウイルス分離のみ陽性であった検体は 44 件（9.0%）、ウイルス分離及び遺伝子検出ともに陽性であった検体は 160 件（32.8%）であった。

表1 ヒトアデノウイルス検出数

		ウイルス分離	
		陽性数	陰性数
遺伝子検出	陽性数	160/488 (32.8%)	284/488 (58.2%)
	陰性数	44/488 (9.0%)	—

### 2. ヒトアデノウイルス検出患者の臨床診断名（表 2）

AdV が検出された 468 名の患者の臨床診断名は、感染性胃腸炎が最も多く 252 名（53.8%）であった。次いで、上気道炎、流行性角結膜炎及び咽頭結膜熱の患者から

表2 ヒトアデノウイルス検出患者の臨床診断名

臨床診断名	患者数	検体数
感染性胃腸炎	252	253
上気道炎	50	50
流行性角結膜炎	47	47
咽頭結膜熱	45	46
脳炎・脳症	28	33
アデノウイルス感染症	20	21
出血性膀胱炎	6	6
その他	20	32

多く検出された。

### 3. 年度別ヒトアデノウイルス検出状況(図 1)

陽性検体はすべて血清型若しくは遺伝子型別可能であった。AdV-2 が最も多く、毎年一定の検出がみられ、6 年間で計 175 件検出された。AdV-41 も毎年検出されていたが、2010 年～2013 年はそれぞれ 10 件前後の検出に留まり、2009 年及び 2014 年と比較し、少なかった。

### 4. 検体採取月別ヒトアデノウイルス検出状況(図 2～4)

感染症法における 5 類定点把握疾患である感染性胃腸炎、咽頭結膜熱及び流行性角結膜炎について、それぞれの検体採取月別 AdV 検出数を示した。

感染性胃腸炎の患者からは 248 件、9 遺伝子型が検出された(図 2)。なかでも AdV-2 及び AdV-41 は多く検出され、この 6 年間

で AdV-2 は 94 件(37.9%)、AdV-41 は 81 件(32.7%)であり、大きな割合を占めた。感染性胃腸炎の病原ウイルスとして知られているノロウイルスやロタウイルスは季節性がみられるが、AdV は年間を通じて検出された。

咽頭結膜熱の患者からは 46 件、8 遺伝子型が検出された(図 3)。AdV-3 が最も多く、その検出数は全体の 56.5%(26/46)であった。次いで、C 種の AdV-1、AdV-2 及び AdV-5 が検出された。また、比較的夏季に多く検出される傾向がみられた。

流行性角結膜炎の患者からは 47 件、9 遺伝子型が検出された(図 4)。AdV-3 が 15 件(31.9%)、次いで AdV-4、D 種 AdV(AdV-8、AdV-37、AdV-54、AdV-56) が検出された。これまで、我が国では年度により D 種の AdV-8、AdV-19 及び AdV-37 のいずれかによる流行性角結膜炎の流行がみられていた<sup>7)</sup>。しかし近年、新型 AdV である AdV-53、AdV-54 及び AdV-56 による流行性角結膜炎の発生<sup>8),9)</sup>が各地で報告されており、愛知県でもその傾向がみられた。

### 5. 新型ヒトアデノウイルス検出状況(表 3)

新型 AdV はこの 6 年間で 3 遺伝子型、計 20 件検出された。2011 年及び 2014 年に各 1 件検出された AdV-53 は、どちらも PCR 法による遺伝子検出のみであり、臨床診断名

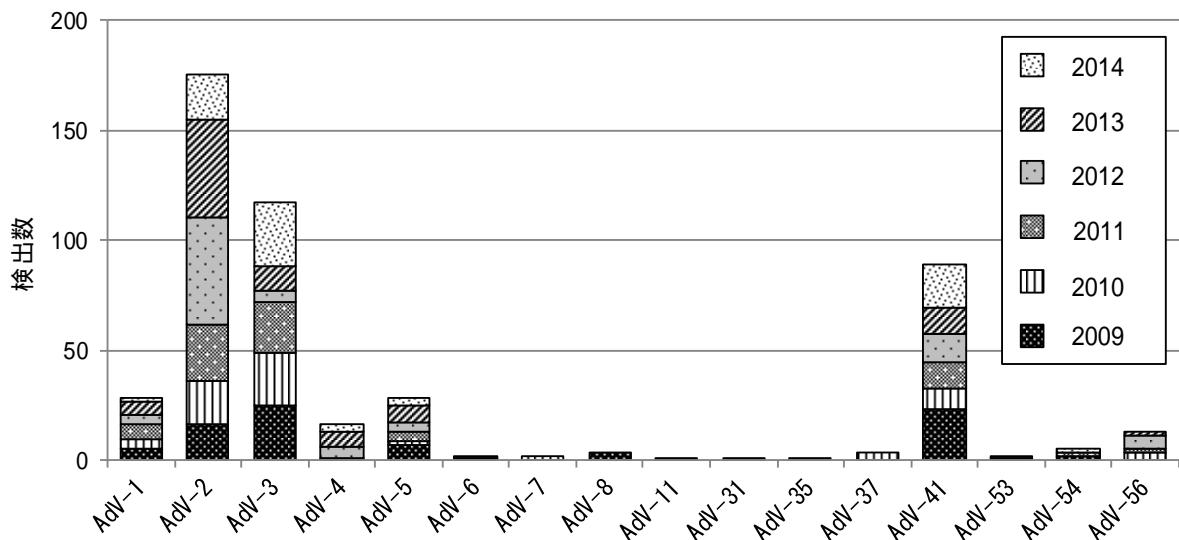


図1 年度別ヒトアデノウイルス検出数

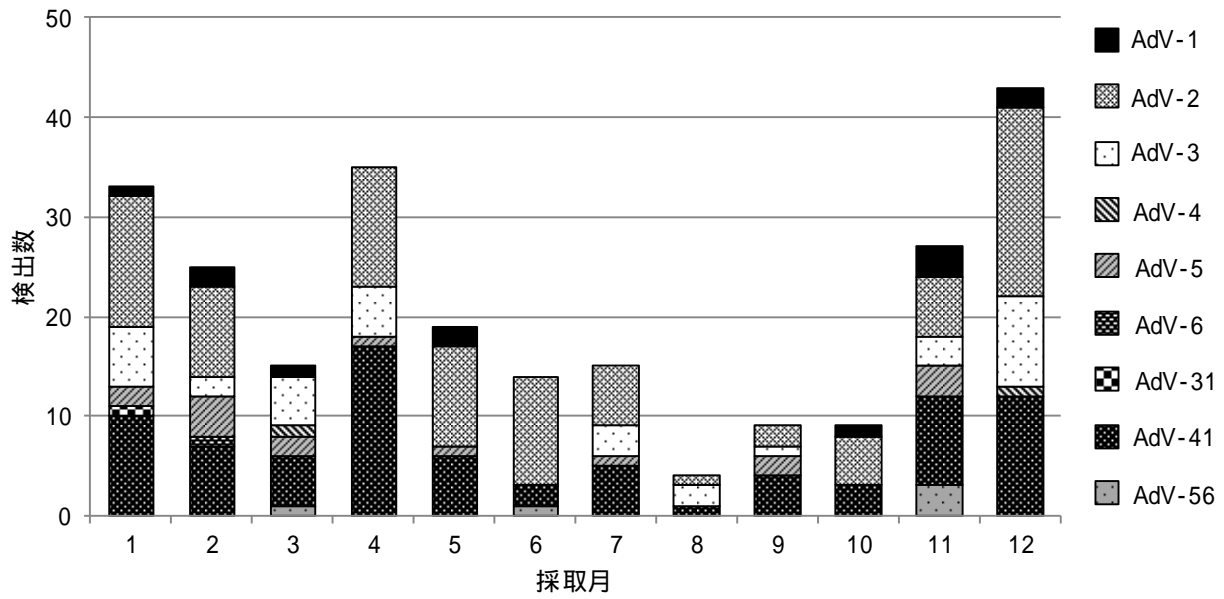


図2 検体採取月別ヒトアデノウイルス検出数（感染性胃腸炎）

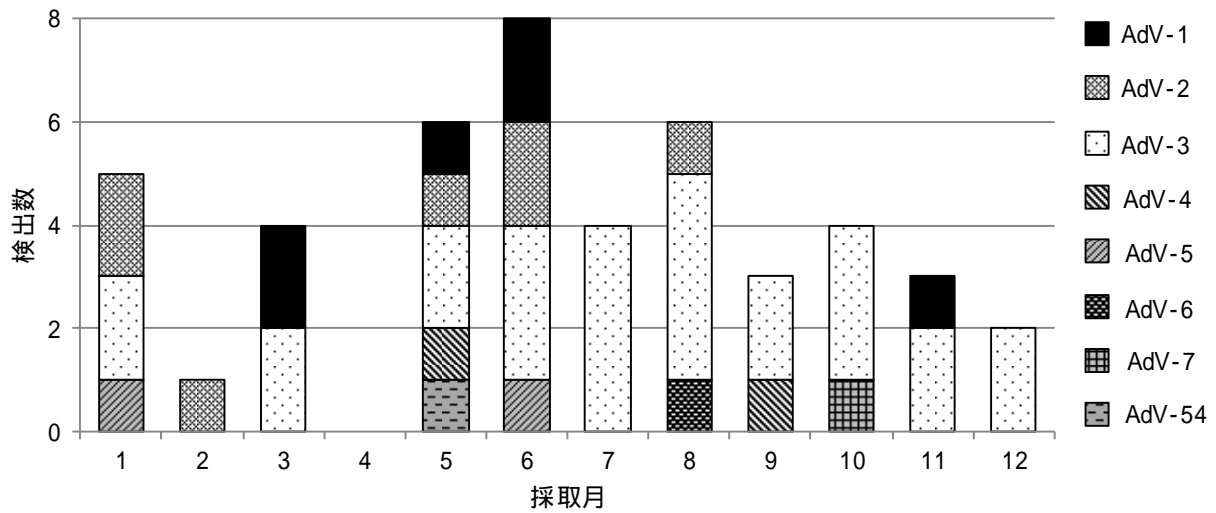


図3 検体採取月別ヒトアデノウイルス検出数（咽頭結膜熱）

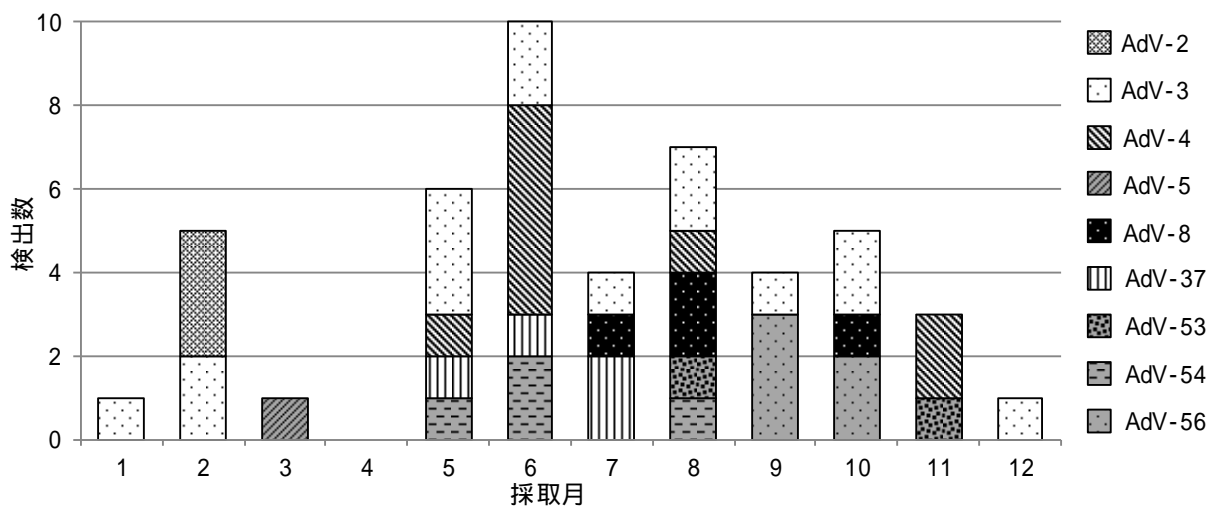


図4 検体採取月別ヒトアデノウイルス検出数（流行性角結膜炎）

表3 新型ヒトアデノウイルス検出数

年	2009	2010	2011	2012	2013	2014
AdV-53			1			1
AdV-54	2		2			1
AdV-56		4 (1)		7 (4)	2	

( ) : ウイルス分離陽性数を再掲

は流行性角結膜炎であった。AdV-54は2009年及び2011年に各2件、2014年に1件検出されたが分離株はなくPCR法による遺伝子検出のみであり、臨床診断名は流行性角結膜炎が4件、咽頭結膜熱が1件であった。AdV-56は2010年に4件、2012年から2013年にかけて9件検出された。臨床診断名は流行性角結膜炎及び感染性胃腸炎が各5件、他にアデノウイルス感染症、急性脳炎であり、さまざまな症状の患者検体から検出された。AdV-56も他のD種AdV同様、分離困難であることが知られているが、13件中4件がHeLa細胞及びRD細胞で、1件がHeLa細胞で分離陽性であった。興味深いことに、分離陽性であった5件はすべて流行性角結膜炎患者（検体：結膜ぬぐい液、年齢：34歳～67歳）由来であり、他の臨床症状を呈した8件（検体：糞便及び咽頭ぬぐい液、年齢：0歳～8歳）はすべて遺伝子検出のみ陽性であった。

### 考 察

2009年4月から2015年3月までに感染症発生動向調査の目的で、名古屋市を除く愛知県内の病原体定点にて採取された検体のうち、臨床症状からAdV感染の疑われた感染症患者的の糞便、咽頭ぬぐい液、吐物、尿など計2,954検体中488件からAdVが検出された。AdV-2、AdV-3、AdV-41が多く検出されたが、近年、国内でも流行のみられている新型AdVも検出され、愛知県にも侵淫している可能性が示唆された。これら新型AdVはヘキソン、ペントンベースならびにファイバーコード領域で遺伝子組換えを起こしたリコンビナントウイルス<sup>10)~12)</sup>である。AdV-53に関しては、さらにヘキソン領域内においても組換えが起こっている<sup>10)</sup>。

ヘキソン領域は中和抗原決定基を含むことから、これまでは遺伝子解析にヘキソン領域が用いられていた。しかし、さまざまなリコンビナントウイルスが出現しており<sup>13)</sup>、新型AdVのアウトブレイク<sup>14)</sup>も報告されていることから、今後はヘキソン領域に加えてペントンベース及びファイバー領域の解析も必要である。最近は、難同定株について過去に遡って遺伝子解析を実施した結果、新型AdVであることが判明した報告<sup>15)~17)</sup>もあり、これら新型AdVは以前から侵淫していた可能性も考えられる。2015年は流行性角結膜炎の患者報告数が例年に比べて多く<sup>18)</sup>、2015年12月現在、患者検体からAdV-54が最も多く検出されている<sup>19)</sup>。今後もAdV検出を継続するとともに、リコンビナントウイルス出現の有無を含めた流行状況把握に努めたい。また、県内にも以前から組換えAdVが侵淫していた可能性も考えられることから、遺伝子検出導入前の分離株についても遺伝子解析を実施し、組換えAdV侵淫状況を検討したい。

### 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、愛知県健康福祉部保健医療局健康対策課、生活衛生課の皆様に深謝いたします。

### 文 献

- 1) Wold WSM and Ison MG: Adenoviruses. Fields Virology Sixth edition (Knipe DM, Howley PM eds), 1732-1767, 2013, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- 2) 国立感染症研究所：病原微生物検出情報（IASR）週別咽頭結膜熱患者からのアデ

