

愛知県衛生研究所報

第73号 令和5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3報) - 中村瑞那、長瀬智哉、竹島雅之、安井善宏1
愛知県におけるアデノウイルス検出状況及び分離株の遺伝子解析 廣瀬絵美、安達啓一、中村範子、新美 瞳、青山文生、佐藤穂奈美、 皆川洋子、齋藤典子、安井善宏、伊藤 雅、佐藤克彦9
2009年から2020年に愛知県内で分離された腸管出血性大腸菌 0157、026 及び 0111 の 反復多型配列解析 (MLVA) 法による解析 松田達也、高橋佑太、山田和弘、都築秀明、佐藤克彦18
カビ毒デオキシニバレノール及びその類縁体の一斉分析法の開発 森 久人、舘 昌彦、上野英二、富田浩嗣、棚橋高志26
室内環境中におけるピレスロイド系ワンプッシュ式殺虫剤についての検討 山本優子、青木梨絵、神徳好美、續木洋一、上山 純 ¹ 、棚橋高志 ¹ 名古屋大学大学院医学系研究科34
他誌掲載論文抄録43

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

Volume 73, March 2023

Contents

Original Papers

Estimation of the future epidemiological situation of tuberculosis incidence in
Japan and Aichi Prefecture - Third report –1

Mizuna Nakamura, Tomoya Nagase, Masayuki Takeshima, Yoshihiro Yasui

Detection of Adenovirus in Aichi Prefecture and Genetic Analysis of Isolates

..... 9

Emi Hirose, Hirokazu Adachi, Noriko Nakamura, Hitomi Niimi, Fumio Aoyama,
Honami Sato, Hiroko Minagawa, Noriko Saito, Yoshihiro Yasui, Miyabi Ito,
Katsuhiko Sato

Multiple-Locus Variable-number tandem repeat Analysis (MLVA) of enterohemorrhagic
Escherichia coli O157, O26 and O111 isolated in Aichi Prefecture from 2009 to
202018

Tatsuya Matsuda, Yuta Takahashi, Kazuhiro Yamada, Hideaki Tsuzuki,
Katsuhiko Sato

Development of simultaneous analysis method for mycotoxin deoxynivalenol and
its analogues26

Hisato Mori, Masahiko Tachi, Eiji Ueno, Koji Tomita, Takashi Tanahashi

A study of pyrethroid one-push insecticides in indoor environments

.....34

Yuko Yamamoto, Rie Aoki, Yoshimi Shintoku, Hirokazu Tsuzuki, Jun Ueyama¹,
Takashi Tanahashi

¹Nagoya University Graduate School of Medicine

Summaries of papers accepted to other journals43

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3報） -

中村瑞那、長瀬智哉、竹島雅之、安井善宏

要 旨

2021年のわが国の新登録結核患者罹患率は人口10万人あたり9.2と、低まん延の基準である罹患率10未満を初めて達成した。一方で、愛知県の2021年罹患率は人口10万人あたり11.7と、依然として全国より高い状況にある。

われわれは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、結核新登録患者数の将来予測を第1報、第2報として報告してきた。第2報の推計値と実測値を比較したところ、良好な結果が得られたため、同じモデルを用い、最新のデータを加えて改めて2040年までの将来予測を行った。その結果、愛知県で罹患率が初めて10を下回り低まん延状態に到達するのは、全国より5年遅れて2026年（罹患率9.5）であると予測された。将来の結核罹患者は益々85歳以上の高齢者へと偏る一方で、20-34歳の若い世代の占める割合も相対的に拡大すること、また罹患者に占める男性の割合は減少していくことが予測された。

キーワード：結核、罹患率、将来予測

序 文

わが国の人口10万人あたりの新登録結核患者罹患率（以下、罹患率）は2021年に9.2¹⁾と、世界保健機関（WHO）が低まん延状態とする罹患率10.0²⁾未満を初めて達成した。一方で、欧米等先進諸国の2021年罹患率は、アメリカ2.2、ドイツ4.5、オーストラリア5.6等と日本より低い³⁾。2021年の日本の結核新登録患者数（以下、罹患数）は11,519人、結核による死亡数は1,844人（概数）であり¹⁾、今なお日本において結核は特に対策が必要な感染症の一つと言える。

名古屋市を含む愛知県（以下、愛知県）の2021年罹患数は880人、罹患率は11.7で

あった⁴⁾。愛知県結核対策プラン（2017年2月改正⁵⁾）に掲げられた2020年までの目標罹患率12.0以下を一年遅れで達成したものの、愛知県の罹患率は依然として全国より高く、都道府県別でワースト5位という状況である¹⁾。

われわれは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、罹患率の将来予測を行い、2012年に指数回帰モデルによる第1報⁶⁾、2016年に減少速度を用いたモデルによる第2報⁷⁾を報告した。本稿では第3報として、第2報の推計値の妥当性を確認し、また最新のデータを用いて2040年までの将来予測を行ったので報告する。

資料

全国、愛知県について、性別・年齢5歳階級別の下記データを使用した。

罹患数[1987～2021年]：公益財団法人結核予防会結核研究所(以下、結核研究所)疫学情報センター公開データ⁴⁾

人口[1987～2021年]：総務省統計局「国勢調査結果」「人口推計」⁸⁾、愛知県統計課「愛知県人口動向調査結果」⁹⁾

将来推計人口[2025～2040年]：国立社会保障・人口問題研究所「将来推計人口・世帯数」¹⁰⁾による中位推計人口(全国：2017年推計、都道府県別：2018年推計)

方法

将来の結核罹患率を、第2報⁷⁾と同様、結核研究所の全国の将来予測方法¹¹⁾に準じて2025～2040年まで5年間隔で推計した。1987～2020年の罹患数及び人口から性別・年齢階級別罹患率を算出した上で、1990～2020年の5年間隔の罹患率から性別・年齢階級別に年平均罹患率減少速度を算出し、過去の罹患率の傾向が今後も継続すると仮定して推計した。

減少速度の算出方法については2種類のモデル(A・B)を設定し、モデルAでは5年前の同じ年齢階級別罹患率との比較、モデルBでは出生コホートの考え方から5年前の5歳若い年齢階級別罹患率との比較により算出した。モデルAについては、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のち直線回帰式から求めた減少速度を使用した。なお一部の年齢階級については表1のとおり将来の減少速度の重み付けを行い、将来の推計罹患率の減少のスピードを抑えた。

観察期間は2期間を設定した。期間1は1987～2020年(電算化結核サーベイランス開始後)、期間2は1998～2020年(活動性分類変更後)とした。なお「緊急事態宣言」の影響で患者数が増加した1999年データは、将来予測の算出においては除外した。

また2020年の罹患率について、実測値と

は別に、将来予測の起点となる推計罹患率(性別・年齢階級別に罹患率を指数変換して直線回帰式から求めたもの)を算出した。この性別・年齢階級別2020年推計罹患率を起点として、各モデルで求めた減少速度を当てはめて、2020年以降の罹患率を5年間隔で推計した。

この推計を、A・Bモデルと観察期間1・2の組み合わせによる4種類で行い、求めた性別・年齢階級別推計罹患率(2025年、2030年、2035年、2040年)に将来推計人口を乗じて推計罹患数を算出し、これを合わせて全体の推計罹患率を得た。また推計の代表値として、中央の2種類の推計(モデルA-観察期間2、モデルB-観察期間1)の平均をとったミックスモデルを採用した。

続けて、以上より得られた5年間隔の推計罹患率(全体の罹患率)を元に、その間の各年の罹患率を推計した。各年の罹患率の減少割合[(X年の罹患率)/(X-1年の罹患率)]が、5年間隔の間で常に同じであると仮定して算出した。例えば、2025年→2026年、2026年→2027年、・・・、2029年→2030年の罹患率の減少割合が同じであると仮定して、2025年と2030年の推計罹患率を用いて各年の罹患率を推計した。ただし、2022～2024年の各年罹患率は、2021年の実測罹患率と2025年の推計罹患率を元に推計した。

表1 将来の減少速度の重み付け

年齢階級	重み付け		考慮した事情
	男	女	
20-24	0.8	0.8	外国生まれの患者の割合の増加
25-29	0.9	0.9	
50-54	0.9	-	住所不定者の状況
55-59	0.8	-	
85-	0.7	0.7	結核既感染者の高齢化等

(重み付けの数値は文献¹¹⁾による)

結 果

1 第2報の推計値と実測値との比較(表2)

第2報⁷⁾(2016年3月の報告)では1987～2013年の罹患データに基づき将来予測を実施した。その第2報の推計値(ミックスモデル)と実測値との比較を2015年及び2020年について表2に示す。

全国、愛知県ともに、罹患率と罹患数について第2報の推計値/実測値を算出したところ、0.90～0.98の範囲であり、実測値との誤差は10%以内に収まっていた。特に愛知県については、第2報の推計値/実測値は0.95～0.98と、実測値との誤差は5%以内となっていた。

2 本報で算出した将来予測

1) 全国、愛知県における将来推計罹患率(図1)

全国及び愛知県における結核罹患率の実測値及び推計値を図1に示す。

愛知県における推計罹患率は、2022年(罹患率11.3)から2040年(罹患率4.1)まで緩やかに減少しているが、全期間において全国値を上回った。

また、愛知県の罹患率は2026年に9.5と、初めて低まん延レベル(罹患率10.0未満)を達成すると予測された。

2) 愛知県における将来の罹患者の性比及び年齢分布(図2、3、4)

愛知県の罹患者の性別・年齢階層別割合について、2020年の実測値及び2040年の推計値を図2に示す。なお2040年推計値については、期間1、期間2の差は僅かであったため、それぞれを平均したモデルA、モデルBでの割合を示している。

2020年実測値と2040年推計値(モデルA)を比較すると、80代以上の割合が大きく増

加していた(男40.9%→59.3%、女44.8%→56.4%)。さらに80代以上について詳細を確認したところ(データは図示せず)、80-84歳の割合は減少していた(男16.8%→9.7%、女12.8%→6.6%)。一方で85歳以上の割合は大きく増加しており(男24.1%→49.6%、女32.0%→49.9%)、2040年推計値(モデルA)では男女とも罹患者の半数近くが85歳以上であった。

2020年実測値と2040年推計値(モデルB)を比較すると、20代の割合(男9.6%→21.6%、女12.0%→30.9%)及び30代の割合(男3.9%→17.9%、女9.5%→19.4%)が特に大きく増加していた。

また、愛知県の性別・年齢階級別罹患者数について、2020年の実測値及び2040年の推計値(ミックスモデル)を図3に示す。2020年実測値では85歳以上(251人)が最も多く、次いで80-84歳(141人)、75-79歳(111人)と高齢者の人数が多い状況であったが、2040年の推計では、高齢者の中でも85歳以上(107人)への偏在化が顕著となっていた。また2040年の推計値では、20-34歳の若い世代の罹患者数(20-24歳:23人、25-29歳:27人、30-34歳:19人)が80-84歳の罹患者数(19人)と同程度か超えており、若い世代の割合の相対的な増加が確認された。また、このような若い世代では男性の割合の相対的な低下がみられ、2020年実測値から2040年推計値における男性の割合の変化は、20-24歳で54.1%[男20人、女17人]→52.2%[男20人、女17人]、25-29歳で56.7%[男34人、女26人]→40.7%[男11人、女16人]、30-34歳で54.8%[男17人、女14人]→47.4%[男9人、女10人]であった。

表2 第2報の推計値*と実測値との比較

		結核罹患率			結核罹患数		
		推計値*	実測値	推計値*/ 実測値	推計値*	実測値	推計値*/ 実測値
全国	2015年	13.0	14.4	0.90	16,414	18,280	0.90
	2020年	9.5	10.1	0.94	11,731	12,739	0.92
愛知県	2015年	15.7	16.0	0.98	1,172	1,199	0.98
	2020年	11.8	12.3	0.96	877	924	0.95