- ノウイルス分離・検出報告数、2001～2011年.<http://idsc.nih.go.jp/iasr/prompt/graph/ad2j.gif>
- 3) Kajon AE, Dickson LM, Metzgar D, Houg HS, Lee V, and Tan BH: Outbreak of febrile respiratory illness associated with adenovirus 11a infection in a Singapore military training camp. *Journal of Clinical Microbiology* 48(4): 1438-1441, 2010.
  - 4) 山下照夫、伊藤 雅、川口まり子、田中正大、秦 真美、小林慎一、榮 賢司、皆川洋子: 感染性胃腸炎および流行性角結膜炎患者からのアデノウイルス検出状況－愛知県、病原微生物検出情報 (IASR) 29(4): 96-98, 2008.
  - 5) Shimada Y, Ariga T, Tagawa Y, Aoki K, Ohno S, and Ishiko H: Molecular diagnosis of human adenoviruses D and E by a phylogeny-based classification method using a partial hexon sequence. *Journal of Clinical Microbiology* 42(4): 1577-1584, 2004.
  - 6) Takeuchi S, Itoh N, Uchio E, Aoki K, and Ohno S: Serotyping of adenoviruses on conjunctival scrapings by PCR and sequence analysis. *Journal of Clinical Microbiology* 37(6): 1839-1845, 1999.
  - 7) 国立感染症研究所: 病原微生物検出情報 (IASR) 週別流行性角結膜炎患者からのアデノウイルス等分離・検出報告数、2001～2011年 <http://idsc.nih.go.jp/iasr/prompt/graph/ad3j.gif>
  - 8) 吉富秀亮、前田詠里子、石橋哲也、世良暢之、鬼木隆夫、花岡 希、岡部信彦、藤本嗣人: 眼疾患、角結膜炎の患者からのアデノウイルス56型の検出－福岡県、病原微生物検出情報 (IASR) 32(5): 148, 2011.
  - 9) 木田浩司、濱野雅子、葛谷光隆、溝口嘉範、藤井理津志、村上純子、榊原啓子、出戸康子、松岡宏明、大本佐和子: 結膜炎患者からのヒトアデノウイルス56型の分離－岡山県、病原微生物検出情報 (IASR) 32(10): 293-294, 2011.
  - 10) Aoki K, Ishiko H, Konno T, Shimada Y, Hayashi A, Kaneko H, Ohguchi T, Tagawa Y, Ohno S, and Yamazaki S: Epidemic keratoconjunctivitis due to the novel hexon-chimeric-intermediate 22,37/H8 human adenovirus. *Journal of Clinical Microbiology* 46(10): 3259-3269, 2008.
  - 11) Ishiko H, Shimada Y, Konno T, Hayashi A, Ohguchi T, Tagawa Y, Aoki K, Ohno S, and Yamazaki S: Novel human adenovirus causing nosocomial epidemic keratoconjunctivitis. *Journal of Clinical Microbiology* 46(6): 2002-2008, 2008.
  - 12) Robinson CM, Singh G, Henquell C, Walsh MP, Peigue-Lafeuille H, Seto D, Jones MS, Dyer DW, Chodosh J: Computational analysis and identification of an emergent human adenovirus pathogen implicated in a respiratory fatality. *Virology* 409(2): 141-147, 2011.
  - 13) Matsushima Y, Shimizu H, Phan TG and Ushijima H: Genomic characterization of a novel human adenovirus type 31 recombinant in the hexon gene. *Journal of General Virology* 92: 2770-2775, 2011.
  - 14) Huang G, Yao W, Yu W, Mao L, Sun H, Yao W, Tian J, Wang L, Bo Z, Zhu Z, Zhang Y, Zhao Z, Xu W: Outbreak of epidemic keratoconjunctivitis caused by human adenovirus Type 56, China, 2012. *PLoS One* 9(10): 1-10, 2014.
  - 15) 森川佐依子、廣井 聡、加瀬哲男、花岡希、小長谷昌未、大石和徳、藤本嗣人: 過去の分離株がヒトアデノウイルス 57型 (HAdV57) と判明した 1 例－大阪府、病原微生物検出情報 (IASR) 35(11): 278, 2014.
  - 16) 中村雅子、平野映子、小和田和誠、石畝史、望月典郎、藤本嗣人、花岡 希、谷口清州、岡部信彦、山岸善也: 2004～2009年の6年間における流行性角結膜炎患者

- 113 名からのアデノウイルス検出 - 福井県, 病原微生物検出情報 (IASR) 31(8): 237-238, 2010.
- 17) Hiroi S, Morikawa S, Takahashi K, Komano J, and Kase T: Molecular epidemiology of human adenoviruses D associated with epidemic keratoconjunctivitis in Osaka, Japan, 2001-2010. Japanese Journal of Infectious Diseases 66: 436-438, 2013.
- 18) 国立感染症研究所: 感染症発生動向調査週報 (IDWR) 2015 年第 43 週 定点把握疾患の報告の過去 5 年間の同時期との比較 <http://www0.nih.go.jp/niid/idsc/idwr/IDWR2015/idwr2015-43.pdf>
- 19) 国立感染症研究所: 病原微生物検出情報 (IASR) 週別流行性角結膜炎患者からのアデノウイルス等分離・検出報告数、2011~2015 年. <http://www0.nih.go.jp/niid/idsc/iasr/Byogentai/Pdf/data29j.pdf>

# Detection and genotyping of human adenoviruses in Aichi Prefecture, 2009-2015

Emi Hirose, Miyabi Ito, Hirokazu Adachi, Ayano Onouchi, Noriko Nakamura,  
Mami Hata, Yoshihiro Yasui, Shinichi Kobayashi, Teruo Yamashita,  
Hiroko Minagawa

Human adenoviruses (AdV) belong to the genus *Mastadenovirus* of the family *Adenoviridae* and infect billions of people worldwide, causing various diseases, including pharyngoconjunctival fever (PCF), epidemic keratoconjunctivitis (EKC), respiratory infection, gastroenteritis, and hemorrhagic cystitis. From April 2009 to March 2015, 2,954 samples *i.e.*, stools, throat swabs, vomits, and urines obtained from 2,515 patients diagnosed with infectious diseases at 31 pediatric 'sentinel' clinics in Aichi Prefecture, were tested for AdV by virus isolation on cultured cells and PCR. PCR products were analyzed by sequencing for partial hexon region, and the virus isolates were identified by neutralization test. AdV was detected from 468 patients with gastroenteritis (n=252), upper respiratory illnesses (n=50), EKC (n=47), PCF (n=45), or others (n=74). Of 488 AdV detected, 175 (35.9%) were typed as AdV-2, 117 (24.0%) as AdV-3, 89 (18.2%) as AdV-41. Further, 2 were identified as AdV-53, 5 were AdV-54, and 13 were AdV-56. In 20 novel AdV-positive samples, 11 were AdV from EKC patients.

**Key words:** human adenovirus, surveillance, virus isolation, genotyping

## 調 査 研 究

# 愛知県におけるヒト糞便からの extended-spectrum $\beta$ -lactamase 遺伝子保有大腸菌の分離状況

田中佑三世、山田和弘、鈴木匡弘、松本昌門、山下照夫、皆川洋子

### 要 約

2010年から2015年に愛知県で食中毒関連事例検体から分離した大腸菌676株についてセファゾリン添加マッコンキー(CEZ-MaC)培地を用いてESBL(extended-spectrum  $\beta$ -lactamase)産生大腸菌のスクリーニングを行い、76株(11.2%)を得た。これら76株についてPCRにて $bla_{CTX-M}$ 遺伝子検出を行ったところ、30株(39.5%)が陽性となり、その内訳は $bla_{CTX-M-1}$  group 7株、 $bla_{CTX-M-9}$  group 23株であり、 $bla_{CTX-M-2}$  group 遺伝子は検出されなかった。また、CEZ-MaC培地発育株が最も多く検出されたO血清型はO25の13株で $bla_{CTX-M-9}$  group 保有株が8株、残り5株は $bla_{CTX-M}$  遺伝子陰性であった。 $bla_{CTX-M}$  遺伝子陽性30株のPFGE(pulsed-field gel electrophoresis)解析の結果は3株からなるクラスターが2個、2株からなるクラスターが1個認められたのみで、陽性株に共通する遺伝子の相同性は認められなかった。

キーワード: *Escherichia coli*, ESBL,  $bla_{CTX-M}$

### 序 文

基質特異性拡張型  $\beta$ -ラクタマーゼ(extended-spectrum  $\beta$ -lactamase: ESBL)はクラスA  $\beta$ -ラクタマーゼの遺伝子に変異が起こり、セフトキシム(CTX)やセフトジジム(CAZ)などの第三世代セファロスポリン系抗生物質を含む種々の  $\beta$ -ラクタム系抗生物質を分解する能力を獲得したものである。1980年代前半に登場した第三世代セファロスポリン系抗生物質は、わが国においても広く使用されており、ESBL産生菌は病院内だけでなく市中からも検出され、特に大腸菌において問題となっている<sup>1, 2)</sup>。日本で分離されるESBL産生大腸菌の主流はCTX-M型  $\beta$ -ラクタマーゼ(CTX-M)産生菌であり、TEM型やSHV型といった他の型のESBL

産生菌に比べ市中からも高頻度に分離され、環境をはじめ家畜やヒトに広く分布するとされている<sup>3, 4)</sup>。また年代によって検出される血清型に変化が認められるのみならず血清型の株同士を比較したところ同一血清型においても多様性が報告されている<sup>5)</sup>。そこで、愛知県において採取された糞便由来大腸菌についてセファゾリン添加マッコンキー(CEZ-MaC)培地を用いてESBL産生大腸菌のスクリーニングを行った。さらにCEZ-MaC培地に発育した大腸菌についてO血清型別、PCRによるESBL遺伝子の検出、PFGE(pulsed-field gel electrophoresis)を行い、ヒト糞便中のESBL産生大腸菌の血清学的、遺伝学的特徴を調べ、ESBL遺伝子のうち $bla_{CTX-M}$ 型保有大腸菌の動向を把握した。



表 1 CEZ-MaC 培地発育大腸菌 76 株の O 血清型と ESBL 遺伝子型

O 血清型	1	6	15	18	25	111	115	125	153	169	86a	型別不能	総計
<i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub> group	1										1	5	7
<i>bla</i> <sub>CTX-M-9</sub> group	2		1	1	8				1	1		9	23
<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> 遺伝子陰性	1	5		2	5	1	1	1				30	46
総計	4	5	1	3	13	1	1	1	1	1	1	44	76

### 材料と方法

供試大腸菌：2010年7月から2015年4月に食中毒関連69事例由来のヒト糞便をSS及びDHL培地に接種し、35℃で一夜培養した。両培地に発育した赤色コロニーについてその生化学的性状を調べ、大腸菌と同一とされた676株を用いた。

ESBL産生大腸菌のスクリーニング：供試大腸菌676株をセファゾリン添加(4 µg/mL)マッコンキー(CEZ-MaC)培地に塗抹し、35℃で一夜培養し、発育の有無を調べた。

O血清型別試験：CEZ-MaC培地に発育した76株について病原大腸菌免疫抗血清「生研」(デンカ生研)を用い添付文書に従いO血清型を判定した。

ESBL遺伝子型別：Tris-EDTA buffer (pH8.0)100 µLに供試菌をMcFarland 2程度になるように懸濁し、95℃で10分間加熱後13,000 rpmで1分間遠心した上清をテンプレートとして、既報に従いPCR法により実施した<sup>4)</sup>。プライマーには、既知の*bla*<sub>CTX-M-1</sub>、*bla*<sub>CTX-M-2</sub>及び*bla*<sub>CTX-M-9</sub>各group遺伝子検出プライマーを用いた。

PFGE法：供試菌をLuria-Bertani(LB)培地に接種し、37℃で一晩振盪培養したものをCertified™ Megabase Agarose( Bio-Rad, USA) (0.5%)に直接包埋してプラグを作成した。Proteinaseによる溶菌処理及び洗浄の後、各プラグのDNAを30 Uの*Xba*を用い37℃で一晩処理して切断した。PFGEはCHEF DR (Bio-Rad, USA)を用い、0.5× Tris-borate-EDTA buffer (TBE)に、14、内角120°で電圧6V/cm、スイッチングタイム2.2秒から54.2秒、20時間の泳動を行った。サイズマーカーには、*Salmonella enterica* serovar Braenderup H9812を*Xba*で処理したものをを用いた。泳動後のゲルは

臭化エチジウム(0.5 µg/mL)で染色してトランスイルミネーター下で可視化した<sup>6)</sup>。泳動パターンのクラスター解析にはBioNumerics version 6.1(Applied Maths, Belgium)を用い、optimizationとposition toleranceを両方とも1%とし、相同性が85%以上の部分を1つのクラスターとみなした<sup>7)</sup>。

### 結果

#### 1. ヒト糞便からのESBL産生大腸菌スクリーニングとO血清型別

ヒト糞便から検出された大腸菌678株についてCEZ-MaC培地を用いたスクリーニングを行った結果、発育がみられたのは76株(11.2%)であった。これら76株のうちO血清型が決定されたのは32株であり、型別不能の株が44株(57.9%)と過半数を占め、決定された血清型の内訳はO25が13株(17.1%)と最も多く、次いでO6が5株分離された。(表1)。

#### 2. CEZ-MaC培地発育大腸菌76株のESBL遺伝子保有状況と遺伝子型別

CEZ-MaC培地に発育がみられた大腸菌76株について*bla*<sub>CTX-M</sub> group遺伝子の保有状況を調べた。その結果、30株(39.5%)が陽性となった。また、*bla*<sub>CTX-M</sub> group遺伝子型の内訳は*bla*<sub>CTX-M-1</sub> group 7株、*bla*<sub>CTX-M-9</sub> group 23株であり、今回*bla*<sub>CTX-M-2</sub> group遺伝子は検出されなかった。また、異なる*bla*<sub>CTX-M</sub>遺伝子型を複数保有する大腸菌は検出されなかった。

#### 3. CEZ-MaC培地発育大腸菌76株のO血清型とESBL遺伝子型

CEZ-MaC培地発育大腸菌76株のO血清型とESBL遺伝子型を表1に示した。最も多く検出された13株のO25では*bla*<sub>CTX-M-9</sub>

group が 8 株で、残り 5 株は *bla*<sub>CTX-M</sub> 遺伝子陰性であった。5 株の 06 は全て *bla*<sub>CTX-M</sub> 遺伝子陰性であった。0 型別不能の 44 株は *bla*<sub>CTX-M-9</sub> group が 9 株、*bla*<sub>CTX-M-1</sub> group が 5 株で、残り 30 株は *bla*<sub>CTX-M</sub> 遺伝子陰性であった。

#### 4. *bla*<sub>CTX-M</sub> 遺伝子陽性大腸菌の PFGE 解析

*bla*<sub>CTX-M</sub> 遺伝子が陽性であった全 30 株の PFGE 法によるクラスター解析の結果、3 株からなるクラスターが 2 個及び 2 株からなるクラスターが 1 個認められた(図 1)。3 株からなるクラスターの内訳はいずれも *bla*<sub>CTX-M-9</sub> group を保有する 015、025、0 型別不能の 3 株(クラスター 1)、及びいずれも *bla*<sub>CTX-M-9</sub> group を保有する 025 が 1 株、0 型別不能が 2 株(クラスター 3)であった(図 1)。また、2 株からなるクラスターはいずれも *bla*<sub>CTX-M-9</sub> group を保有する 025 2 株(クラスター 2)から成るものであった。025 同士でクラスターを形成していたのはこの 2 株のみであった。またクラスターを形成した株は全て *bla*<sub>CTX-M-9</sub> group 遺伝子保有株であった。その他 22 株には何れもクラス

ター形成に至る相同性は認められなかった(図 1)。

#### 考 察

2010 年から 2015 年に愛知県の食中毒関連ヒト糞便から検出された 678 株の大腸菌のうち *bla*<sub>CTX-M</sub> 遺伝子陽性であった 30 株からは、*bla*<sub>CTX-M-9</sub> group 遺伝子が 76.7% (23/30)、*bla*<sub>CTX-M-1</sub> group 遺伝子が 23.3% (7/30) 検出され、*bla*<sub>CTX-M-9</sub> group 遺伝子と *bla*<sub>CTX-M-1</sub> group 遺伝子の保有比率はおよそ 7:2 であった。一方 *bla*<sub>CTX-M-2</sub> group 遺伝子は検出されなかった。Shibata が行った 2001 年から 2003 年に全国の病院から検出された大腸菌 218 株の解析結果では *bla*<sub>CTX-M-9</sub> group 遺伝子が 40.8%、*bla*<sub>CTX-M-1</sub> group 遺伝子が 15.1%、*bla*<sub>CTX-M-2</sub> group 遺伝子が 21.1%<sup>4)</sup>と報告されており、*bla*<sub>CTX-M-9</sub> group 遺伝子と *bla*<sub>CTX-M-1</sub> group 遺伝子の保有比率はおよそ 8:3 であった<sup>4)</sup>。我々の研究では *bla*<sub>CTX-M-9</sub> group 遺伝子が占める割合が高くなっていった。*bla*<sub>CTX-M-2</sub> group 遺伝子の保