*推計値はすべて第2報(2016年3月報告)の値

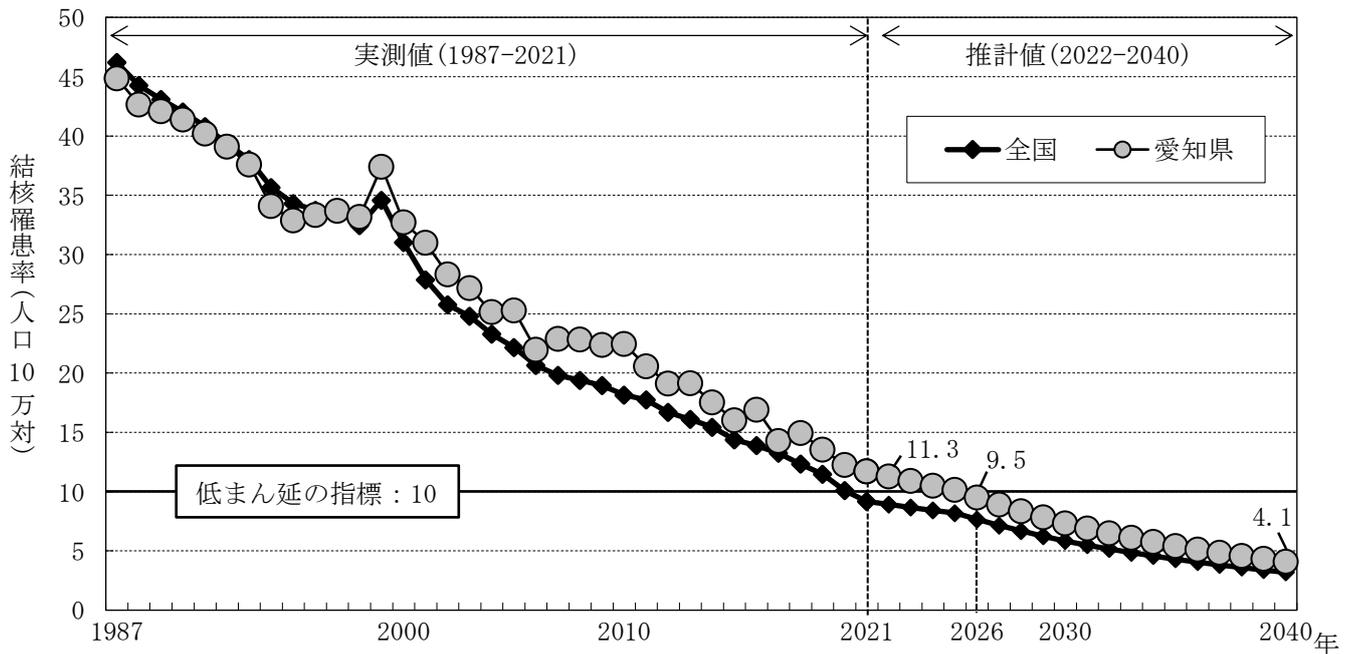


図1 結核罹患率の実測値（1987-2021年）と将来推計値（2022-2040年）

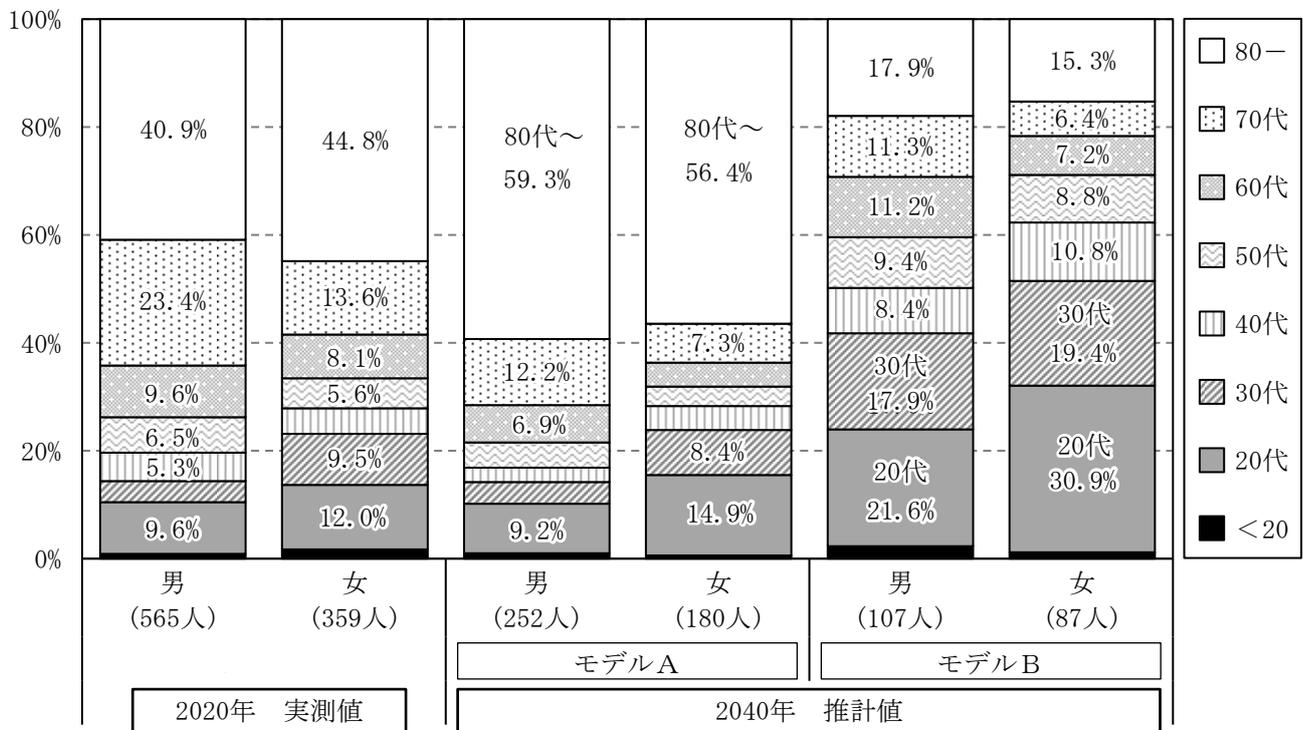


図2 結核罹患者の性別年齢階層別割合（愛知県）
 （2040年推計値については、期間1、期間2の平均値）

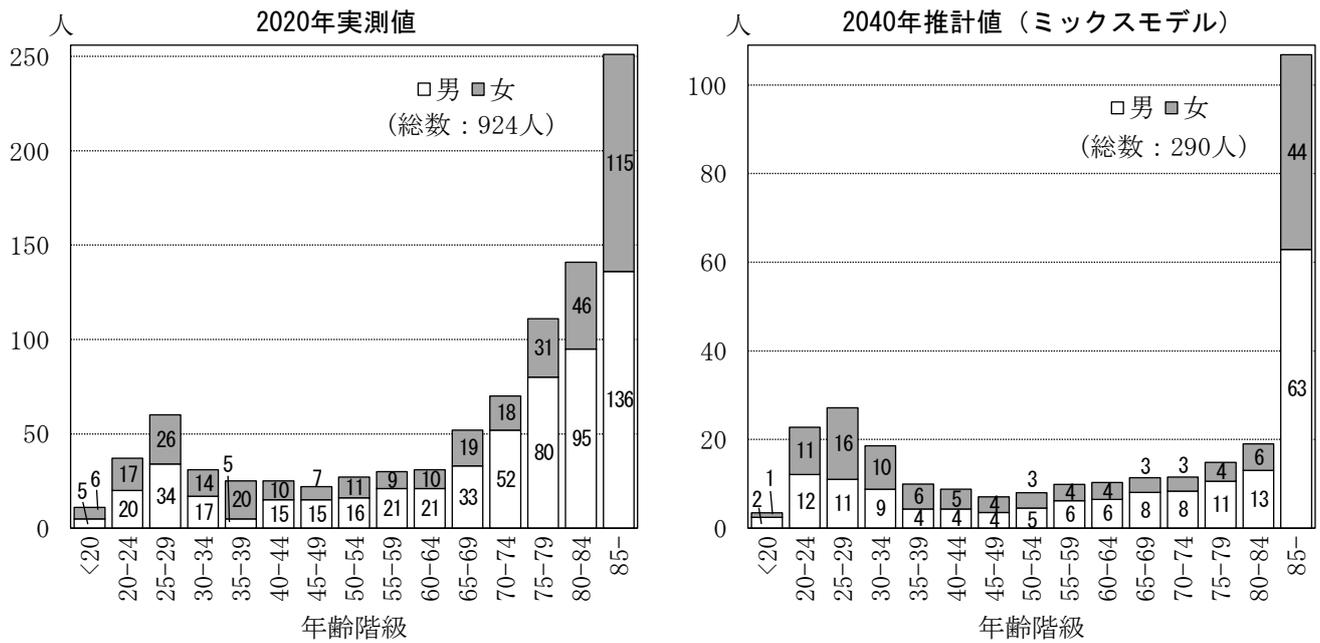


図3 性別・年齢階級別結核罹患数の実測値と推計値（愛知県）

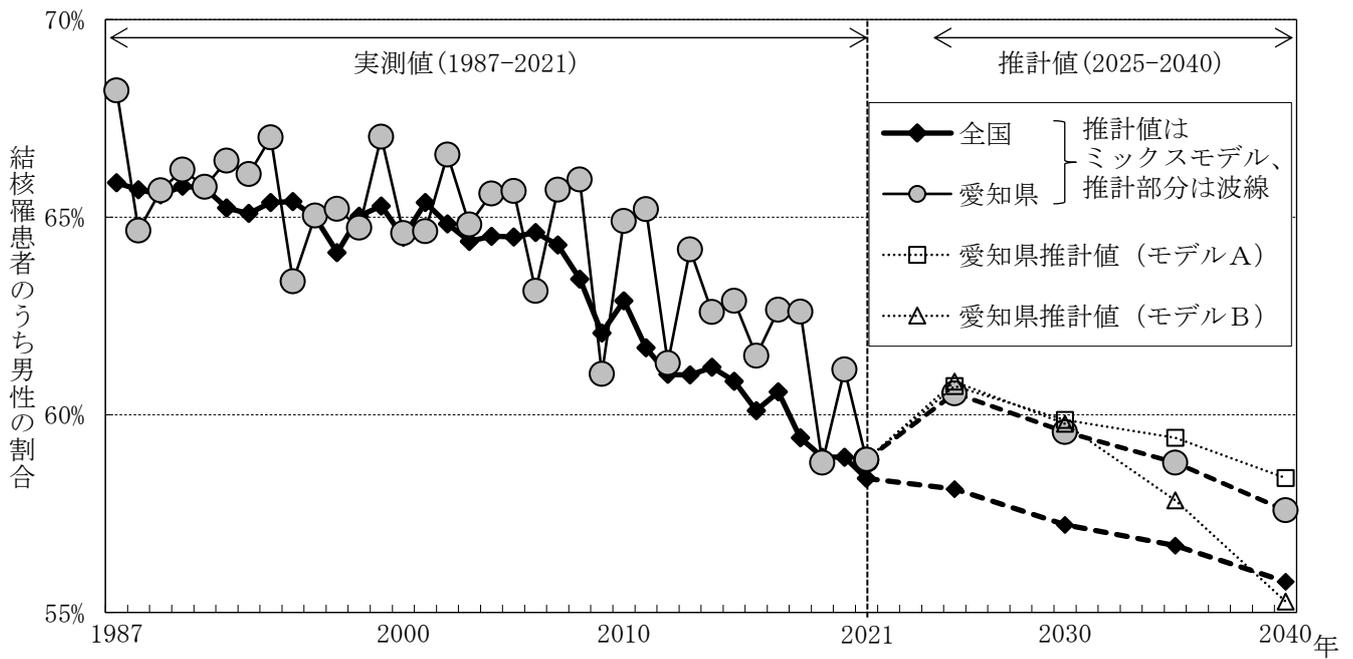


図4 結核罹患者に占める男性の割合の実測値と将来推計値
(モデルA、モデルBの推計値については、それぞれ期間1、期間2の平均値)

さらに、罹患者に占める男性の割合の推移について、実測値と推計値を図4に示した。近年の実測値では、全国、愛知県ともに緩やかに減少する傾向がみられており、また愛知県のほうが全国より高い傾向が続いていた。2040年までの推計値（ミックス

モデル）においても、緩やかな減少傾向及び愛知県が全国より高い傾向が続いた。さらに愛知県の推計値についてモデルA、モデルB（期間1、期間2の平均）の値を見ると、モデルAではより緩やかな減少が、モデルBではより急激な減少が観察された。

考 察

将来の結核対策のあり方を検討するにあたって、現状の結核対策を継続した場合に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罹患者が相対的に増加するのかといった予測は、有用な情報となり得る。

われわれは愛知県の罹患率について2012年に指数回帰モデルによる推計値を報告⁶⁾したが、このモデルによる愛知県の推計値は遠い未来になるほど実測値との乖離が観察されたため、2016年に減少速度を用いたモデルによる予測を報告⁷⁾した。本報はその2016年の報告による推計結果について検討したところ、比較的よい推計値が得られたと考えられたため、同様の方法を用いて最新のデータによる結核罹患の将来予測を試みた。

今回の推計では、愛知県の罹患率が低まん延の指標10.0を下回るのは、全国(2021年)より5年遅れて2026年になると予測された。

推計罹患者の性比及び年齢分布について、モデルA、モデルBに違いがみられるが、その理由となる各モデルの考え方の違いについては第2報⁷⁾で考察した。

今回、将来の愛知県の罹患者の特性として、モデルAで特に顕著である85歳以上の高齢者への益々の偏在化、モデルBで特に顕著である20代及び30代の占める割合の相対的な拡大が示唆された。わが国で高齢者の罹患数が多い理由としては、かつてわが国では罹患率が非常に高く(参考:1955年の結核既感染者率は推計54.6%¹²⁾)、このような時期に感染した既感染者が数十年を経て加齢に伴う免疫力の低下で発症したケースが多いものと考えられている^{13,14)}。罹患者が85歳以上の高齢者へ益々偏在化していくのは、既感染者率の高い世代が益々高齢化することを反映していると考えられた。また近年、結核患者に占める外国生まれの割合は若い世代で大きく増加しており、全国において20代で2012年37.0%→2021年73.5%、30代で2012年15.9%→2021年47.6%である¹⁵⁾。愛知県(名古屋