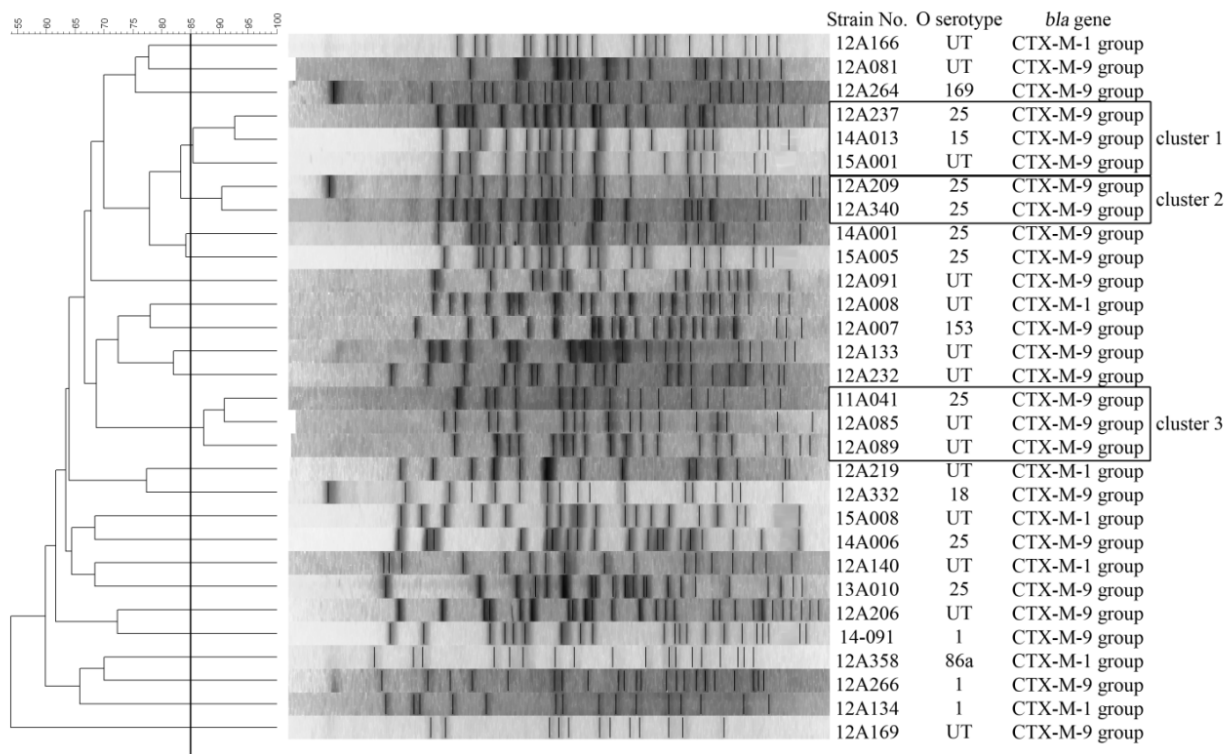


図 1 *bla*<sub>CTX-M</sub> 遺伝子陽性大腸菌全 30 株の PFGE 法によるクラスター解析

有率については調査が望まれる。国内の病院から報告された ESBL 産生菌の検出率 6.5% (20/310) と比較すると今回の検出率は 4.4% (30/678) と低かったので市中の ESBL 産生菌の保有率は医療機関と比較すると低い可能性が考えられるが、統計的に有意といえる数のデータがないことからさらなる調査が必要である<sup>8)</sup>。

今回、ESBL 産生大腸菌スクリーニングで検出された大腸菌 76 株のうち半数以上 (60.5%) が *bla*<sub>CTX-M</sub> 遺伝子の 3 つのグループに型別されなかった。今回スクリーニングに用いた CEZ はセファロスポリナーゼによって分解されることから、CTX-M を保有しない大腸菌の多くはセファロスポリナーゼ遺伝子を保有している可能性が考えられた。

*bla*<sub>CTX-M</sub> 遺伝子を保有する大腸菌には O 血清型 25b (O25 は a、b 二つのサブタイプに分かれる。) sequence type 131 (ST131) が多いとされている<sup>9, 10)</sup>。今回の結果からも *bla*<sub>CTX-M-9</sub> group 保有大腸菌の多くが (8/23) O25 であった。大腸菌 O25 は健常者からも比較的頻繁に検出されることから、今後も O25 の動向には注意を払う必要がある。また、8 株の *bla*<sub>CTX-M-9</sub> group 遺伝子保有 O25 について PFGE によるクラスター解析を行った結果、2 株からなるクラスターが 1 個認められたが、残りの 6 株はクラスター形成が認められず、菌株間の相同性は低かった (図 1)。このことから、市中で伝播しているのは単一の株ではないと言える。

*bla*<sub>CTX-M-9</sub> group 遺伝子は多くの場合プラスミド上に存在しており、比較的容易に周囲の薬剤感受性大腸菌に伝播されると考えられる。今回の結果においても同じ *bla*<sub>CTX-M</sub> 遺伝子をもつ株が多様な PFGE 型を示した。このことから、市中で流行している ESBL 産生大腸菌の多くはプラスミドを介して遺伝的背景の異なる薬剤感受性大腸菌に *bla*<sub>CTX-M</sub> 遺伝子が伝播することによって生じたと推察された。

今回の結果から、市中での *bla*<sub>CTX-M</sub> 遺伝子の拡散が明らかとなった。*bla*<sub>CTX-M</sub> 遺伝子が病原性の高い大腸菌に拡散する危険性もあるので、今後も継時的に疫学分析を行

う必要があると考えられる。

#### 文 献

- 1) 安永さおり, 寺田さと子, 早川泰江, 加藤千景, 鈴木匡弘, 山田和弘, 柴田尚宏: 同一病棟で長期に渡り分離された CTX-M-14 型 ESBLs 産生 *Escherichia coli* の検討. 感染症学雑誌 85(4): 347-354, 2011.
- 2) Shi H, Sun F, Chen J, Ou Q, Feng W, Yong X, Xia P: Epidemiology of CTX-M-type extended spectrum beta-lactamase (ESBL) producing nosocomial-*Escherichia coli* infection in China. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials 14:4. doi: 10.1186/s12941-015-0063-7(2015)
- 3) Overdeest I, Willemsen I, Rijnsburger M, Eustace A, Xu L, Hawkey P, Heck M, Savelkoul P, Vandembroucke-Grauls C, van der Zwaluw K, Huijsdens X, Kluytmans J: Extended-spectrum -lactamase genes of *Escherichia coli* in chicken meat and humans, the Netherland. Emerging Infectious Diseases 17(7): 1216-1222, 2011.
- 4) Shibata N, Kurokawa H, Doi Y, Yagi T, Yamane K, Wachino J, Suzuki S, Kimura K, Ishikawa S, Kato H, Ozawa Y, Shibayama K, Kai K, Kondo T, Arakawa Y: PCR classification of CTX-M-type beta-lactamase genes identified in clinically isolated gram-negative bacilli in Japan. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 50(2):791-795, 2006.
- 5) Konishi N, Obata H, Monma C, Nakama A, Kai A, Tsuji T: Bacteriological and epidemiological characteristics of enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated in Tokyo, Japan, between 1966 and 2009. Journal of Clinical Microbiology 49(9):3348-3351, 2011.
- 6) Matsumoto M, Suzuki M, Takahashi M,

- Hirose K, Minagawa H, Ohta M: Identification and epidemiological description of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 strains producing low amounts of Shiga toxin 2 in Aichi Prefecture, Japan. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 61(6):442-445, 2008.
- 7) Zhang H, Zhou Y, Guo S, Chang W: High prevalence and risk factors of fecal carriage of CTX-M type extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae from healthy rural residents of Taian, China. *Frontiers in Microbiology* 6:239. doi:10.3389/fmicb(2015)
- 8) 吉川耕平、長川隼也、園田美代子、嶋谷泰明、竹田真未、木下幸保：糞便中における ESBL と MBL 産生腸内細菌科菌の検出状況。 *日本臨床微生物学雑誌* 24(1): 9-16, 2014.
- 9) Zhong YM, Liu WE, Liang XH, Li YM, Jian ZJ, Hawkey PM: Emergence and spread of O16-ST131 and O25b-ST131 clones among faecal CTX-M-producing *Escherichia coli* in healthy individuals in Hunan Province, China, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 70(8):2223-2227, 2015.
- 10) Matsumura Y, Yamamoto M, Nagao M, Ito Y, Takakura S, Ichiyama S, for the Kyoto-Shiga Clinical Microbiology Study Group: Association of fluoroquinolone resistance, virulence genes, and IncF plasmids with extended-spectrum-β-lactamase-producing *Escherichia coli* sequence type 131 (ST131) and ST405 clonal groups. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 57(10):4736-4742, 2013.

# Prevalence of ESBL gene-carrying *Escherichia coli* in human stools in Aichi Prefecture, Japan

Yumiyo Tanaka, Kazuhiro Yamada, Masahiro Suzuki, Masakado Matsumoto,  
Teruo Yamashita, Hiroko Minagawa

To reveal prevalence of ESBL gene-carrying *Escherichia coli* in Aichi Prefecture, Japan, we screened for 676 isolates of *E. coli* from food-borne outbreak-related human stools between 2010 and 2015 using MacConkey agar containing cefazolin (CTX-MaC). As a result, 76 isolates (11.2 %) grew on the medium. PCR-based classification of *bla*<sub>CTX-M-1, 2 and 9</sub> groups was as follows. Of the 76 isolates tested, 23 (3.4 %) were *bla*<sub>CTX-M-9</sub> group and seven (1.0 %) were *bla*<sub>CTX-M-1</sub> group. The rest of 46 did not harbor any *bla*<sub>CTX-M</sub> group genes. O25 was found to be the most frequent O serotype. Eight isolates with *bla*<sub>CTX-M-9</sub> group gene and five without *bla*<sub>CTX-M</sub> group gene were grouped as O25. PFGE analysis revealed that genetic homogeneity among the 30 isolates harboring *bla*<sub>CTX-M-1 and 9</sub> groups was not significant.

Key words; *Escherichia coli*, ESBL, *bla*<sub>CTX-M</sub>

## 調 査 研 究

# 愛知県における危険ドラッグ製品の分析調査

棚橋高志、安藤麗香、大野春香、猪飼誉友、皆川洋子

### 要 旨

近年危険ドラッグと呼ばれる製品の流通とその乱用が大きな社会問題となっている。これによる健康被害を防止するため、平成 25(2013)年度から平成 27 年度まで県内の販売施設及びインターネットで試買された危険ドラッグの疑いのある製品について、指定薬物等規制成分の含有状況を分析した。その結果 147 検体中 132 検体から 31 種類の薬物等が検出された。これらのうち、試買時に指定薬物として規制されていたのは XLR-11、AB-FUBINACA、PV9 の 3 種類 9 検体のみであった。検出成分について濃度を測定したところ、1 成分につき 1 製品あたり平均 113.2 mg/g(mL)であった。製品の性状別では、粉末試料が平均 530.8 mg/g と高かった。

キーワード：危険ドラッグ、LC-Q/TOF-MS、GC-MS、LC-PDA、指定薬物

### 序 文

麻薬、覚せい剤、大麻等と類似の化学構造、作用を持つ化学物質を含有する危険ドラッグ(若しくは「脱法ドラッグ」と呼ばれる製品の流通とその乱用が平成 10 年頃より大都市を中心に全国で大きな社会問題となっている。国は平成 18 年に「医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律」(旧薬事法、以下「医薬品医療機器等法」と言う。)を改正して指定薬物制度を導入し規制を図ってきた。しかし最近の事件・事故の多発を受け、一定の基本化学構造を持つ成分を一斉に指定する「包括規制」により指定薬物数を大幅に増やすなど、規制を強化している。愛知県においても平成 23 年頃より危険ドラッグによると見られる事件・事故等が急増した。県では薬物乱用による健康被害防止のため、平成 24 年 10 月「薬物の濫用の防止に関する条例」を制定して、医薬品医療機器等法で未指定の成分を知事指定薬物として独自に規制し、また県民への啓発や販売

施設等への監視体制の強化を図っている。その一環として当所に、LC-Q/TOF-MS (Liquid chromatograph Time-of-flight mass spectrometer)、GC-MS (Gas chromatograph Mass spectrometer)、LC-PDA (Liquid chromatograph Photodiode array detector) の 3 台の分析装置が新たに導入され、平成 25 年度に危険ドラッグ製品の検査を開始した。本報では平成 25 年 4 月から平成 27 年 8 月までに実施した、危険ドラッグと疑われる製品の分析結果について報告する<sup>1~3)</sup>。

### 試料と方法

#### 1. 試料

平成 25 年 4 月から平成 27 年 9 月に愛知県内の販売施設又はインターネットで県健康福祉部保健医療局医薬安全課により試買された危険ドラッグと疑われる製品 147 検体を試料とした。年度別試買数は平成 25 年度 50 検体、平成 26 年度 81 検体、平成 27 年度 16 検体であった。

## 2. 標準品及び試薬等

標準品は Cayman Chemical、LGC Standard、Cerilliant、Sigma-Aldrich、R&D、東京化成工業社製のいずれかを用いた。XLR-11 は国立医薬品食品衛生研究所からの分与品を用いた。各標準品にメタノールを加えて1又は0.5 mg/mL 標準原液とし、メタノールで適宜希釈して、標準溶液とした。

アセトニトリル、メタノール、ギ酸及びギ酸アンモニウムは LC/MS 用（和光純薬工業製）を用いた。

## 3. 試験溶液の調製

乾燥植物片は適量を取り、フィンガーマッシャーで粉砕して約 50 mg を精密に秤取した。粉末試料は約 50 mg を精密に秤取し、液体試料は 50  $\mu$ L を正確に秤取した。各試料にメタノールを加えて 5 mL に定容し、20 分間超音波抽出した。抽出液をウルトラフリーCL（メルクミリポア社製）を用いて 3000 rpm、10 分間遠心ろ過し、ろ液を試料原液とした。試料原液をメタノールで適宜希釈して試験溶液とした<sup>4,5)</sup>。

## 4. 分析方法

試験溶液を LC-Q/TOF-MS、GC-MS、LC-PDA に注入し測定を行った。各測定機器から得られるピーク保持時間、精密質量、マススペクトル、UV スペクトル等から製品中の含有成分を推定した。推定された成分の標準溶液を試験溶液とともに各測定機器で再測定し、両者の測定データの一致を確認することにより成分を同定するとともに、ピーク面積から定量を行った<sup>6,7)</sup>。

## 5. 測定条件

### 1) LC-Q/TOF-MS

装置：アジレント Agilent6530 システム  
カラム：ACQUITY UPLC HSS T3 (2.1×100 mm、粒子径 1.8  $\mu$ m) + Van Guard column (2.1×5 mm、粒子径 1.8  $\mu$ m) Waters 社製

移動相：A 0.1%ギ酸、B 0.1%ギ酸アセトニトリル

①A:B 95:5-80:20(20 min)-20:80(30 min、5 min hold)

②A:B 65:35(4 min hold)-35:65(4 min)-25:75(16 min)-10:90(17 min、5 min hold)

流速:0.3 mL/min

カラム温度:40 °C

注入量:1  $\mu$ L

質量分析条件:イオン化法 ESI、ポジティブモード、キャピラリー電圧 3500 V、フラグメンター電圧 150 V

### 2) GC-MS

装置：島津製作所 GCMS-TQ8030

カラム：Rxi-5SilMS(0.25 mm×30 m、膜厚 0.25  $\mu$ m)Restek 社製

①カラム温度：80 °C(1 min hold) - 5 °C/min - 190 °C(15 min hold) - 10 °C/min - 310 °C(15 min hold)

注入口温度：200 °C

②カラム温度：200 °C(1 min hold) - 5 °C/min - 310 °C(7 min hold) 注入口温度：250 °C

キャリアーガス：He、0.7 mL/min

注入量:1  $\mu$ L スプリットレス

検出器温度：280 °C

イオン化法：EI

### 3) LC-PDA

装置：ウォーターズ H-Class PDA システム

①カラム：Atlantis T3 (2.1×150 mm、5  $\mu$ m)Waters 社製

移動相：A 10mM ギ酸アンモニウム緩衝液(pH3.0)、B アセトニトリル  
A:B 90:10(0 min)-80:20(50 min)-30:70(60 min、15 min hold)

②カラム：Xbridge C18 (2.1×150 mm、3.5  $\mu$ m)Waters 社製

移動相：A 0.1%ギ酸、B 0.1%ギ酸アセトニトリル/メタノール  
(60:40)

A:B 50:50 (0 min) - 10:90 (30 min、5 min hold)

流速：0.3 mL/min

カラム温度：40 °C

注入量：1  $\mu$ L

検出波長：190-500 nm

表1 検体の性状別内訳

性状	年度別検体数									合計	検出 検体数	違反 検体数
	H25				H26				H27			
	4月	7月	3月	計	7月	9月	1月	計	8月			
乾燥植物片	10	21	14	45	59	4	10	73	4	122	115	7
粉末	1	1		2	4	2		6	5	13	11	2
液体	1	2		3	2			2	7	12	6	0
合計	12	24	14	50	65	6	10	81	16	147	132	9

結果及び考察

1. 検体中の規制成分等検出状況

147 検体について、指定薬物等の分析を実施した。検体の性状別内訳（表 1）は、乾燥植物片 122 検体、粉末試料 13 検体、液体試料 12 検体であった。分析の結果、132 検体（89.8%）から、31 種類の薬物等が検出された。検出状況を表 2、化学構造式を図 1 に示したが、規制成分は 27 種類で、その系統別内訳は、合成カンナビノイド 15 種類、カチノン系 7 種類、フェネチルアミン系 1 種類、その他 4 種類であった。また規制関連成分が 2 種類（LY2183240 及び LY2183240 2' -isomer）、その他に規制対象外の成分として様々な食品に含まれ弱い中枢興奮作用があるカフェイン及び香料として汎用されるバニリンが検出された。成分ごとの検出検体数は、AB-CHMINACA が 36 検体（24.5%）で最も多く、以下 Diphenidine 35 検体（23.8%）、5F-QUPIC 21 検体（14.3%）の順で、系統別では合成カンナビノイドが 115 検体（78.2%）と最も多くの製品から検出された。しかし、試買時に医薬品医療機器等法で指定薬物として規制されていたのは、XLR-11、AB-FUBINACA、PV9 の 3 種類 9 検体のみであり、その他のほとんどの検出成分は試買後に指定薬物として規制対象となった。なお、検出成分のうち XLR-11、5F-QUPIC は現在麻薬に指定されている。

試買時期と検出成分の推移をみると、平成 25 年 4 月及び 7 月に試買した製品からは、違反となった XLR-11 の他、5F-QUPIC 等の合成カンナビノイド 7 種類、MPHP、 $\alpha$ -PHPP 等のカチノン系 5 種類など現在全国的

に検出数の多い 2 系統の様々な成分が検出された。しかし、これらの検出成分が指定薬物として規制された後、平成 26 年 3 月に試買した製品からは、違反となった AB-FUBINACA 以外にそれまで検出されていた規制成分は検出されず、FUB-PB-22、5-Fluoro-AB-PINACA 等新たな未規制の合成カンナビノイドが検出された。平成 26 年 7 月及び 9 月に試買された製品からは、FDU-PB-22、AB-CHIMINACA、NM2201 等の新たな合成カンナビノイドの他、これまでの検出成分と系統の異なる Diphenidine、Methoxphenidine 等が検出された。平成 27 年 1 月に試買された製品からは、コカインと類似の作用があるが試買時未規制であった Dimethocaine が一部から検出された。平成 27 年 8 月にはインターネット上で販売されていた製品 16 検体を検査したが、カフェイン、バニリンが一部から検出されたのみで、指定薬物等規制成分及びその類似化合物等強い中枢神経作用が疑われる成分は検出されなかった。これらの結果より、販売業者は法違反を免れるため、規制情報をいち早く入手するなどして、新しい未規制の成分を含有する製品を販売しているという傾向が顕著に認められた<sup>1,2)</sup>。

2. 複数成分を検出した検体

2 種類以上の規制成分が検出された検体は 47 検体（32.0%）あり、うち 5 検体からは 3 種類、1 検体から 4 種類の成分が検出された（表 3）。複数成分で最も検体数が多かったのは AB-CHIMINACA と Diphenidine の組合せで 17 検体、次いで 5F-QUPIC と NNE1、及び FDU-PB-22 と Diphenidine の組合せ各



表2 規制成分等の検出状況

検出成分	検出 検体数 (違反数)	性状別内訳			濃度 (mg/g (mL))	
		乾燥 植物片	粉末	液体	平均	範囲
合成カンナビノイド						
AB-CHMINACA	36	36			6.1	1.8~13.8
5F-QUPIC	21	21			87	15.5~154.4
NM2201	15	15			133.7	0.2~154.4
FDU-PB-22	9	9			45.7	20.8~82.7
5-Fluoro-AB-PINACA	7	7			133	89.9~150.5
FUB-PB-22	7	7			102.5	0.3~178.7
NNE1	7	7			74.9	10.1~111.0
XLR-11	5(5)	5			48	0.1~95.2
5-Fluoro-AMB	2	2			87.2	73.3~101.2
5F-ADB	1	1			1.7	
5F-NNE1	1	1			79.7	
AB-FUBINACA	1(1)	1			12.6	
QUCHIC	1	1			88.2	
QUPIC	1	1			80.3	
XLR-12	1	1			237.7	
カチノン系						
MPHP	6	5	1		148.2	32.7~342.5
PV9	3(3)	1	2		0.7	Tr~0.8
$\alpha$ -PHPP	3	2	1		401.1	100.0~986.2
4-MeO- $\alpha$ -PVP	1			1	43.8	
4-Methylbuphedrone	1			1	12.7	
$\alpha$ -Ethylaminopentiophenone	1			1	38.5	
$\alpha$ -PHP	1	1			63.8	
フェネチルアミン系						
2FMP	1			1	36.1	
その他						
Diphenidine	35	31	3	1	176.6	0.4~948.4
Dimethocaine	3	3			150.6	97.9~188.7
3-MeO-PCP	2	2			11	9.7~12.4
Methoxphenidine	2		2		319.2	273.8~364.6
合成カンナビノイド関連						
LY2183240	1	1			38.9	
LY2183240 2'-isomer	1	1			0.6	
規制外						
Caffeine	10	4	4	2	385.7	560.4~180.3
Vanillin	2			2	70.6	66.3~74.9

合成カンナビノイド

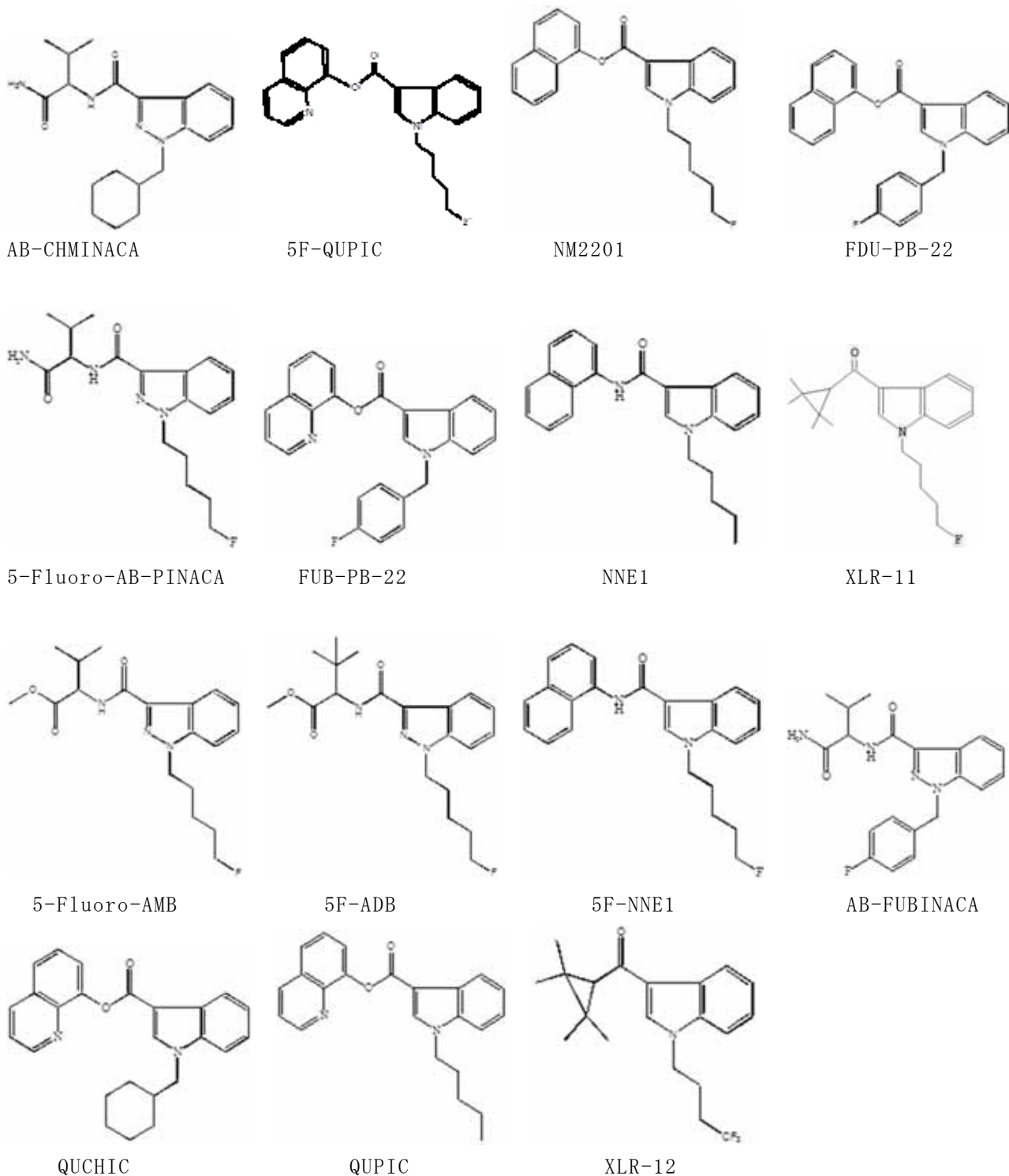
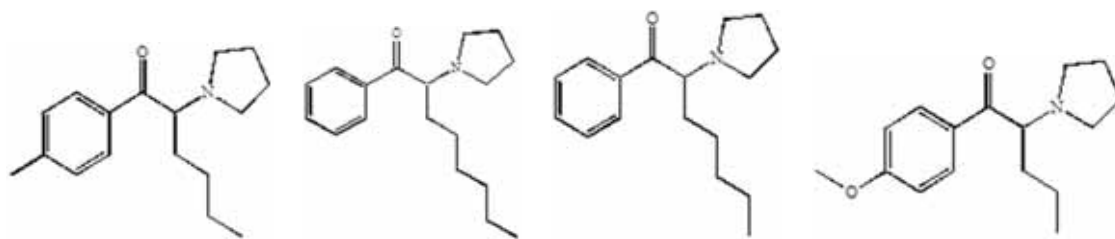


図 1 検出した規制成分及び規制関連成分の化学構造式[その 1]

カチノン系

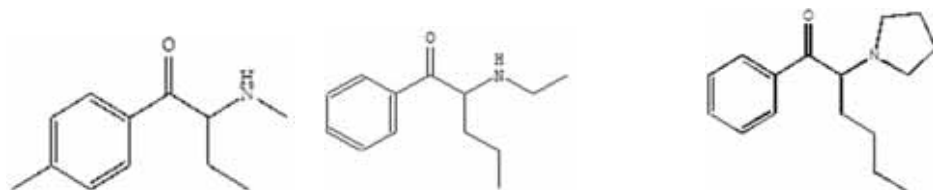


MPHP

PV9

α-PHPP

4-MeO-α-PVP

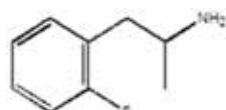


4-Methylbuphedrone

α-Ethylaminopentiophenone

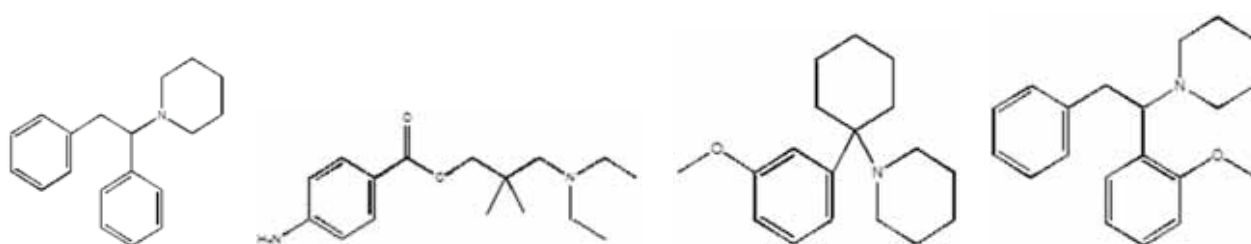
α-PHP

フェネチルアミン系



2FMP

その他

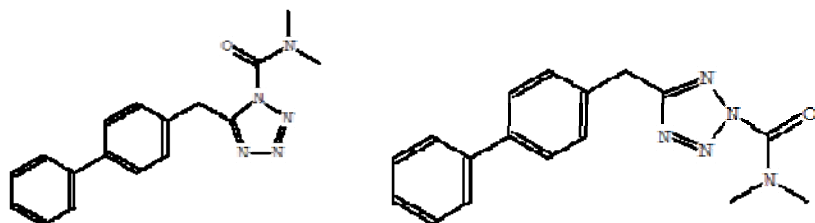


Diphenidine

Dimethocaine

3-MeO-PCP

Methoxphenidine



LY2183240

LY2183240 2'-isomer

図 1 検出した規制成分及び規制関連成分の化学構造式[その 2]

表3 2種類以上規制成分等を検出した検体数内訳

検出成分	検体数
AB-CHMINACA、Diphenidine	17
5F-QUPIC、NNE1	5
Diphenidine、FDU-PB-22	5
MPHP、 $\alpha$ -PHPP	2
5-Fluoro-AB-PINACA、FUB-PB-22	2
PV9、Methoxphenidine	2
5F-QUPIC、QUPIC	1
4-MeO- $\alpha$ -PVP、4-Methylbuphedrone	1
5F-QUPIC、MPHP	1
5-Fluoro-AB-PINACA、Diphenidine	1
5-Fluoro-AMB、FUB-PB-22	1
AB-CHMINACA、NM2201	1
3-MeO-PCP、FDU-PB-22	1
5F-ADB、NM2201	1
XLR-11、5F-QUPIC、NNE1	2
Diphenidine、FDU-PB-22、NM2201	2
AB-CHMINACA、Diphenidine、NM2201	1
5-Fluoro-AMB、AB-FUBINACA、LY2183240、LY2183240 2-isomer	1
Caffeine、Vanillin	2

表4 検体の性状別濃度

性状	のべ検出成分数	濃度 (mg/g (mL))	
		平均	範囲
乾燥植物片	116	82.3	Tr~381.1
粉末	13	530.8	0.7~986.2
液体	9	76.5	12.7~204.5

5 検体であった。3 種類が検出された成分の組合せは、XLR-11、5F-QUPIC 及び NNE1 と NM2201、FDU-PB-22 及び Diphenidine が各 2 検体、AB-CHMINACA、NM2201 及び Diphenidine が 1 検体であった。4 種類が検出された検体の成分の組合せは AB-FUBINACA、5-Fluoro-AMB、LY2183240 及び LY2183240 2-isomer であった。規制成分を複数検出した検体の割合の推移をみると、平成 25 年 4 月

は 25.0%であったが、平成 25 年 7 月 37.5%、平成 26 年 7 月 41.5%、平成 26 年 9 月には 50.0%と増加傾向にあった。複数の成分を同時に摂取することで身体への作用を増強させる効果を狙ったと考えられるが、その副作用による健康被害の深刻化が今後の問題として考えられる。

### 3. 検出成分の定量結果

検出された成分について、その標準品を用

いて定量を行った(表2)。検出したすべての成分の濃度範囲は、0.1~986.2 mg/g(mL)で平均113.2 mg/g(mL)であった。検出検体数が最も多かったAB-CHIMINACAの濃度は、平均6.1 mg/g(1.8~13.8 mg/g)であった。一方Diphenidineは平均176.6 mg/g(mL)(0.4~948.4 mg/g(mL))、5F-QUPIICは平均87.0 mg/g(15.5~154.4 mg/g)であり、成分により濃度に大きな開きがあった。その理由として、中枢神経作用の程度が、成分により大きく異なることが示唆された。