市を除く)においても同様の傾向が観察されており(データ非公開)、このような外国生まれ患者の割合の増加が、20代及び30代の罹患率の将来の減少を鈍化させる原因の一つであると考えられた。

また近年、罹患者に占める男性の割合が減少傾向にあるが、今回の推計ではこの傾向が将来にわたって続く結果となった。この理由として、20-34歳の若い世代の割合の増加及びこの世代における男性の割合の低下が考えられた。これは、高齢者への偏在化を特に示唆するモデルAでは男性の割合の低下が緩やかで、若い世代の割合増加を特に示唆するモデルBでは男性の割合の低下が急激であったことにも繋がる。また先述のとおり20代及び30代では外国生まれの患者の割合が大きく増加しており、さらに外国生まれの患者における男性の割合(全国)は2021年49.9%¹⁵⁾と罹患者全体での男性の割合58.4%⁴⁾より低いため、外国生まれの割合の増加が将来にわたる男性の割合の減少に繋がっていると考えられた。

ところで、2020年以降の結核罹患率については、新型コロナウイルス感染症の世界的な流行による影響があると考えられている。世界での罹患数は、2018年688万人、2019年712万人であったところ、2020年583万人と大きく減少し、2021年に642万人とまた増加している³⁾。WHOは2020年以降の罹患数の減少に、新型コロナウイルス感染症の流行に伴う影響(医療サービスの混乱等)による患者の見逃しがあると推測している³⁾。日本においても、2020年、2021年は新型コロナウイルス感染症流行の影響(定期健診や接触者健診の減少等)によって患者が見逃された可能性があることが指摘されている^{16,17)}。本報の将来予測は、過去の性別・年齢階級別罹患率の傾向が今後も続くとの仮定を前提としており、新型コロナウイルス感染症の流行による影響は考慮されていない。このため今回の推計値は今後の実測値と乖離する可能性もあるが、その乖離について検討することは、新型コロナウイルス感染症の流行の影響を考察する一助になると考えられる。

新型コロナウイルス感染症の流行の影響により結核患者の見逃しが増加した場合、今後の結核罹患率の増加に繋がる可能性が高いことが指摘されている³⁾。愛知県においても、新型コロナウイルス感染症対策と並行して結核対策を継続していく必要がある。今後も患者登録情報を活用した解析を継続的に行い、愛知県結核対策プラン策定等に有用な情報構築を実施していく。

文 献

- 1) 公益財団法人結核予防会結核研究所疫学情報センター：2021年結核登録者情報調査年報集計結果について（文章編） https://jata-ekigaku.jp/wp-content/uploads/2022/08/2021nenpo_bunsho.pdf
- 2) Clancy L, Rieder HL, Enarson DA, Spinaci S.: Tuberculosis elimination in the countries of Europe and other industrialized countries. *European Respiratory Journal* 4:1288-1295, 1991.
- 3) World Health Organization: Global tuberculosis report 2022. <https://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/tb-reports/global-tuberculosis-report-2022>
- 4) 公益財団法人結核予防会結核研究所疫学情報センター：年報（属性別） https://jata-ekigaku.jp/rit/ekigaku/toukei/pertinent_material/
- 5) 愛知県：愛知県結核対策プラン，2017年2月。 <https://www.pref.aichi.jp/uploaded/attachment/230714.pdf>
- 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) 中村瑞那、續木雅子、大参寛典、森 一明、広瀬かおる、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(第2報)－。愛知県衛生研究所報 66:1-9, 2016.
- 8) 総務省統計局：人口推計の結果の概要 <https://www.stat.go.jp/data/jinsui/2.html>
- 9) 愛知県県民文化局県民生活部統計課：愛知県の人口 愛知県人口動向調査結果 <https://www.pref.aichi.jp/soshiki/toukei/jinkolnew.html>
- 10) 国立社会保障・人口問題研究所：将来推計人口・世帯数 <https://www.ipss.go.jp/syoushika/tohkei/Mainmenu.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) 公益財団法人結核予防会結核研究所疫学情報センター：結核既感染者数の推計。2009. https://jata-ekigaku.jp/wp-content/uploads/2021/10/arc_kikansen.pdf
- 13) 四元秀毅，倉島篤行，永井英明：結核 Up to Date 改訂第4版。2019，南江堂，東京。
- 14) 四元秀毅，山岸文雄，永井英明，長谷川直樹：医療者のための結核の知識 第5版。2019，医学書院，東京。
- 15) 公益財団法人結核予防会結核研究所疫学情報センター：結核発生動向概況・外国生まれ結核。2022. https://jata-ekigaku.jp/wp-content/uploads/2022/09/2021_1.pdf
- 16) 内村和広：結核の統計 2021 を読む～新型コロナウイルス感染症流行の 2020 年結核統計への影響～。複十字 400:6-7, 2021.
- 17) 大角晃弘：結核の統計 2022 を読む－結核低蔓延から結核 0(ゼロ)を目指して－。複十字 406:4-6, 2022.

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

- Third report -

Mizuna Nakamura, Tomoya Nagase, Masayuki Takeshima, Yoshihiro Yasui

Although most European and other industrialized countries have already reduced their burden of tuberculosis(TB) disease to fewer than 10 cases per 100,000 population per year, TB incidence rate in Japan reached the same level (9.2) in 2021. On the other hand, the TB incidence rate in Aichi Prefecture has been higher than the national rate. In order to clarify the emerging/urgent issues of TB control and eventual elimination, we reported in 2012 and 2016 the estimation of TB incidence rates in Aichi Prefecture. Furthermore, TB incidence rates were estimated for the years 2022 to 2040, on the basis of annual report of TB registrations observed past trends (1987-2020). The TB incidence rate in Aichi Prefecture will reach the level of low-burden countries in 2026. The predicted future TB incidence rate, which was 11.7 per 100,000 population as of 2021, would continuously decrease to reach 9.5 in 2026, 4.1 in 2040, respectively. The future TB incidence rate (2022-2040) in Aichi Prefecture will continue to be higher than the national rate. The age composition of TB patients will be dominated by later-stage elderly (i.e., 85 years or older) patients, followed by the young adult (i.e., 20-34 years old) in 2040.

Key words : tuberculosis, incidence rate, estimation

調 査 研 究

愛知県におけるアデノウイルス検出状況及び 分離株の遺伝子解析

廣瀬絵美、安達啓一、中村範子、新美 瞳、青山文生、佐藤穂奈美、
皆川洋子、齋藤典子、安井善宏、伊藤 雅、佐藤克彦

要 旨

ヒトアデノウイルス (human adenovirus: HAdV) は咽頭結膜熱、感染性胃腸炎、呼吸器感染症など common diseases から、流行性角結膜炎、出血性膀胱炎、脳炎、肝炎など多様な疾患を引き起こす病原ウイルスである。2015年1月から2022年9月の期間に感染症発生動向調査事業等の目的で搬入された検体について HAdV の検出を試みた。2019年以前と比較し、新型コロナウイルス感染症の流行がみられた2020年から2022年にかけて検体数及び HAdV 検出数ともに減少した。しかしながら、2022年5月以降は感染性胃腸炎の患者数及び HAdV 検出数とも増加しており、例年に比べて HAdV-41 の検出率が高く、今後の動向を注視していく必要がある。

近年は遺伝子の塩基配列解析がウイルスの型別に利用されるようになり、国内外から塩基配列に基づく新規 HAdV の検出が報告されている。そこで、過去のウイルス分離株26株を用いて遺伝子解析を実施したところ、中和試験により当初 HAdV-6 と血清型別された2株のヘキソン領域の遺伝型は HAdV-57 と型別された。このことから、過去(1995年から2012年)に血清型 HAdV-6 と同定された分離株の中に HAdV-57 が混在している可能性が示唆された。さらに、これらの株は1997年、1998年に検出されており、HAdV-57 初検出と報告のある2001年以前から愛知県において侵淫していた可能性が考えられた。

キーワード：アデノウイルス、感染症発生動向調査、ウイルス分離

序 文

ヒトアデノウイルス (human adenovirus: HAdV) は、咽頭結膜熱、流行性角結膜炎等の眼疾患、上気道炎・下気道炎等の呼吸器疾患、感染性胃腸炎等の消化器疾患の病原体として知られている。この他にも、出血性膀胱炎、脳炎や肝炎などの重篤な感染症の原因となることが報告されている¹⁾。また、HAdV は A~G 種の7種に分類されており、種により引き起こす疾患との関連がみられる。例えば、咽頭炎・肺炎、咽頭結膜

熱などの急性呼吸器疾患には B 種に分類される HAdV-3 や-7 が、咽頭炎や扁桃炎などの急性呼吸器疾患には C 種の HAdV-1、-2、-5、-6 が、感染性胃腸炎には A 種の HAdV-31 や F 種の HAdV-40、-41 が関連している。わが国における HAdV の検出状況は国立感染症研究所の報告にまとめられている²⁾。近年、東南アジアや東アジアでは HAdV-7 による重症呼吸器疾患の流行が報告³⁾されており、集団発生などの流行状況にも注意が必要なウイルスである。また、2022年4月