また製品の性状別濃度(表4)は乾燥植物片が平均82.3 mg/g(0.1~381.1 mg/g)、液体試料が平均76.5 mg/mL(12.7~204.5 mg/mL)に対し、粉末は平均530.8 mg/g(0.7~986.2 mg/g)と粉末試料中の成分濃度が高く、特にDiphenidineや $\alpha$ -PHPPを含有する粉末試料は900.0 mg/gを超えていた。粉末製品は白色の粉末をプラスチックチューブに入れたもので、製品原料となる薬物をそのままあるいはブレンドして詰めたと考えられ、一度に全量を使用する可能性を考慮すると他の性状と比べ危険度が非常に高いと考えられる。

#### まとめ

愛知県内の販売施設又はインターネットで販売されている危険ドラッグと疑われる製品を試買して、検査を実施した結果147検体中132検体(89.8%)とほとんどの製品から薬物等が検出された。しかし、試買時に医薬品医療機器等法で指定薬物として規制されていたのは、3成分9検体のみであり、その他のほとんどの検出成分は試買後に指定薬物として規制されたものであった。これより販売業者側は法違反を免れるため、規制情報をいち早く入手するなどして、新しい未規制の成分を含有する製品を販売しているという本製品特有の傾向が顕

著に認められた。

また、複数の成分が検出された製品の増加や粉末製品中の有害成分の濃度が高いという傾向より、これらの摂取による健康被害の深刻化が今後の問題として考えられる。

現在、指定薬物は約2,300を超え、依存性の高いものは麻薬に指定されるなど規制が強化されている。また、平成26年7月以降監視、取締りが強化され、愛知県内を含め全国の危険ドラッグ製品の店頭販売施設は消滅したが、インターネット等を介した販売実態が依然として問題となっており、指定薬物を含有する危険ドラッグ製品が発見される事例も散見される。健康被害防止のため、引き続き危険ドラッグ含有製品の分析を実施していく必要がある。

#### 文献

- 1)花尻(木倉)瑠理:危険ドラッグの規制と流通実態について. 薬剤学75(2):121-127, 2015
- 2)猪飼誉友, 棚橋高志, 大野春香:危険ドラッグ. 衛研技術情報38(2), 2014
- 3)厚生労働省:薬物乱用防止に関する情報;  
[http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou\\_iryuu/iyakuhin/yakubuturanyou/index.html](http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/iyakuhin/yakubuturanyou/index.html)
- 4)指定薬物の分析法について:平成19年5月21日付け薬食監麻発第0521002号厚生労働省医薬食品局監視指導・麻薬対策課長通知
- 5)国立医薬品食品衛生研究所:平成27年度指定薬物分析研修会議資料
- 6)花尻(木倉)瑠理, 河村麻衣子, 内山奈穂子, 緒方潤, 鎌倉浩之, 最所和宏, 合田幸広:指定薬物の分析 Part I:GC-MS及びLC-MS. 薬学雑誌, 971-979(2008)
- 7)国立医薬品食品衛生研究所:違法ドラッグデータ閲覧システム

# Dangerous Drugs analysis survey in Aichi Prefecture

Takashi Tanahashi, Reika Ando, Haruka Ohno, Yoshitomo Ikai,  
Hiroko Minagawa

Dangerous drugs (Kiken-drug, dried plant tip like herb, liquid and powder products containing designer drugs) is one of the most serious problems in Japan. We purchased 147 suspicious products from the marked or internet site in the period of 2013-2015, and applied to analysis. As the results, illegal compounds or similar compounds of the drugs were detected in any 132 products, and the total numbers of the compounds were 31. Among them, XLR-11, AB-FUBINACA and PV9 were already regulated as the illegal compounds at the time of purchase, and these were detected in 9 products. The average content of the compounds was 113.2 mg / g (mL), especially the powdery products was 530.8 mg/g, suggesting more harmful effect for the human health.

Keywords: dangerous drugs, LC-Q/TOF, GC-MS, LC-PDA, designated substances

## 調 査 研 究

### 愛知県住民の尿中金属濃度

山本優子、青木梨絵、小島美千代、白鳥浩美、小池恭子、猪飼誉友、皆川洋子

#### 要 約

環境中の金属による健康影響を評価するため 1976 年から実施している「尿中重金属蓄積状況調査」の一環として、2010～2015 年度に 23 元素について愛知県住民 162 名（男性 84 名、女性 78 名）の尿中金属濃度を誘導結合プラズマ質量分析装置（ICP-MS）を用いて分析した。それぞれの男女別、年齢階層別の常在値及び食生活を含む生活習慣との関連を検討するとともに、過去の報告値と比較した。その結果、ほとんどの元素で男性の方が女性よりも高値であったが、コバルトについては女性の方が高値であった。また、実測値を年齢階層別にみると、ほとんどの元素で横ばいまたは加齢とともに減少したが、カドミウムについては加齢とともに上昇する傾向がみられた。今回得られた結果を過去の報告と比較したところ、年齢階層別傾向に大きな変化は見られなかったが、鉛やカドミウム等の尿中濃度は明らかに減少していた。

キーワード：尿中金属濃度、常在値、生活習慣、ICP-MS

#### 序 文

環境中に存在する多くの金属は、食品、水、空気を介して主に経口的に生体内へ摂取され、吸収、代謝の後、多くは尿または糞便中に排泄される。尿は食品を含めた生活環境中の元素量の変化を比較的早期に反映すると考えられる。また尿は検体として容易に採取することができる有用な検査材料であり、海外でも尿を試料とした金属濃度測定が報告されている<sup>1)</sup>。かつて我が国では、近代産業の発達に伴い環境中にさまざまな金属が放出され、有機水銀による水俣病やカドミウムによるイタイイタイ病が社会問題となった。また、1955 年の森永ヒ素ミルク中毒事件や 1998 年の和歌山毒物カレー事件など、人の健康を脅かす事件が発生している。

本県では県内に居住する成人の尿中金属濃度の常在値を把握し、今後の生活環境の変化による健康の影響を評価する際の管理

目標等として尿中重金属蓄積状況調査を実施している<sup>2,3,4)</sup>。本報では 2010～2015 年度の調査結果をもとに、県民の尿中金属濃度の常在値、性差及び年齢階層差について報告する。

#### 方 法

##### 1 試料

2010～2015 年の各年度に、20 歳代、30 歳代、40 歳代、50 歳代、60 歳代以上の 5 つの年代の男女各 3 名を対象に早朝尿を採取した（各年度 30 名、総検体数 180 件）。尿提供者には、アンケート方式による食習慣等の調査を合わせて実施した。

##### 2 測定項目

リチウム（Li）、ホウ素（B）、マグネシウム（Mg）、アルミニウム（Al）、カルシウム（Ca）、バナジウム（V）、クロム（Cr）、マンガン（Mn）、鉄（Fe）、コバルト（Co）、ニッケル（Ni）、銅（Cu）、亜鉛（Zn）、ヒ素（As）、セレン（Se）、

表1 アンケート

[居住環境等]	
使用米	(1) 自主流通米 (2) 自家保有米 (3) (1)+(2) (4) その他
飲料水	(1) 水道水 (2) 井戸水 (3) (1)+(2) (4) その他
居住環境	(1) 工業地域 (2) 商業地域 (3) 住宅地域 (4) 農山漁村地域 (5) その他
[食習慣]	
米飯頻度	(1) 0~1回/日 (2) 2回/日 (3) 3回/日
魚介類頻度	(1) 2日以下/週 (2) 3~5日/週 (3) 6日以上/週
肉類頻度	(1) 2日以下/週 (2) 3~5日/週 (3) 6日以上/週
鶏卵頻度	(1) 2個以下/週 (2) 3~6個/週 (3) 7個以上/週
野菜・果物頻度	(1) 0~1回/日 (2) 2回/日 (3) 3回/日
海藻頻度	(1) 2日以下/週 (2) 3~5日/週 (3) 6日以上/週
缶ジュース・缶詰頻度	(1) 2缶以下/週 (2) 3~6缶/週 (3) 7缶以上/週
[喫煙]	
(1) 吸わない (2) 以前は吸っていた ( 年前まで ) (3) 吸っている 1日 本 ( 年前から )	
[飲酒]	
(1) 飲まない (2) 以前は飲んでいて ( 年前まで ) (3) 飲んでいる 1日 合 ( 年前から )	

ルビジウム (Rb)、ストロンチウム (Sr)、モリブデン (Mo)、カドミウム (Cd)、スズ (Sn)、バリウム (Ba)、水銀 (Hg)、鉛 (Pb)、尿比重及び尿クレアチニン

### 3 測定方法

尿 10 mL をテフロン製遠心管に採り、硝酸 2.5 mL (Ultrapur、関東化学) を加え 70~80 の水浴中で尿中の有機物を加温分解後、超純水で 10 mL とし、誘導結合プラズマ質量分析装置 (ICP-MS、Agilent7500ce) で 23 元素一斉分析を行った。金属標準原液は ICP-MS クオリティコントロールサンプル 2 (AccuStandard)、ICP-MS-6020-CAL-1 (AccuStandard)、Li 標準液 (Merck、AccuStandard)、B 標準液 (Merck)、Mg 標準液 (Merck)、Ca 標準液 (Merck)、V 標準液 (Merck)、Zn 標準液 (Merck)、As 標準液 (Merck)、Se 標準液 (Merck)、Rb 標準液 (Merck、AccuStandard)、Sr 標準液 (Merck)、Mo 標準液 (Merck)、Sn 標準液 (Merck) 及び Hg 標準液 (Merck、AccuStandard) を用いた。

また、尿比重は尿比重計 (UR-S、ATAGO) を用い、尿クレアチニンは Jaffe 法<sup>5)</sup> により測定した。

### 4 生活習慣のアンケート調査

表 1 に示した項目により、使用米・飲料水の種類、居住環境、食生活、飲酒、喫煙

等を調査した。

### 5 測定結果の解析

調査時に潜血が認められた 18 検体は、全ての金属元素について統計処理から除外した。実測値が定量下限値未満であったものについては、定量下限値の 1/2 の濃度として統計処理を行った。

測定結果解析には、統計解析ソフトウェア SPSS Statistics 17.0 を用い、各項目について例数が 10 未満の場合は解析を行わなかった。有意差については、まずデータの分布について Shapiro-Wilks の方法により正規性を検定し、いずれも正規性が認められなかったことからノンパラメトリック検定 (Mann-Whitney の U、Kruskal-Wallis の H) によって行った。

### 結果と考察

#### 1 尿比重及び尿クレアチニン

尿比重及び尿クレアチニンの男女別平均値及び標準偏差を表 2 に示した。いずれも女性に比べ男性が有意に高い値であり、愛知県における過去の調査結果と有意な差は認められなかった<sup>2,3,4)</sup>。

尿比重及び尿クレアチニンの年齢階層別平均値は図 1 及び図 2 に示したとおり、いずれも年齢階層が上がるにしたがって低くなっていた。



表2 男女別尿比重及び尿クレアチニン（平均値±標準偏差）

性別	検体数	尿比重 (g/mL)		尿クレアチニン (g/L)	
		最小値	最大値	最小値	最大値
男	90	1.021	± 0.008	1.55	± 0.78
		1.006	~ 1.036	0.30	~ 3.83
女	90	1.018	± 0.009	1.00	± 0.61
		1.006	~ 1.043	0.24	~ 2.57
全体	180	1.020	± 0.008	1.27	± 0.75
		1.006	~ 1.043	0.24	~ 3.83

\*\* : P<0.01, \*\*\* : P<0.001

成人の尿中クレアチニン排泄量は 0.5 ~ 1.5 g/日であり、その増減は食物には関係なく、筋肉の発育と運動に関係するため、男性が女性よりも多いことが知られており<sup>5)</sup>、今回認められた尿クレアチニンの男女差は筋肉量に由来するものと考えられた。また、尿クレアチニンの加齢による減少も、筋肉量の低下によるものと考えられた。

## 2 各元素の尿中濃度

各金属の尿中濃度（実測値）の男女別の平均値、標準偏差、最小値及び最大値（ $\mu\text{g/L}$ ）を表3に示した。本データを2009年に愛知県内の大学生を対象に実施された6元素（V、Cr、Ni、Cu、As及びSe）のICP-MSによる尿中濃度調査結果<sup>6)</sup>と比較したが、両者の間に大きな違いは認められなかった。

尿を用いて濃度測定を行う場合、24時間尿が望ましいが、社会生活を営む成人が24時間尿を採取することは困難であることから、通常はスポット尿が用いられる。この場合、1回に排泄する尿量によって目的物の濃度は大きく変化するため、測定値を評価する際には、対象物の濃度を尿比重や尿クレアチニンによって補正する方法が用いられることが多い<sup>7)</sup>。しかし、前述のとおり、尿比重及び尿クレアチニンは性別及び年齢階層別に有意な差があり、これらで補正することで元素濃度に見かけ上の差が生じることが考えられる。このため、以下の解析においては実測値を用いて評価を行った。

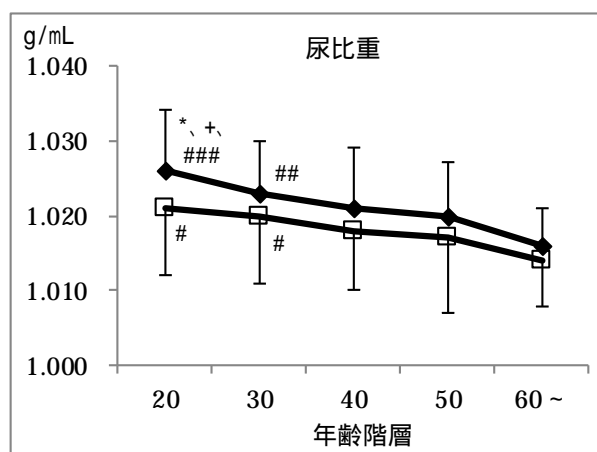


図1 年齢階層別尿比重平均値 (n = 180) ( :男性、 :女性)  
\* : 40歳代と比較 P<0.05  
+ : 50歳代と比較 P<0.05  
#、##、### : 60歳代以上と比較 P<0.05, P<0.01, P<0.001

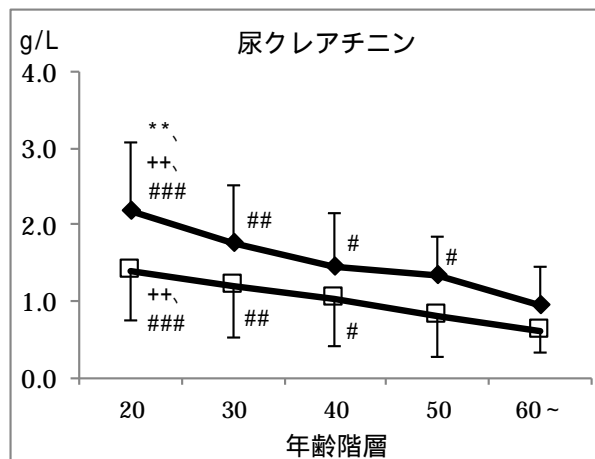


図2 年齢階層別尿クレアチニン平均値 (n = 180) ( :男性、 :女性)  
\*\* : 40歳代と比較 P<0.01  
++ : 50歳代と比較 P<0.01  
#、##、### : 60歳代以上と比較 P<0.05, P<0.01, P<0.001

表3 各元素の尿中濃度 (µg/L) (n=162)

	定量 下限値	平均値 ± 標準偏差								
		男性			女性			全体		
		最小値	~	最大値	最小値	~	最大値	最小値	~	最大値
Li	0.09	20 4.0	± ~	17 110	16 3.8	± ~	12 82	18 3.8	± ~	15 110
B	30	1,100 290	± ~	550 3,300	970 240	± ~	460 2,200	1,000 240	± ~	510 3,300
Mg	20	97,000 15,000	± ~	52,000 250,000	79,000 12,000	± ~	47,000 230,000	88,000 12,000	± ~	50,000 250,000
Al	0.5	6.0 1.1	± ~	4.1 22	6.5 N.D.	± ~	6.5 47	6.2 N.D.	± ~	5.4 47
Ca	40	150,000 11,000	± ~	83,000 390,000	110,000 730	± ~	83,000 390,000	130,000 730	± ~	85,000 390,000
V	0.02	0.24 0.034	± ~	0.19 1.6	0.17 0.045	± ~	0.11 0.48	0.21 0.034	± ~	0.16 1.6
Cr	0.02	0.16 N.D.	± ~	0.11 0.55	0.13 N.D.	± ~	0.092 0.49	0.14 N.D.	± ~	0.10 0.55
Mn	0.03	0.064 N.D.	± ~	0.059 0.29	0.083 N.D.	± ~	0.15 1.1	0.073 N.D.	± ~	0.11 1.1
Fe	2	6.3 N.D.	± ~	4.6 31	4.1 N.D.	± ~	3.8 21	5.2 N.D.	± ~	4.3 31
Co	0.02	0.32 0.025	± ~	0.36 2.0	0.78 0.046	± ~	0.84 3.8	0.54 0.025	± ~	0.68 3.8
Ni	0.1	2.1 0.40	± ~	1.6 12	1.9 0.40	± ~	1.4 6.4	2.0 0.40	± ~	1.5 12
Cu	0.8	10 2.4	± ~	5.1 24	8.7 2.6	± ~	4.5 19	9.6 2.4	± ~	4.9 24
Zn	2	460 73	± ~	360 2,200	320 34	± ~	330 1,900	390 34	± ~	350 2,200
As	0.09	140 11	± ~	130 1,100	110 12	± ~	120 600	130 11	± ~	130 1,100
Se	0.2	56 5.7	± ~	35 160	45 2.9	± ~	35 160	51 2.9	± ~	35 160
Rb	0.2	1,100 170	± ~	670 3,300	1,100 320	± ~	670 3,600	1,100 170	± ~	670 3,600
Sr	0.03	190 14	± ~	120 920	150 3.9	± ~	110 500	170 3.9	± ~	120 920
Mo	0.05	150 29	± ~	110 560	110 22	± ~	97 580	130 22	± ~	110 580
Cd	0.01	0.69 0.11	± ~	0.39 1.8	0.85 0.13	± ~	0.70 3.8	0.77 0.11	± ~	0.56 3.8
Sn	0.2	0.41 N.D.	± ~	0.49 2.7	0.43 N.D.	± ~	0.65 3.8	0.42 N.D.	± ~	0.57 3.8
Ba	0.08	1.9 N.D.	± ~	1.7 9.1	1.4 N.D.	± ~	1.3 6.6	1.7 N.D.	± ~	1.5 9.1
Hg	0.09	1.1 N.D.	± ~	0.95 6.9	1.0 N.D.	± ~	0.89 4.5	1.1 N.D.	± ~	0.92 6.9
Pb	0.09	0.83 N.D.	± ~	0.43 2.4	0.60 N.D.	± ~	0.37 1.9	0.72 N.D.	± ~	0.41 2.4

\* : P<0.05、\*\* : P<0.01、\*\*\* : P<0.001

#### (1) 性別による比較

男女別に比較した場合、Mg、Ca、V、Cr、Fe、Cu、Zn、As、Se、Sr、Mo、Ba 及び Pb の 13 元素で男性の方が女性よりも 1.1~1.5 倍程度高い値を示した。過去のデータでも Cu、Zn、As 及び Pb については男性が女性よりも有意に高濃度であったが<sup>2)</sup>、明確な理由はわからなかった。ただし、尿への金属等の排泄は主に食事からの取り込みを反映しているとされており、この場合も男女間の食事量の違いが一因と考えられる。一方で Co は男性が  $0.32 \pm 0.36 \mu\text{g/L}$  に対し、女性が  $0.78 \pm 0.84 \mu\text{g/L}$  と有意に高値であった ( $P < 0.001$ )。Co は男性よりも女性で有意に吸収率が高く、尿への排泄量も多いことが報告されており<sup>8)</sup>、今回の結果もそれを裏付けるものであった。Al、Mn 及び Cd の平均値は女性の方が高値であったが、ばらつきが大きく有意な差は認められなかった。

#### (2) 年齢階層による比較

年齢階層別に比較した結果を図 3 に示した。Cd では加齢により尿中濃度が増加する傾向がみられ、その他の元素では横ばいもしくは加齢とともに尿中濃度が減少する傾向がみられた。Cd は生体内半減期が 10~30 年と長いため、体内で腎臓、肝臓、筋肉に蓄積し、年齢の増加につれて濃度が増加する傾向を示すことが報告されている<sup>8)</sup>。今回認められた濃度差は体内蓄積量を反映するものと考えられ、2008 年に報告された当所の調査結果ともよく一致していた。その他の元素では、加齢による代謝能力の変化あるいは嗜好や摂取量等の食習慣の変化が尿中金属濃度差の一因ではないかと考えられた。しかし年齢階層による食習慣の偏りは認められないこと、詳細な摂取量についての調査は行っていないことから今回の調査では要因を明らかにすることは難しいと考えられた。

#### (3) 生活習慣との関連

表 1 に示す居住環境や食習慣等の調査項目と尿中金属濃度について解析を行ったが、今回の調査では明確な関連性は認められなかった。

#### (4) 過去の報告値との比較

当所では、1988 年に Mg、Ca、Cr、Ni、Cu、Zn、As、Cd 及び Pb、2004 年に Cr 及び Se、2008 年に Cd について尿中の常在値を報告しており、これらを今回得られた結果とともに表 4 に示し、比較を試みた。1988 年及び 2004 年の報告値については、原子吸光光度法により測定しており、今回の ICP-MS 装置による測定値と一概に比較することはできないが、Cr、Ni、Cu、Cd 及び Pb について、今回の値は以前の報告値よりも低いことが認められた。この原因については環境中の汚染の減少や食習慣の変化が考えられるが、測定法の違いが影響している可能性も否定できないため、今後さらに検討が必要であると考えられる。ただし Pb については、1980 年ごろからガソリンの無鉛化が進んだこと、1992 年以後順次水道管に使用されていた鉛管の取り換えが進んでいること、また 2006 年に施行された EU の RoHS 指令を受け、ハンダや塗料が鉛フリーのものとなり、環境中からの取り込みが減少していることは事実である。一方 Cd についても、我が国における主要な汚染源であるコメについて 1970 年以降  $0.4 \text{ mg/kg}$  以上のものは市場に流通しないように管理されてきた上に消費量も減っていることから、日本人の食事からの Cd の 1 日摂取量は、2005 年には 1970 年代後半の約半分減少しているとの報告がある<sup>9)</sup>。加えて Pb と同様、RoHS 指令の規定に基づき、Cd 及び Cr についても使用を抑える方向に向かっており、これらが今回の結果に反映されている可能性は十分に考えられる。

#### 結 論

愛知県民 162 名について、最近 6 か年における男女別、年齢階層別の平常時の尿中金属濃度を調査した。本調査データは、金属の関与が疑われる健康危機事例が発生した場合の迅速な原因究明及び健康影響調査において有用な基礎資料となると考えられる。

本データを性別、年齢階層、居住環境や食習慣で解析した。その結果、性別では Co

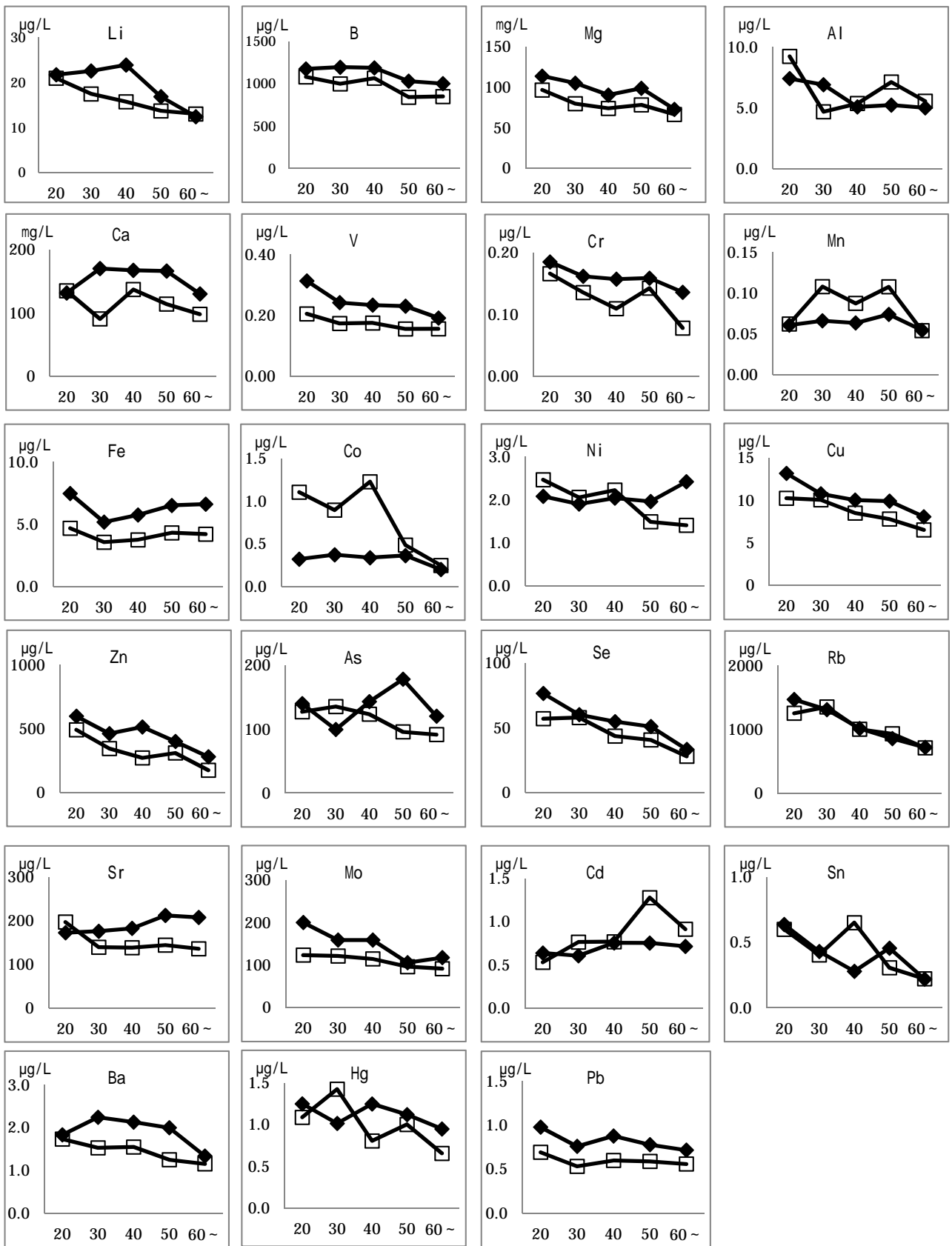


図3 年齢階層別の尿中金属濃度 (n=162)  
 (縦軸:濃度、横軸:年齢階層、 :男性、 :女性)

表4 過去の報告値(平均値)との比較(μg/L)

報告年	性別	Mg	Ca	Cr	Ni	Cu	Zn	As	Se	Cd	Pb
1988	男	140,000	79,000	2.4	4.6	19	550	170		1.8	7.4
	女	110,000	74,000	2.5	4.3	17	330	130		1.7	6.5
2004	男			2.6					41		
	女			2.6					35		
2008	男									0.82	
	女									0.93	
2015	男	97,000	150,000	0.16	2.1	10	460	140	56	0.69	0.83
	女	79,000	110,000	0.13	1.9	8.7	320	120	45	0.85	0.60

を除きほとんどの元素で男性が女性よりも高い傾向が認められ、年齢階層ではCdに年齢とともに上昇する傾向が認められたが、その他の解析項目では明確な増減傾向は認められなかった。一方で本データを当所で実施した過去の測定データと比較した結果、一部の元素に減少傾向が認められた。これらのうち明らかな減少が認められたPb、Cdについては環境中の濃度の減少がその原因として考えられた。

尿中金属濃度は、検査技術の進歩により以前よりも多くの種類の金属を迅速に低濃度まで測定することが可能となっている。また、今回は相関を見いだせなかったが、尿中金属濃度は食生活の変化や生活環境を反映していると考えられ、随時最新の状況を把握する必要があると考える。

#### 謝 辞

本研究は、健康福祉部保健医療局生活衛生課及び保健所生活環境安全課のご協力を得て実施したことを記し、関係者に心より感謝申し上げます。

#### 文 献

1) Batista B L, Rodrigues J L, Tormen L, Curtius A J, Barbosa Jr F: Reference Concentrations for Trace Elements in Urine for the Brazilian Population based on q-ICP-MS with a Simple Dilute - and-Shoot Procedure. Journal of the Brazilian Chemical Society,

20(8):1406-1413, 2009.

- 2) 林留美子, 荒川正一, 早川清子, 伊藤正夫, 清水國樹: 愛知県下住民の尿中金属量-その常在値と経年推移-. 愛知県衛生研究所報 38:5-10, 1988.
- 3) 林留美子, 近藤文雄, 恩田祐行: 愛知県住民の尿中金属量( )-クロム、セレンの常在値及び生活習慣との関連-. 愛知県衛生研究所報 54: 9-17, 2004.
- 4) 小島美千代, 林留美子, 遠山明人: 愛知県住民の尿中金属量( )-カドミウムの常在値と生活習慣との関連-. 愛知県衛生研究所報 58:9-17, 2008.
- 5) 金井正光編:臨床検査提要改訂 32 版 .200, 500-501, 2005, 金原出版, 東京.
- 6) 上田寿, 手嶋紀雄, 酒井忠雄, 加藤周司: ダイナミックリアクションセル™-誘導結合プラズマ質量分析法による糖尿病患者尿及び血清中の微量元素分析. 愛知工業大学総合技術研究所研究報告 11: 37-44, 2009.
- 7) 田口豊郁, 緒方正名: スポット尿を用いた生物学的モニタリングのための尿中代謝物濃度の補正-クレアチニン補正と比重補正-. 川崎医療福祉学会誌, 2(1):103-112, 1992.
- 8) 糸川嘉則[編集]: ミネラルの事典. 初版, 319, 383, 2003, 朝倉書店, 東京.
- 9) 食品安全委員会: 食品中のカドミウム; [https://www.fsc.go.jp/sonota/17gou\\_2.pdf](https://www.fsc.go.jp/sonota/17gou_2.pdf)

# Study on urinary concentrations of metals in residents of Aichi Prefecture

Yuko Yamamoto, Rie Aoki, Michiyo Kojima, Hiromi Shiratori, Yasuko Koike,  
Yoshitomo Ikai, Hiroko Minagawa

Urinary concentrations of 23 metals in 162 Aichi Prefecture residents (84 males, 78 females) were determined by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) during a period of 2010-2015 and were evaluated by sex, age, life-style and dietary habits. Following tendencies were observed: The concentrations of samples from males were higher than those from females for all metals except cobalt. The concentrations of cadmium increased with age, though those of the other metals were stable or apt to decrease. Concerning the life-style and dietary habits, remarkable relationship was not found. Similar tendencies were observed in our previous report for a period of 1976-1985, but the levels of lead and cadmium obviously decreased in the present study.

Key words: urinary concentration of metals, concentration in the normal, life-style, ICP-MS

---

---

**他誌掲載論文抄録**

---

---

**Case-based surveillance enhanced with measles virus detection/genotyping is essential to maintain measles elimination in Aichi Prefecture, Japan**

Minagawa H, Yasui Y, Adachi H, Ito M, Hirose E, Nakamura N, Hata M, Kobayashi S, Yamashita T

Vaccine, 33(45): 6043-6048, 2015

**Background:** Japan was verified as having achieved measles elimination by the Measles Regional Verification Commission in the Western Pacific Region in March 2015. Verification of measles elimination implies the absence of continuous endemic transmission. After the last epidemic in 2007 with an estimated 18,000 cases, Japan introduced nationwide case-based measles surveillance in January 2008. Laboratory diagnosis for all suspected measles cases is essentially required by law, and virus detection tests are mostly performed by municipal public health institutes. Despite relatively high vaccination coverage and vigorous response to every case by the local health center staff, outbreak of measles is repeatedly observed in Aichi Prefecture, Japan.

**Methods:** Measles virus N and H gene detection by nested double RT-PCR was performed with all specimens collected from suspected cases and transferred to our institute. Genotyping and further molecular epidemiological analyses were performed with the direct nucleotide sequence data of appropriate PCR products.