には主に欧州から原因不明の小児重症急性肝炎患者が多数報告⁴⁾され、HAdVとの関連が示唆されたものの、いまだ不明な点が多い。

HAdVはエンベロープを持たない2本鎖DNAウイルスで、物理化学的な抵抗性が強いウイルスである。表面蛋白はヘキソン、ペントンベース及びファイバーから構成されており、中和決定領域はヘキシソンのLoop領域に存在している。2022年現在、HAdVには110以上の型が存在し⁵⁾、その型別も複雑である。従来は分離ウイルスに対して抗血清を用いた中和試験により血清型を決定する方法が一般的であり、HAdV-51までは血清型として報告されてきた。2007年以降、国内外で遺伝子組換え等に基づいた新しい型が多く報告され、HAdV-52以降は全塩基配列の決定により遺伝型として報告されることとなった¹⁾。このように型別方法が修正されることになったため、HAdVの検出方法を記した「咽頭結膜熱・流行性角結膜炎 検査、診断マニュアル」⁶⁾では、中和抗原決定基であるヘキシソンのLoop領域を含む塩基配列決定法を組み入れることを推奨している。

愛知県では感染症発生動向調査事業の5類定点把握対象疾患の一部を中心に病原体検索を実施している。なかでもHAdVは検索対象となる主要な病原ウイルスの一つであり、当所で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HAdV遺伝子検出を実施している。著者らは2016年に2009～2015年の患者検体からHAdVを検出した成績⁷⁾を報告し、当時新しい遺伝型であったHAdV-53、HAdV-54及びHAdV-56型が愛知県内に侵淫していることを明らかにした。

本稿では2015年1月から2022年9月までの期間に採取された検体におけるHAdV検出状況を報告する。さらに、過去の分離同定株に他の型が混在している可能性が考えられるため、1995年から2012年に中和試験により血清型別された分離株について、遺伝子解析を実施した。

材料と方法

1. 検査検体

2015年1月から2022年9月までに感染

症発生動向調査事業等において名古屋市を除き、中核市を含む県内15保健所管内の病原体定点医療機関において採取され、保健所により当所に搬入された検体のうち、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HAdV感染の疑われた感染症患者3,546名の糞便2,288検体、咽頭ぬぐい液1,783検体、その他(吐物、尿、髄液、血液等)1,212検体、計5,283検体を用いた。

ウイルス分離株の遺伝子解析には、1995年から2012年に当所にて分離された後、中和試験によりHAdV-2(9株)及びHAdV-6(17株)と同定されたウイルス株、計26株を用いた。

2. 検査方法

2.1 ウイルス分離及び血清型別

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Difco veal infusion broth(Becton Dickinson and Co, USA)で糞便は10%乳剤、吐物は50%乳剤とした後、また咽頭ぬぐい液及び尿は攪拌した後、10,000×gで20分間遠心した。上清50µLを96ウェルプレートに培養したVero細胞、HeLa細胞、RD細胞に接種し、3～4日毎に細胞変性効果(CPE: cytopathic effect)を観察し、37℃で1週間培養した。CPEが観察されなかった細胞は3回凍結融解後、新しく培養した細胞に継代接種後1週間の観察を行った。この操作を計3回繰り返し、HAdV様CPEの有無を観察した。CPEが観察された場合、24ウェルプレートに培養した細胞に継代し、CPEを確認した後に3回凍結融解して、回収後に遠心した上清をウイルス分離株とした。96ウェルマイクロプレート上でHAdV-1～7抗血清(デンカ生研)による中和試験により同定した。なお2019年以前の検査は、既報⁷⁾に記載のとおり実施した。

2.2 PCR法による遺伝子検出及び型別

2.1の検体上清200µLからHigh Pure Viral RNA Kit(Roche, Germany)を用いてウイルスDNAを抽出し、PCR(polymerase chain reaction)法(Takara Ex Taq, Japan)を用いてHAdVのヘキソンLoop1領域⁶⁾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) を用いて精製後、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific, USA) を用いたダイレクトシーケンス法にて塩基配列を決定した。そこで得られた配列を基に、Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) version 7 を用いて最尤法 (ML: Maximum likelihood method) により系統解析を行った。

さらに 2.1 で HAdV 様 CPE が観察された株のうち、中和試験で型別不能な株についても、 $10,000\times g$ 、20 分間遠心後上清 $200\ \mu\text{L}$ からウイルス DNA を抽出し、ヘキソン領域における型別を実施した。

2.3 ウイルス分離株の遺伝子解析

PCR 法を用いて、中和抗原決定基を含むヘキソン Loop1 及び Loop2^{6,8)} の 2 領域について遺伝子を増幅し、決定した塩基配列を基に、各領域の系統解析を行った。

結果

1. 搬入検体の患者数及びアデノウイルス検出数の推移 (図 1)

患者 3,546 名から採取された 5,283 検体中、423 名の 435 検体から HAdV が検出された。搬入された検体のうち臨床症状から HAdV 感染の可能性が疑われた患者数は、新型コロナウイルス感染症流行の始まった 2020 年以降は 2019 年以前と比較して半数以下となった。また、HAdV 陽性患者数に関しては、最も多く検出された 2016 年の陽性患者数 (115 名) と比較し、2021 年の陽性患者数 (5 名) は 4.3% であり、大きな減少がみられた。

2. アデノウイルス各型の検出数と分離内訳 (図 2)

全部で 16 の型が検出された。最も多く検出された HAdV-2 は検出数 95 件のうち、80 件が分離陽性であり、15 件は遺伝子解析のみで検出型別された (分離率: 84.2%)。HAdV-41 は 93 件すべてが遺伝子解析のみで

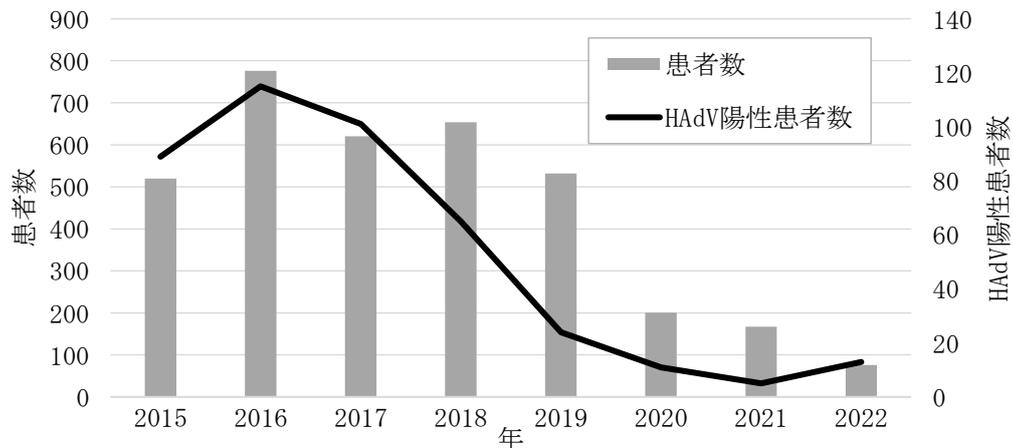


図 1 アデノウイルス感染の疑われた患者数とアデノウイルス陽性患者数の推移

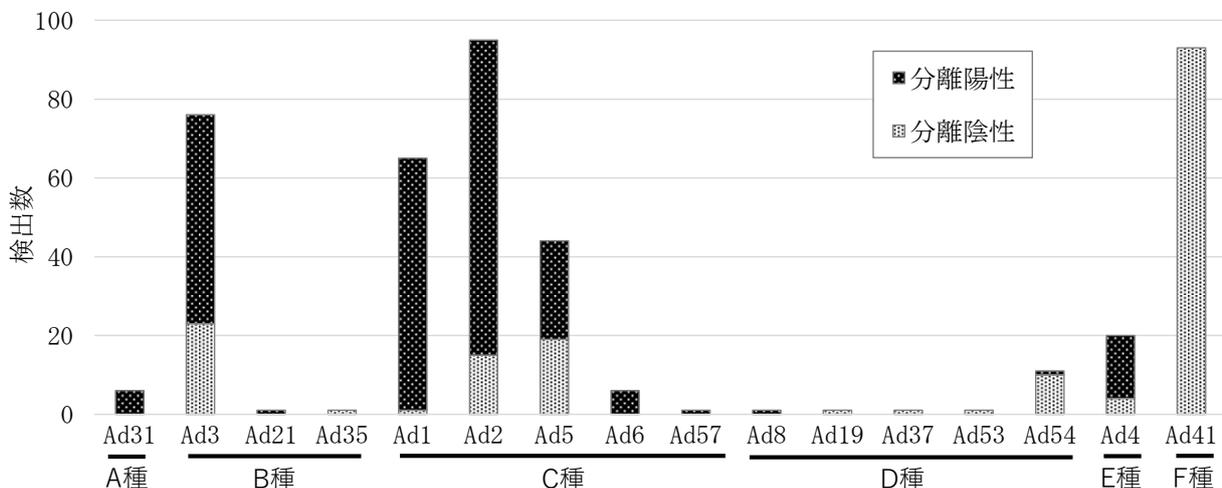


図 2 アデノウイルス各型の検出数と分離内訳

検出され、分離率は0%であった。HAdV-3は検出数76件のうち、53件が分離陽性であった(分離率:69.7%)。このように分離率は型により大きく異なっていた。なお、HAdV-1~7については、今回分離された244件はすべて中和試験による型別と遺伝子解析の結果が一致していた。