**Results:** Between 2010 and 2014, specimens from 389 patients suspected for measles were tested in our institute. Genotypes D9, D8, H1 and B3 were detected. Further molecular epidemiological analyses were helpful to establish links between patients, and sometimes useful to discriminate one outbreak from another. All virus-positive cases, including 49 cases involved in three outbreaks without any obvious epidemiological link with importation, were considered as import-related based on the nucleotide sequence information. Chain of transmission in the latest outbreak in 2014 terminated after the third generations, much earlier than the 2010–11 outbreak (6th generations).

**Conclusion:** Since 2010, almost all measles cases reported in Aichi Prefecture are either import or import-related, based primarily on genotypes and nucleotide sequences of measles virus detected. In addition, genotyping and molecular epidemiological analyses are indispensable to prove the interruption of endemic transmission when the importations of measles are repeatedly observed.

## Establishment of a panel of in-house polyclonal antibodies for the diagnosis of enterovirus infections

Kotani O<sup>1,3</sup>, Iwata-Yoshikawa N<sup>1</sup>, Suzuki T<sup>1</sup>, Sato Y<sup>1</sup>, Nakajima N<sup>1</sup>, Koike S<sup>4</sup>, Iwasaki T<sup>1</sup>, Sata T<sup>1</sup>, Yamashita T, Minagawa H, Taguchi F<sup>3</sup>, Hasegawa H<sup>1</sup>, Shimizu H<sup>2</sup>, Nagata N<sup>1</sup>

Departments of <sup>1</sup>Pathology and <sup>2</sup>Virology II, National Institute of Infectious Diseases,

<sup>3</sup>Department of Virology and Viral Infections, Faculty of Veterinary Medicine, Nippon

Veterinary and Life Science University, <sup>4</sup>Neurovirology Project, Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science

Neuropathology 35(2):107-121, 2015

The aim of this study was to establish a reliable method of virus detection for the diagnosis of critical enterovirus infections such as acute infective encephalitis, encephalomyelitis and myocarditis. Because histopathological and immunohistochemical analyses of paraffin-embedded tissues play an important role in recognizing infectious agents in tissue samples, six in-house polyclonal antibodies raised against three representative enteroviruses using an indirect immunofluorescence assay and immunohistochemistry were examined. This panel of polyclonal antibodies recognized three serotypes of enterovirus. Two of the polyclonal antibodies were raised against denatured virus particles from enterovirus A71, one was raised against the recombinant VP1 protein of coxsackievirus B3, and the other for poliovirus type 1 were raised against denatured virus particles, the recombinant VP1 protein and peptide 2C. Western blot analysis revealed that each of these antibodies recognized the corresponding viral antigen and none cross-reacted with non-enteroviruses within the

family *Picornaviridae*. However, all cross-reacted to some extent with the antigens derived from other serotypes of enterovirus. Indirect immunofluorescence assay and immunohistochemistry revealed that the virus capsid and non-structural proteins were localized in the cytoplasm of affected culture cells, and skeletal muscles and neurons in neonatal mice experimentally infected with human enterovirus. The antibodies also recognized antigens derived from recent clinical isolates of enterovirus A71, coxsackievirus B3 and poliovirus. In addition, immunohistochemistry revealed that representative antibodies tested showed the same recognition pattern according to each serotype. Thus, the panel of in-house anti-enterovirus polyclonal antibodies described herein will be an important tool for the screening and pathological diagnosis for enterovirus infections, and may be useful for the classification of different enterovirus serotypes, including coxsackieviruses A and B, echoviruses, enterovirus A71 and poliovirus.



## Reduced *Tyk2* gene expression in $\beta$ -cells due to natural mutation determines susceptibility to virus-induced diabetes

Izumi K<sup>1,2</sup> Mine K<sup>1</sup>, Inoue Y<sup>1</sup>, Teshima M<sup>1</sup>, Ogawa S<sup>1</sup>, Kai Y<sup>1</sup>, Kurafuji T<sup>1</sup>, Hirakawa K<sup>1</sup>, Miyakawa D<sup>1</sup>, Ikeda H<sup>1</sup>, Inada A<sup>1</sup>, Hara M<sup>3</sup>, Yamada H<sup>1</sup>, Akashi K<sup>1</sup>, Niho Y<sup>1</sup>, Ina K<sup>4</sup>, Kobayashi T<sup>4</sup>, Yoshikai Y<sup>1</sup>, Anzai K<sup>2</sup>, Yamashita T, Minagawa H, Fujumoto S<sup>1</sup>, Kurisaki H<sup>1</sup>, Shimada K<sup>5</sup>, Katsuta H<sup>1</sup>, Nagafuchi S<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Kyushu University, <sup>2</sup>Saga University, <sup>3</sup>University of Chicago, <sup>4</sup>Oita University, <sup>5</sup>University of Miyazaki

Nature Communications DOI: 10.1038/ncomm7748, 2015

Accumulating evidence suggests that viruses play an important role in the development of diabetes. Although the diabetogenic encephalomyocarditis strain D virus induces diabetes in restricted lines of inbred mice, the susceptibility genes to virus-induced diabetes have not been identified. We report here that novel *Tyrosine kinase 2* (*Tyk2*) gene mutations are present in virus-induced diabetes-sensitive SJL and SWR mice. Mice carrying the mutant *Tyk2* gene on the virus-resistant C57BL/6 background are highly sensitive to virus-induced diabetes.

*Tyk2* gene expression is strongly reduced in *Tyk2*-mutant mice, associated with low *Tyk2* promoter activity, and leads to decreased expression of interferon-inducible genes, resulting in significantly compromised antiviral response. *Tyk2*-mutant pancreatic  $\beta$ -cells are unresponsive even to high dose of Type I interferon. Reversal of virus-induced diabetes could be achieved by  $\beta$ -cell-specific *Tyk2* gene expression. Thus, reduced *Tyk2* gene expression in pancreatic  $\beta$ -cells due to natural mutation is responsible for susceptibility to virus-induced diabetes.

## Characterization of a large cluster of influenza A(H1N1)pdm09 virus cross-resistant to oseltamivir and peramivir during the 2013/2014 influenza season in Japan

Takashita E<sup>1</sup>, Kiso M<sup>2</sup>, Fujisaki S<sup>1</sup>, Yokoyama M<sup>3</sup>, Nakamura K<sup>1</sup>, Shirakura M<sup>1</sup>, Sato H<sup>3</sup>, Odagiri T<sup>1</sup>, Kawaoka Y<sup>2,4,5,6</sup>, Tashiro M<sup>1</sup>, The Influenza Virus Surveillance Group of Japan (including Yasui Y)

<sup>1</sup>Influenza Virus Research Center, National Institute of Infectious Diseases, <sup>2</sup>Division of Virology, Department of Microbiology and Immunology, Institute of Medical Science, University of Tokyo, <sup>3</sup>Pathogen Genomics Center, National Institute of Infectious Diseases, <sup>4</sup>ERATO Infection-Induced Host Responses Project, Japan Science and Technology Agency, <sup>5</sup>Department of Special Pathogens, International Research Center for Infectious Diseases,

Institute of Medical Science, University of Tokyo, <sup>6</sup>Department of Pathobiological Sciences, School of Veterinary Medicine, University of Wisconsin-Madison  
Antimicrobial Agents and Chemotherapy 59(5):2607-2617, 2015

Between September 2013 and July 2014, 2,482 influenza 2009 pandemic A(H1N1) [A(H1N1)pdm09] viruses were screened in Japan for the H275Y substitution in their neuraminidase (NA) protein, which confers cross-resistance to oseltamivir and peramivir. We found that a large cluster of the H275Y mutant virus was present prior to the main influenza season in Sapporo/Hokkaido, with the detection rate for this mutant virus reaching 29% in this area. Phylogenetic analysis suggested the clonal expansion of a single mutant virus in Sapporo/Hokkaido. To understand the reason for this large cluster, we examined the in vitro and in vivo properties of the mutant virus. We found that it grew well in cell culture, with growth comparable to that of the wildtype virus. The cluster virus also replicated well in the upper respiratory tract of ferrets and was

transmitted efficiently between ferrets by way of respiratory droplets. Almost all recently circulating A(H1N1)pdm09 viruses, including the cluster virus, possessed two substitutions in NA, V241I and N369K, which are known to increase replication and transmission fitness. A structural analysis of NA predicted that a third substitution (N386K) in the NA of the cluster virus destabilized the mutant NA structure in the presence of the V241I and N369K substitutions. Our results suggest that the cluster virus retained viral fitness to spread among humans and, accordingly, caused the large cluster in Sapporo/Hokkaido. However, the mutant NA structure was less stable than that of the wild-type virus. Therefore, once the wild-type virus began to circulate in the community, the mutant virus could not compete and faded out.

## アイチウイルス

山下照夫

食品衛生検査指針 微生物編 第4章ウイルス 697-701, 2015, 日本食品衛生協会, 東京

アイチウイルスはカキを原因とする胃腸炎患者の糞便から分離されたウイルスで、胃腸炎もしくは下痢症の原因ウイルスと考えられている。食中毒事件の届出においては「その他のウイルス」として取り扱われている。

アイチウイルスはピコルナウイルス科コブウイルス属に属する一本鎖RNAウイルスで、血

清型は1つだが、遺伝子型によりA、B、C型の3つに分けられる。

アイチウイルスはBS-C-1, Vero, LLCMK2細胞等のサル腎臓由来細胞で分離可能だが、エンテロウイルスほどCPEが明瞭ではなく、出現に時間がかかるため、その検査はRT-PCR法で実施される。

食品からのアイチウイルス検査は公定試験法がないので、「めやすとなる検査法」として国内や諸外国で広く活用されている方法を記

載する。また、最近 RT-Real-time PCR 法も開発されたので、そちらも併せて記載する。

## 2015/16 シーズン初めに保育園集団かぜから分離された AH1pdm09 亜型インフルエンザウイルス 愛知県

安井善宏、尾内彩乃、小林慎一、山下照夫、皆川洋子、土屋啓三<sup>1</sup>、深瀬文昭<sup>1</sup>、有賀みはる<sup>1</sup>、片岡泉<sup>1</sup>、糟谷慶一<sup>1</sup>、片岡博喜<sup>1</sup>

<sup>1</sup>岡崎市保健所

病原微生物検出情報 36(11):224-225, 2015

2015年9月に県内でA型インフルエンザの集団感染が発生し、うがい液検体からAH1pdm09 亜型インフルエンザウイルスが分離された。分離株についてHA遺伝子の塩基配列を決定し、系統樹解析を行ったところ、2013/14シーズンに国内流行したクレード6Bに分類された。今回の集団かぜは2009年のパンデミックを経験していない年代(3~5歳)で起こって

おり、低年齢層に感受性者が蓄積している可能性も考えられた。本県から2014/15シーズンに同亜型は分離検出されなかったが、インド、ネパール等で流行が認められていた株と似た株が今回分離されたため、2015/16シーズンに国内で同亜型が流行するかどうか注視する必要がある。

## インフルエンザウイルスの動向と疫学 - 季節性および鳥インフルエンザウイルスを含めて

安井善宏

The Medical & Test Journal, 1331: 6, 2015

流行している季節性インフルエンザにはAH1pdm09、A香港型、B型山形系統、B型ビクトリア系統がある。2014/15シーズン、国内ではA香港型が流行し、AH1pdm09の活動は穏やかであった。昨シーズンにインド、ネパールで流行が見られたAH1pdm09が2015/16シーズン初期に愛知県で分離検出されたので、今後の動

向に注意する必要がある。近年、鳥インフルエンザウイルス(H5N1、H7N9 亜型)がヒトに感染する事例が特にエジプト(H5N1)、中国(H7N9)から報告されている。ヒト-ヒト間での感染はごく稀であり、予防としては鳥インフルエンザ流行地で家禽との濃厚接触を避けることが重要である。

### 病原体検出マニュアル 麻疹（第3.3版）

駒瀬勝啓<sup>1</sup>、染谷健二<sup>1</sup>、關文緒<sup>1</sup>、中津祐一郎<sup>1</sup>、田原舞乃<sup>1</sup>、酒井宏治<sup>1</sup>、竹田誠<sup>1</sup>、長野秀樹<sup>2</sup>、三好正浩<sup>2</sup>、青木洋子<sup>3</sup>、小川知子<sup>4</sup>、七種美和子<sup>5</sup>、児玉洋江<sup>6</sup>、皆川洋子、安井善宏、加瀬哲男<sup>7</sup>、倉田貴子<sup>7</sup>、佐倉千尋<sup>8</sup>、村田祥子<sup>9</sup>、濱崎光宏<sup>10</sup>、世良暢之<sup>10</sup>、加藤峰史<sup>11</sup>、平良勝也<sup>11</sup>、塚越博之<sup>12</sup>、秋吉京子<sup>13</sup>、奴久妻聡一<sup>13</sup>

<sup>1</sup> 国立感染症研究所ウイルス第3部、<sup>2</sup> 北海道立衛生研究所、<sup>3</sup> 山形県衛生研究所、<sup>4</sup> 千葉県衛生研究所、<sup>5</sup> 横浜市衛生研究所、<sup>6</sup> 石川県保健環境センター、<sup>7</sup> 大阪府立公衆衛生研究所、<sup>8</sup> 鳥取県環境衛生研究所、<sup>9</sup> 山口県環境保健センター、<sup>10</sup> 福岡県保健環境研究所、<sup>11</sup> 沖縄県衛生環境研究所、<sup>12</sup> 群馬県衛生環境研究所、<sup>13</sup> 神戸市環境保健研究所

病原体検出マニュアル, 2015

<http://www.nih.go.jp/niid/images/lab-manual/Measles.V3.3.20150814.pdf>

### 病原体検出マニュアル 風疹（第3.1版）

森嘉生<sup>1</sup>、大槻紀之<sup>1</sup>、岡本貴世子<sup>1</sup>、坂田真史<sup>1</sup>、竹田誠<sup>1</sup>、安井善宏、皆川洋子、倉田貴子<sup>2</sup>、上林大起<sup>2</sup>、加瀬哲男<sup>2</sup>

<sup>1</sup> 国立感染症研究所ウイルス第3部、<sup>2</sup> 大阪府立公衆衛生研究所

病原体検出マニュアル, 2015

<http://www.nih.go.jp/niid/images/lab-manual/Rubella201508.pdf>

### 病原体検出マニュアル 先天性風疹症候群（第3版）

森嘉生<sup>1</sup>、大槻紀之<sup>1</sup>、岡本貴世子<sup>1</sup>、坂田真史<sup>1</sup>、竹田誠<sup>1</sup>、安井善宏、皆川洋子、倉田貴子<sup>2</sup>、上林大起<sup>2</sup>、加瀬哲男<sup>2</sup>

<sup>1</sup> 国立感染症研究所ウイルス第3部、<sup>2</sup> 大阪府立公衆衛生研究所

病原体検出マニュアル, 2015

<http://www.nih.go.jp/niid/images/lab-manual/CongenRubellaSyndV3.pdf>

### Designing multiplex PCR system of *Campylobacter jejuni* for efficient typing by improving monoplex PCR binary typing method

Yamada K<sup>1</sup>, Iyata A, Suzuki M, Matsumoto M, Yamashita T, Minagawa H, Kurane R<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Biological Chemistry, College of Bioscience and Biotechnology, Chubu University

Journal of Infection and Chemotherapy 21(1):50-54, 2015

*Campylobacter jejuni* is responsible for the majority of *Campylobacter* infections. As the molecular epidemiological study of outbreaks, pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) is performed in general. But PFGE has several problems. PCR binary typing (P-BIT) method is a typing method for *Campylobacter* spp. that was recently developed, and was reported to have a similar discriminatory power and stability to those of PFGE. We modified the P-BIT method from 18 monoplex PCRs to two multiplex PCR systems (mP-BIT). The same results were obtained from monoplex PCRs using original primers and multiplex PCR in the representative isolates. The mP-BIT can analyze 48 strains at a time by using 96-well

PCR systems and can identify *C. jejuni* because mP-BIT includes *C. jejuni* marker. The typing of the isolates by the mP-BIT and PFGE demonstrated generally concordant results and the mP-BIT method (D = 0.980) has a similar discriminatory power to that of PFGE with *Sma*I digest (D = 0.975) or *Kpn*I digest (D = 0.987) as with original article. The mP-BIT method is quick, simple and easy, and comes to be able to perform it at low cost by having become a multiplex PCR system. Therefore, the mP-BIT method with two multiplex PCR systems has high potential for a rapid first-line surveillance typing assay of *C. jejuni* and can be used for routine surveillance and outbreak investigations of *C. jejuni* in the future.