3. 各疾患の患者検体から検出されたアデノウイルスの型(図3)

HAdVが原因ウイルスの一つとされている感染性胃腸炎、上・下気道炎、咽頭結膜熱、流行性角結膜炎の4疾患に着目し、各患者検体から検出されたHAdVについて調べた。

感染性胃腸炎の患者検体から計174件、HAdV-1、-2、-3、-4、-5、-6、-31、-41、-54の9の型が検出された。HAdV-41が52%(90/174)を占めており、次いでHAdV-2、-3が検出された(図3a)。

上・下気道炎の患者検体から計151件、HAdV-1、-2、-3、-4、-5、-6、-31、-37、-54、-57の10の型が検出された。HAdV-1が27%(41/151)、HAdV-2が26%(40/151)を占めており、次いでHAdV-5が検出された。これらの型はすべてC種に分類されており、C種は全体の約70%を占めた(図3b)。

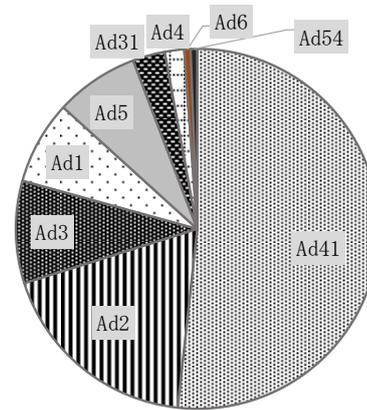
咽頭結膜熱の患者検体から計57件、HAdV-1、2、3、4、5、6、54の7の型が検出された。HAdV-3が47%(27/57)を占めており、次いでHAdV-2、-1が検出された(図3c)。

流行性角結膜炎の患者検体から計18件、HAdV-3、4、8、19、53、54の6の型が検出された。HAdV-54及び-3がそれぞれ33%(6/18)を占めており、D種(HAdV-8、-19、-53、-54)は全体の約50%を占めた(図3d)。

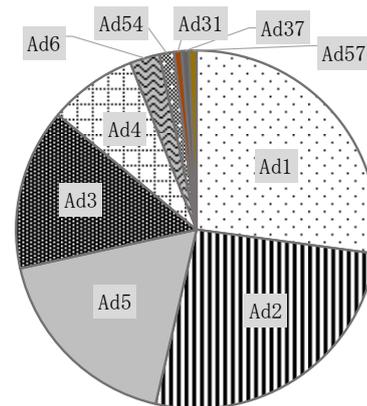
4. 感染性胃腸炎及び上・下気道炎の患者検体から検出されたアデノウイルスの推移(図4)

HAdVが多く検出された感染性胃腸炎及び上・下気道炎に着目し、患者検体からのHAdV検出率の変遷について調べた。

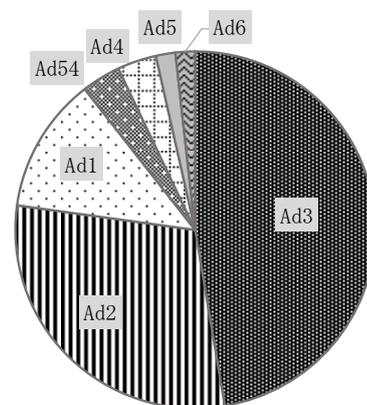
感染性胃腸炎について年ごとの推移について検討したところ、全体的にHAdV-41の検出数が多くみられたが、2022年はHAdV-41が37名中13名(35%)から検出され、例年と比較して特に高い検出率を示した(図4a)。



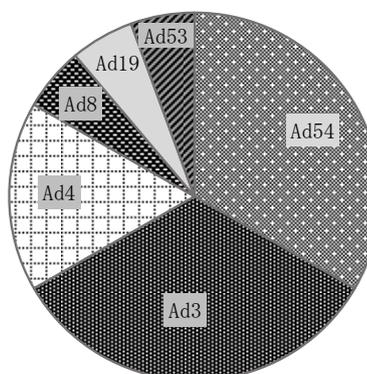
a 感染性胃腸炎



b 上・下気道炎



c 咽頭結膜熱



d 流行性角結膜炎

図3 各疾患の患者検体から検出されたアデノウイルスの型

上・下気道炎について年ごとの推移について検討したところ、2018年まではいくつかの型が検出されていたが、2019～2021年に検出された型は HAdV-1 及び-2 のみであり、2022 年は 11 月時点で検出されていない（図 4b）。

5. ウイルス分離株を用いた遺伝子解析（図 5）

1995 年～2012 年に採取された検体由来の HAdV ウイルス株 26 株を用いて、ヘキソン内 Loop1 及び Loop2 領域の塩基配列の決定

を試みた。すべての株において Loop1 及び Loop2 領域の解析をすることができた。その結果、どちらの領域においても、血清型として HAdV-2 と同定された 9 株はすべて HAdV-2 に分類され、HAdV-6 と同定された 17 株のうち 15 株は HAdV-6 に分類された。2 株（97-1964 及び 98-14）は血清型では HAdV-6 と同定されたものの Loop1 及び Loop2 領域の遺伝子解析においては HAdV-57 に分類された（図 5a、b）。