## Emergence of Salmonella strain that produces IMP-1-type metallo- $\beta$ -lactamase in a Japanese patient

Hosoda T<sup>1</sup>, Wakuda M<sup>1,2</sup>, Ishii J<sup>1</sup>, Tsuge I<sup>3</sup>, Matsui M<sup>4</sup>, Suzuki S<sup>4</sup>, Yamada K, Suzuki K, Ishikawa K<sup>2</sup>, Yoshida S<sup>2</sup>

Department of <sup>1</sup>Joint Research Laboratory of Clinical Medicine and <sup>2</sup>Quality and Safety in Healthcare, Fujita Health University Hospital, <sup>3</sup>Department of Pediatrics, Fujita Health University School of Medicine, <sup>4</sup>Department of Bacteriology II, National Institute of Infectious Diseases

Japanese Journal of Infectious Diseases 68(1), 75-76, 2015

Multidrug resistance in gram-negative bacilli is particularly important clinically. Metallo- $\beta$ -lactamase (MBL) can break down almost all  $\beta$ -lactam antibiotics, including carbapenems. We report the isolation of an IMP-1-type MBL producing strain of the *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Agona from the feces of a male

inpatient. In 2012, the patient was hospitalized at the Department of Pediatrics, Fujita Health University Hospital, to undergo treatment for iatrogenic adrenocortical insufficiency. On day 12 of hospitalization, he developed diarrhea, and a stool culture was performed. The stool sample was cultured at 35°C under aerobic

conditions for 18 h and revealed the presence of *Salmonella* spp. The serotype was identified as O4:G:-; therefore, the strain was typed as *Salmonella* Agona. The strain was susceptible to IPM but resistant to many  $\beta$ -lactam antibiotics, including CAZ. In addition, the results of the MBL detection test were positive. PCR was performed to

determine the MBL type. In the test, the IMP-1 gene was amplified. Gene sequencing results showed that the IMP-1 gene (accession no. S71932) was matched with a 100% probability. The IMP-type MBL gene was first reported in Japan in 1994. This is the first report of the clinical isolation of an MBL-producing *Salmonella* spp.

## 農産物中残留農薬の多成分系統分析法の開発及び普及

上野英二

日本農薬学会誌 40(2) : 178-187, 2015

近年、食品を取り巻く重大事案が相次いで発覚し、「食」の安心・安全への関心がこれまで以上に高まっている。こうした情勢に対処するため、農薬取締法が改正されて罰則などが強化された。さらに、食品安全基本法が制定されるとともに、食品衛生法も大きく改正されてポジティブリスト制度が導入された。この新たな制度に対応するために、残留モニタリングデータを統計学的に解析して対象農薬を的確に選択したうえで、物性の異なる多くの農薬成分を簡便に効率よく一斉に抽出する方法、多くの農薬成分で損失が少なく、かつ分析上妨害となる

夾雑物を効果的に除去する精製法、および分離特性の異なる複数のクロマトグラフィーに、質量分析を第一選択として特異的な複数の検出法を組み合わせた多成分系統分析法の開発を進めた。本稿では多成分系統分析法の概要について解説したのち、冷凍ギョーザ事案を受けて、厚生労働省からの依頼により開発したメタミドホスを含む一斉分析法、さらに標準品を用いることなく、より広範の農薬成分のスクリーニング定量を可能とするマルチ定量データベースを用いた GC-MS による網羅的分析法について紹介した。

## Development and diffusion of a systematic method for determining multiple pesticide residues in agricultural products

Ueno E

Journal of Pesticide Science, 40(3) : 165-172, 2015

In Japan, the Positive List System for the regulation of agricultural chemical residues in foods has been in force since May 29, 2006.

Moreover, food poisoning caused by methamidophos-laced frozen gyōza dumplings came to light on Jan. 30, 2008.

The news has set off alarms about the safety of not only perishables but also unexpected pesticides in processed foods. Therefore, a reliable systematic method was developed for determining pesticide residues in various foods. Firstly, ca. 200 target pesticides were selected by statistically analyzing the monitoring data in Aichi Prefecture. Secondly, a systematic method using plural separation and detection systems combining GC-MS/MS and LC-MS/MS as first priority was constructed. As the sample preparation method corresponding to the systematic

method, a simple and easy acetonitrile extraction method, an auto-cleanup system combining GPC and mini-column SPE were developed. Thirdly, a new official multi-residue method that is able to determine a wide range of pesticides in various foods including fatty processed foods was developed. And finally, a comprehensive chromatographic detection system by dual-column GC-MS(MS) and an interactive database without the use of pesticide standards was commercialized.

## ELISA キットによる野菜・果実中残留農薬分析の妥当性評価の試み

山崎朋美<sup>1</sup>、井上知美、平川由紀<sup>1</sup>、三宅司郎<sup>1,2</sup>、上野英二、斎藤勲<sup>3</sup>

<sup>1</sup>公益財団法人京都高度技術研究所、<sup>2</sup>株式会社堀場製作所、<sup>3</sup>公益財団法人科学技術交流財団  
食品衛生学雑誌 56(6) : 240-246, 2015

市販の5種類の農薬測定ELISAキット(アセタミプリド、アゾキシストロビン、クロロタロニル、フェニトロチオン、イミダクロプリド)について、6種類の農産物を用いた残留農薬分析の妥当性評価と、その分析結果に影響を与えるELISAの反応特性を解析した。その結果、真度は91~162%、併行精度は2.1~16.2%、室間再現精度は4.0~20.3%であり、農産物との組み合わせ30例中18例(60%)が厚生労働省

通知の妥当性評価ガイドラインに基づく目標値を達成した。また、ELISA測定では、毎回検量線を置くことが重要であった。さらに、農産物のマトリックスやピペット操作が測定結果に影響を及ぼすことが分かった。これらの特性を十分に把握したうえで測定に供することで、機器分析では対応しにくい圃場、集荷場、流通などオンサイトでの活用が期待される。

## ポリエチレンテレフタレート製器具・容器包装におけるアンチモンおよびゲルマニウム溶出試験の試験室間共同試験

村上亮<sup>1</sup>、六鹿元雄<sup>2</sup>、阿部孝<sup>3</sup>、阿部裕<sup>2</sup>、大坂郁恵<sup>4</sup>、大野春香、大野浩之<sup>5</sup>、大野雄一郎<sup>6</sup>、尾崎麻子<sup>7</sup>、柿原芳輝<sup>8</sup>、河崎裕美<sup>2</sup>、小林尚<sup>9</sup>、柴田博<sup>10</sup>、城野克広<sup>11</sup>、関戸晴子<sup>12</sup>、菌部博則<sup>13</sup>、高坂典子<sup>14</sup>、但馬吉保<sup>15</sup>、田中葵<sup>16</sup>、田中秀幸<sup>11</sup>、野村千枝<sup>17</sup>、羽石奈穂子<sup>18</sup>、疋田晃典<sup>19</sup>、三浦俊彦<sup>20</sup>、

渡辺一成<sup>21</sup>、穠山浩<sup>2</sup>

<sup>1</sup>(公社)日本食品衛生協会、<sup>2</sup>国立医薬品食品衛生研究所、<sup>3</sup>(一財)日本食品分析センター、<sup>4</sup>埼玉県衛生研究所、<sup>5</sup>名古屋市衛生研究所、<sup>6</sup>(一財)千葉県薬剤師会検査センター、<sup>7</sup>大阪市立環境科学研究所、<sup>8</sup>(一財)日本穀物検定協会、<sup>9</sup>(一財)食品分析開発センターSUNATEC、<sup>10</sup>(一財)東京顕微鏡院、<sup>11</sup>(独)産業技術総合研究所、<sup>12</sup>神奈川県衛生研究所、<sup>13</sup>(一財)日本文化用品安全試験所、<sup>14</sup>(一財)食品薬品安全センター秦野研究所、<sup>15</sup>(一財)食品環境検査協会、<sup>16</sup>(一社)日本海事検定協会、<sup>17</sup>大阪府立公衆衛生研究所、<sup>18</sup>東京都健康安全研究センター、<sup>19</sup>長野県環境保全研究所、<sup>20</sup>(一財)日本冷凍食品検査協会、<sup>21</sup>(一財)化学研究評価機構  
食品衛生学雑誌 56(2):57-67, 2015

ポリエチレンテレフタレート製器具・容器包装のアンチモン(Sb)およびゲルマニウム(Ge)溶出試験における各測定法の性能を評価するため、試験室間共同試験を行った。当試験には18機関が参加し、濃度非明示の3検体(各2測定)について電気加熱方式原子吸光度法(GF-AAS)、誘導結合プラズマ発光強度測定法(ICP-OES)および誘導結合プラズマ質量分析法(ICP-MS)によりSbおよびGeの定量を行った。その結果、GF-AASおよびICP-OESでは、真度が98~107%、併行精度(RSDr)が1.7~7.5%、室間

再現精度(RSDR)が2.0~18.8%であり、これらの性能は規格試験法として十分であった。また、ICP-MSでは、真度が99~106%、RSDrが0.7~2.2%、RSDRが2.2~10.5%であり、代替法として適用可能であった。しかし、一部の試験機関ではSbの定量値が添加量よりも高かった。その一因として、検量線溶液中のSbがガラス器具に吸着したためと考えられた。そのため、Sbの試験を行う場合には、検量線溶液の濃度について細心の注意を払う必要があると考えられた。

## ゴム製器具・容器包装における亜鉛試験の試験室間共同試験

柴田博<sup>1</sup>、六鹿元雄<sup>2</sup>、阿部裕<sup>2</sup>、伊藤禎啓<sup>3</sup>、大坂郁恵<sup>4</sup>、大野春香、大野浩之<sup>5</sup>、大野雄一郎<sup>6</sup>、尾崎麻子<sup>7</sup>、柿原芳輝<sup>8</sup>、小林尚<sup>9</sup>、城野克広<sup>10</sup>、関戸晴子<sup>11</sup>、菌部博則<sup>12</sup>、高坂典子<sup>13</sup>、但馬吉保<sup>14</sup>、田中葵<sup>15</sup>、田中秀幸<sup>10</sup>、中西徹<sup>16</sup>、野村千枝<sup>17</sup>、羽石奈穂子<sup>18</sup>、疋田晃典<sup>19</sup>、三浦俊彦<sup>20</sup>、山口未来<sup>2</sup>、渡辺一成<sup>21</sup>、穠山浩<sup>2</sup>

<sup>1</sup>(一財)東京顕微鏡院、<sup>2</sup>国立医薬品食品衛生研究所、<sup>3</sup>(公社)日本食品衛生協会、<sup>4</sup>埼玉県衛生研究所、<sup>5</sup>名古屋市衛生研究所、<sup>6</sup>(一財)千葉県薬剤師会検査センター、<sup>7</sup>大阪市立環境科学研究所、<sup>8</sup>(一財)日本穀物検定協会、<sup>9</sup>(一財)食品分析開発センターSUNATEC、<sup>10</sup>(独)産業技術総合研究所、<sup>11</sup>神奈川県衛生研究所、<sup>12</sup>(一財)日本文化用品安全試験所、<sup>13</sup>(一財)食品薬品安全センター秦野研究所、<sup>14</sup>(一財)食品環境検査協会、<sup>15</sup>(一社)日本海事検定協会、<sup>16</sup>(一財)日本食品分析センター、<sup>17</sup>大阪府立公衆衛生研究所、<sup>18</sup>東京都健康安全研究センター、<sup>19</sup>長野県環境保全研究所、<sup>20</sup>(一財)日本冷凍食品検査協会、<sup>21</sup>(一財)化学研究評価機構  
食品衛生学雑誌 56(3):123-131, 2015



食品衛生法におけるゴム製器具・容器包装の亜鉛 (Zn) 試験法の性能を評価するため、水または4%酢酸による亜鉛溶液6種を検体として用いた試験室間共同試験を行った。当試験には18機関が参加し、濃度非明示の6検体(各2測定)についてフレーム方式原子吸光光度法、誘導結合プラズマ発光強度測定法および誘導結合プラズマ質量分析法により Zn の定量を行っ

た。その結果、いずれの測定法においても真度が97~103%、併行精度 (RSDr) が0.7~4.9%、室間再現精度 (RSDR) が1.7~8.9%であり、性能パラメーターの値は目標値(真度:80~110%、RSDr:10%以下、RSDR:25%以下)を満たしており、規格試験法として十分な性能を有していることが判明した。

## ヘッドスペース - ガスクロマトグラフ質量分析計による水道水中のシアン化物イオン及び塩化シアン測定法の開発

富田浩嗣、金涌えり、小島美千代、小池恭子、猪飼誉友

水道協会雑誌 84(7):16-23, 2015

水道水中のシアン化物イオン (CN<sup>-</sup>) 及び塩化シアン (CNCI) をより効率的に検査することを目的に、混合標準液の調製及びヘッドスペース-ガスクロマトグラフ質量分析 (HS-GC/MS) による測定法を開発した。混合標準液については、告示法に従って調製した CNCI 標準液にアスコルビン酸ナトリウムを加えて残存する塩素化剤を除去した後、CN 標準液と混和することにより、調製が可能となった。HS-GC/MS による測定では、カラムに GS-GasPro を、内部標準に

H<sup>13</sup>C<sup>15</sup>N 及び <sup>13</sup>C<sup>15</sup>NCI を用いることにより、HCN 及び CNCI を高い精度及び十分な感度で同時分析することが可能となった。給水栓水への添加回収試験を0.0005及び0.005 mg/L で実施した結果、真度として93.6~103.6%、併行精度として0.7~3.2%、室内精度として1.3~5.4%が得られ、いずれも水道水質検査方法の妥当性評価ガイドラインに示された目標を満たした。

## Blue color formation of cyanobacteria during lysis process under natural conditions

Arii S<sup>1</sup>, Tsuji K<sup>2</sup>, Tomita K, Hasegawa M<sup>1</sup>, Bober B<sup>1,3</sup>, Harada K-I<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Graduate School of Environmental and Human Science and Faculty of Pharmacy, Meijo University, <sup>2</sup>Kanagawa Prefectural Institute of Public Health, <sup>3</sup>Department of Plant Physiology and Development, Jagiellonian University

Applied and Environmental Microbiology 81(8):2667-2675, 2015

Cyanobacteria produce numerous volatile organic compounds (VOCs), such as β -

cyclocitral, geosmin and 2-methylisoborneol, which show a lytic activity against cyanobacteria. Among these compounds, only  $\beta$ -cyclocitral causes a characteristic color change in the culture broth from green to blue (blue color formation) during the lysis process. In August 2008 and September 2010, the lysis of cyanobacteria involving the blue color formation was observed at Lake Tsukui in the north of Kanagawa Prefecture, Japan. We collected lake water containing the cyanobacteria and investigated the VOCs, such as  $\beta$ -cyclocitral,  $\beta$ -ionone, 1-propanol, 3-methyl-1-butanol and 2-phenylethanol, as well as the number of cyanobacterial cells, their damage and pH changes. As a result, the following results were confirmed: the detection of several VOCs including  $\beta$ -cyclocitral and its oxidation product, 2,2,6-

trimethylcyclohexene-1-carboxylic acid; the identification of phycocyanin based on its visible spectrum; the lower pH (6.7 and 5.4) of the lysed samples; and characteristic morphological change in the damaged cyanobacteria cells. We also encountered the same phenomenon on September 6, 2013 in Lake Sagami, and obtained almost similar results, such as blue color formation, decreasing pH, damaged cells and detection of VOCs, including the oxidation products of  $\beta$ -cyclocitral.  $\beta$ -Cyclocitral derived from *Microcystis* has a lytic activity to *Microcystis* itself, but would have a stronger inhibitory activity against other cyanobacteria and algae, suggesting that the VOC plays an important role in the ecology of aquatic environments.

編集情報運営委員会

委員長 : 山本 恵二 (研究監)  
委員 : 井村 守邦 (総務課)  
広瀬かおる (企画情報部)  
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)  
長谷川晶子 (生物学部・医動物研究室)  
梅村 優子 (衛生化学部・医薬食品研究室)  
山本 優子 (衛生化学部・生活科学研究室)

愛知県衛生研究所報

第66号

平成28(2016)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)