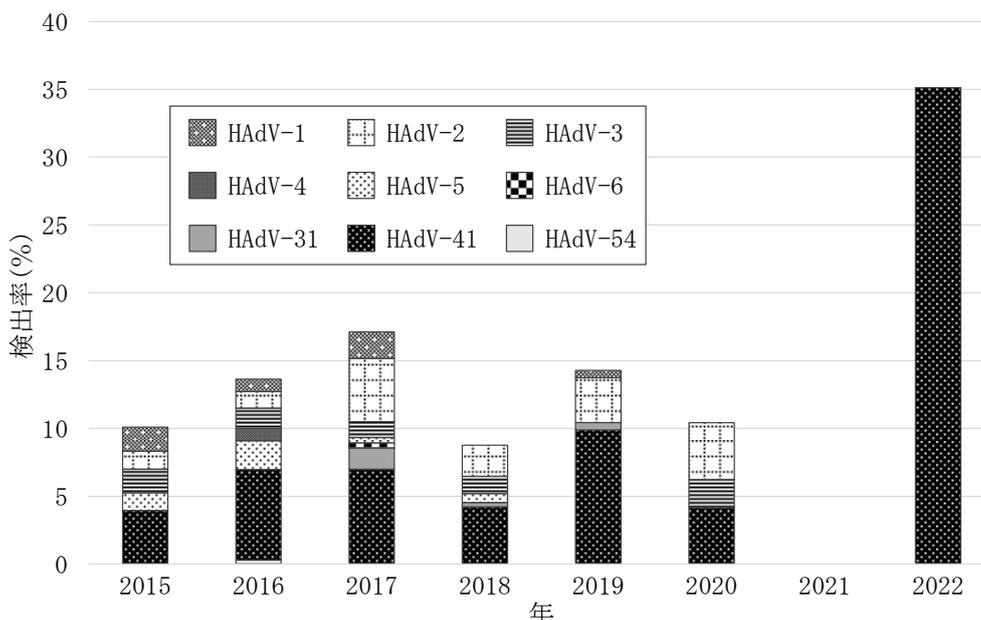


図 4a 感染性胃腸炎の患者検体から検出されたアデノウイルスの推移

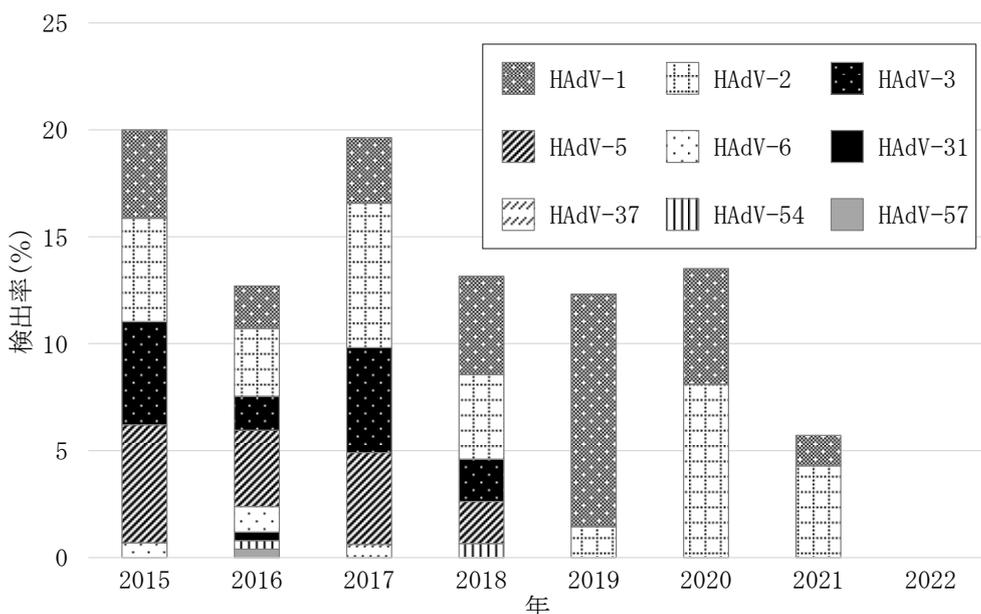


図 4b 上・下気道炎の患者検体から検出されたアデノウイルスの推移

考 察

2015年1月から2022年9月までに感染症発生動向調査等の目的で、名古屋市を除く愛知県内の病原体定点にて HAdV 感染の疑われた感染症患者から採取された糞便、咽頭ぬぐい液、吐物、尿など計 5,283 検体中 435 検体から HAdV が検出された。県内においても新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) の流行がみられた 2020 年 3 月以降、感染症発生動向調査の目的で搬入される検体数及びウイルス検出数は半数以下となった (図 1)。これは COVID-19 を否定できない発熱患者からの検体採取機会が激減したことや、不要不急の外出控え、マスクの着用、手指消毒の徹底など、生活様式の変化が大きく影響し、該当感染症が減少したと考えられた。本研究において検出された HAdV の分離率は型によって大きく異なり (図 2)、また、各疾患の患者検体から検出された HAdV の型は疾患によって特徴がみられた (図 3)。感染者数の減少がみられたものの、HAdV は COVID-19 の流行が始まった 2020 年以降も上・下気道炎を含むさまざまな疾患から検出されており (図 4)、小さな流行は繰り返されていたものと考えられる。しかしながら、COVID-19 以外の多くのウイルス感染症流行が抑制され、ウイルスに対する抗体を保有していない高感受性者が蓄積されており、今後爆発的なウイルス感染症流行の可能性が危惧されている。実際に、RS ウイルス感染症は 2021 年⁹⁾、手足口病は 2022 年¹⁰⁾ に大きな流行が見られ、例年と比較し患者数の大幅な増加が報告された。HAdV に関しても、2022 年 5 月以降、県内の感染性胃腸炎患者からの HAdV-41 検出率が大きく増加した (図 4a)。HAdV-41 に関しては 2022 年 5 月欧州における原因不明の小児肝炎との関連が示唆されており、また、全国的にも例年と比較し検出数が増加している¹¹⁾ことから、今後の動向に注意が必要である。

近年、塩基配列に基づく新規 HAdV の検出が国内外から報告されている。本研究では、過去に分離されたウイルス株を用いてヘキソン領域の遺伝子解析を試みた。その結果、26 株中 2 株が当初は中和試験により HAdV-

6 と同定されたものの、HAdV-57 である可能性が示唆された (図 5)。HAdV-57 は 2001 年にアゼルバイジャンの 4 歳健康児から初めて分離され¹²⁾、ロシアや中国においても分離されている^{13,14)}。また、抗血清を用いた中和試験では、HAdV-6 中和抗血清が交差反応を示すことが報告されている¹³⁾。本邦では、大阪府にて 2005 年¹⁵⁾、島根県にて 2005、2007¹⁶⁾ 及び 2014 年¹⁷⁾ に採取された患者検体からの検出が報告されている。今回、HAdV-57 の可能性が示唆された 2 件のうち 1 件 (97-1964) は 1997 年 12 月に下気道炎・肺炎と診断された 0 歳 8 ヶ月の女児、もう 1 件 (98-14) は 1998 年 3 月に乳児嘔吐下痢症・咽頭結膜熱と診断された 0 歳 11 ヶ月の男児由来の検体であった。このことから、初めて分離が報告された 2001 年以前に、愛知県には HAdV-57 が侵淫していた可能性が示唆された。これらの株に関しては、今後、次世代シーケンサーを活用して全ゲノム配列を取得し、さらに詳細な解析を進めていく予定である。

HAdV はさまざまな疾患を引き起こす上に、肝炎や脳炎・脳症など重篤な疾患とも関連が示されている。現在、徐々に生活様式が新型コロナウイルス流行前に戻り、渡航制限が解除されつつあり、輸入感染症を含め、さまざまな感染症が流行する可能性が考えられる。今後、高感受性者の蓄積に伴って流行の発生が危惧されるため、引き続き HAdV 検査体制を維持し、流行状況把握を継続することが重要である。

謝 辞

愛知県内の定点医療機関、愛知県並びに豊橋市、岡崎市、一宮市、豊田市保健所、愛知県感染症対策局感染症対策課の皆様へ深謝いたします。

参考文献

- 1) Lion T and Wold WSM: Adenoviruses. Fields Virology Seventh edition (Howley, P. M. et al. eds), 129-171, 2022.
- 2) 国立感染症研究所: 病原微生物検出情報 (IASR) 年別アデノウイルスの主な診断

- 名別型別内訳 2015-2022年 <https://www.niid.go.jp/niid/images/iasr/rapid/aden/adenol518en.pdf>
- 3) Oon-Tec N, et al.: Severe Pediatric Adenovirus 7 Disease in Singapore Linked to Recent Outbreaks across Asia. *Emerging Infectious Diseases* 21(7): 1192-1196, 2015.
 - 4) Kimberly M, et al.: Investigation into cases of hepatitis of unknown aetiology among young children, Scotland, 1 January 2022 to 12 April 2022. *Euro Surveillance* 27(15):2200318, 2022.
 - 5) HAdV Working Group. <http://hadvzg.gmu.edu>
 - 6) 国立感染症研究所: 咽頭結膜熱・流行性角結膜炎 検査, 診断マニュアル(第3版, 平成29年3月)
 - 7) 廣瀬絵美、伊藤 雅、安達啓一、尾内彩乃、中村範子、秦 真美、安井善宏、小林慎一、山下照夫、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). *愛知県衛生研究所報* 66:20-27, 2016.
 - 8) Takeuchi S, Itoh N, Uchio E, Aoki K, Ohno S: Serotyping of adenoviruses on conjunctival scrapings by PCR and sequence analysis. *Journal of Clinical Microbiology* 37(6):1839-1845, 1999.
 - 9) 国立感染症研究所: 感染症発生動向調査週報(IDWR) 2021年第51,52週 <https://www.niid.go.jp/niid/images/idsc/idwr/IDWR2021/idwr2021-51-52.pdf>
 - 10) 国立感染症研究所: 感染症発生動向調査週報(IDWR) 2022年第47週 <https://www.niid.go.jp/niid/images/idsc/idwr/IDWR2022/idwr2022-47.pdf>
 - 11) 国立感染症研究所: 病原微生物検出情報(IASR) アデノウイルス月別分離・検出報告数の推移、過去4年間との比較、2018~2022年 <https://kansen-levelmap.mhlw.go.jp/Byogentai/Pdf/data39j.pdf>
 - 12) Chen-Yin L, et al.: Adenovirus serotype 3 and 7 infection with acute respiratory failure in children in Taiwan, 2010-2011. *PLoS One* 8:e53614, 2013.
 - 13) Michael PW, et al.: Computational analysis of two species C human adenoviruses provides evidence of a novel virus. *Journal of Clinical Microbiology* 149:3482-3490, 2011.
 - 14) Alexander NL, Olga EI, Tatiana PE, Richard DI: Evidence of frequent recombination among human adenoviruses. *Journal of General Virology* 89:380-388, 2008.
 - 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* 35:278, 2014.
 - 16) 辰己智香, 大城 等, 三田哲朗, 和田美江子, 樋口 強, 花岡 希, 藤本嗣人: 新型アデノウイルス57型の日本における発見と過去10年間の分離株の後方視的調査—島根県. *病原微生物検出情報* 38:143-144, 2017.
 - 17) 辰己智香, 和田美江子, 三田哲朗, 飯塚節子, 樋口 強, 花岡 希, 藤本嗣人: 本邦で初めて分離されたヒトアデノウイルス57型(HAdV57)の1例—島根県. *病原微生物検出情報* 35:222-223, 2014.

Detection of Adenovirus in Aichi Prefecture and Genetic Analysis of Isolates

Emi Hirose, Hirokazu Adachi, Noriko Nakamura, Hitomi Niimi, Fumio Aoyama,
Honami Sato, Hiroko Minagawa, Noriko Saito, Yoshihiro Yasui,
Miyabi Ito, Katsuhiko Sato

Human adenovirus (HAdV) is a pathogenic virus that causes a variety of diseases from common diseases such as pharyngoconjunctival fever, infectious gastroenteritis, and respiratory tract infections to epidemic keratoconjunctivitis, hemorrhagic cystitis, encephalitis, and hepatitis. We attempted to detect HAdV in specimens brought in for the purpose of the surveillance during the period from January 2015 to September 2022. Compared to the period up to 2019, both the number of specimens and the number of HAdV detections decreased from 2020 to 2022, when COVID-19 was observed. However, the number of patients with infectious gastroenteritis has been increasing since May 2022, and the detection rate of HAdV-41 is higher than in previous years, suggesting that future trends should be monitored closely.

In recent years, gene sequencing has been used to type viruses, and detection of novel HAdVs based on nucleotide sequences has been reported from Japan and abroad. Therefore, we performed genetic analysis of 26 virus isolates and found that the genotype of the hexon region of two isolates initially serotyped as HAdV-6 by neutralization testing was determined as HAdV-57. This suggests that HAdV-57 may have been intermingled among the isolates identified as serotype HAdV-6 in the past. Furthermore, these strains were detected in 1997 and 1998, suggesting that HAdV-57 may have been prevalent in Aichi Prefecture before 2001, when the first detection of HAdV-57 was reported.

Key words: adenovirus, surveillance, virus isolation

調 査 研 究

2009 年から 2020 年に愛知県内で分離された 腸管出血性大腸菌 0157、026 及び 0111 の 反復多型配列解析 (MLVA) 法による解析

松田達也、高橋佑太、山田和弘、都築秀明、佐藤克彦

要 旨

腸管出血性大腸菌 (Enterohemorrhagic *Escherichia coli* : EHEC) の分子疫学解析法は、平成 30 年に反復配列多型解析 (Multiple-Locus Variable-number tandem repeat Analysis (MLVA)) 法に統一された。MLVA 法はゲノム上に散在する反復配列領域 (遺伝子座) の多型性を利用して菌株の異同を判別する方法であり、17 か所の遺伝子座について解析を実施している。2009 年から 2020 年に愛知県内で分離された EHEC 0157、026 及び 0111 258 株を用い MLVA 法の菌株識別能を調べるため、各血清型における遺伝子座のパターンとリピート数を調査した。EHEC 258 株は 198 遺伝子型に識別され、血清型ごとでは、0157 202 株が 152 遺伝子型、026 48 株が 40 遺伝子型、0111 8 株が 6 遺伝子型に識別された。遺伝子座ごとの菌株識別能は、2 遺伝子座 (EHC-1、0157-9) を除き、血清型ごとで異なっていた。026 では増幅産物が検出されないと報告されている遺伝子座 0157-36 において増幅産物が検出された株も存在したため、今後も継続した調査が必要と思われた。また、MLVA 法には血清型ごと、遺伝子座ごとに特徴があるため、結果を解釈する上では、それらを理解して検査を実施することが重要であると考えられた。

キーワード: 腸管出血性大腸菌、Multiple-Locus Variable-number tandem repeat Analysis (MLVA)、遺伝子座の特徴

序 文

腸管出血性大腸菌 (Enterohemorrhagic *Escherichia coli* : EHEC) 感染症は、Vero 毒素 (Vero toxin : VT または Shiga toxin : Stx) を産生又は VT 遺伝子を保有する大腸菌の感染によって起こり、腹痛、水様性下痢、血便、ときに溶血性尿毒症症候群 (hemolytic uremic syndrome : HUS) を引き起こすことのある「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律」(感染症法) の三類

感染症である。日本では年間 4,000 件前後が報告されており¹⁾、愛知県でも 100~200 件程度の届出がある²⁾。分離される EHEC の 0 血清型は、年により多少の変化はあるが、例年主要 3 血清型 (0157、026 及び 0111) で全体の約 75% を占めている³⁾。

EHEC の分子疫学解析法は、パルスフィールドゲル電気泳動 (Pulsed-Field Gel Electrophoresis : PFGE) 法が主流であったが、専用機器の必要性、手技の煩雑さ、所

要時間の長さ、結果の比較が困難等の問題点があった。そこで、検査時間の短縮、数値による結果比較が可能な PCR を用いた分子疫学解析法である IS-Printing system (IS-P) が開発された。しかし、IS-P は、菌株識別能が PFGE 法よりも低く、検査可能な O 血清型が限定的であった。そのような状況の中、厚生労働省事務連絡⁴⁾において、分子疫学解析法は反復配列多型解析 (Multiple-Locus Variable-number tandem repeat Analysis (MLVA)) 法に統一された。

MLVA 法とは、ゲノム上に散在する反復配列領域 (遺伝子座) の多型性を利用する方法である。遺伝子座は複製の際に生じるエラーにより反復配列 (リピート) 数が増減することが知られているため、菌株間で比較的違いの出やすい遺伝子座を標的とすることで、菌株の異同を効果的に判別することが可能となる⁵⁾。リピート数の決定は、PCR で標的遺伝子座を増幅後、増幅産物のサイズをキャピラリーシークエンサーによるフラグメント解析により判別することで実施可能であることから、迅速に多検体処理が可能という利点がある。EHEC の主要 3 血清型の分子疫学解析についてはハンドブック⁶⁾に従い、17 か所の遺伝子座を確認することとなっている。愛知県においては、2019 年の保健医療局通知⁷⁾により MLVA 法の検査を開始した。

本研究では主要 3 血清型における MLVA 法の菌株識別能を調べるため、2009 年から 2020 年の間に愛知県で分離された株を用い、各分離株から検出される遺伝子座のパターンについて調査した。さらに、遺伝子座ごとのリピート数を精査し、どの遺伝子座が菌株識別能に寄与しているか調査した。

材料及び方法

供試菌株：2009 年から 2020 年の間に愛知県において分離された EHEC 258 株 (O157: 202 株、O26: 48 株、O111: 8 株) を用いた。家族内感染例及び集団発生例については、各事例から 1 株を抽出した (表 1)。

DNA 抽出法：供試菌を Tris-EDTA Buffer (pH 8.0) 100 μ L に懸濁し、95°C で 10 分間加熱後、12,000 rpm で 2 分間遠心分離し、その上清を DNA テンプレートとした。

MLVA 法：Primer mix はハンドブックに従い調製した (表 2)。QIAGEN Multiplex PCR kit (QIAGEN、ドイツ) を用い、反応液組成は 2 \times PCR Master Mix 5 μ L、Primer mix (1 μ M each) 0.2 μ L、DW 3.3 μ L、DNA テンプレート 1.5 μ L の計 10 μ L とした。PCR プロトコールは 95°C 15 分、95°C 20 秒、60°C 90 秒、72°C 60 秒、72°C 10 分とし、下線部のサイクルを 35 回繰り返して行った。得られた増幅産物を 2 回 10 倍希釈 (計 100 倍希釈) し、Hi-Di ホルムアミド (Thermo Fisher Scientific、USA) (10 μ L/検体) 及び GeneScan600LIZ (Thermo Fisher Scientific、USA) (0.2 μ L/検体) の混合液に 1.5 μ L 添加し、99°C 3 分加熱後、氷上で 5 分間急冷し、3500 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific、USA) にてフラグメント解析を実施し、得られた結果を GeneMapper (Thermo Fisher Scientific、USA) で解析した。

菌株識別能の評価：全ての遺伝子座においてリピート数が一致した株を同一遺伝子型と判定し、Simpson's Diversity Index (SDI) を算出した⁸⁾。SDI とは無関係の事例を識別したときに異なるグループであると判定される確率である。1 に近い程、無関係の事例を正確に識別する信頼度が高いこ

表 1 EHEC の血清型及び搬入年別株数

血清型	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	総計
157	23	40	15	16	30	12	9	7	10	9	23	8	202
26		6		1	7	6	2	5	6	9	5	1	48
111		1		2		3	1				1		8
総計	23	47	15	19	37	21	12	12	16	18	29	9	258

表 2 MLVA 法 17 遺伝子座の Primer 配列及びリピートサイズ

Primer set 1

遺伝子座	プライマー名	蛍光	配列	offset size	repeat size
EHC-2	EHC-2F	VIC	CCAGTTCGGCAGTGAGCTG	214	6
	EHC-2R		ACGCTGGTCCGGGAGATTAT		
0157-25	0157-25F	PET	GCCGGAGGAGGGTGATGAGCGGTTATATTTAGTG	110	6
	0157-25R		GCGCTGAAAAGACATTCTCTGTTTGGTTTACAC		
0157-9	0157-9F	VIC	GCGCTGGTTTAGCCATCGCCTTCTTCC	465	6
	0157-9R1		TTCATTAATAAATAAAAAATCCCATGAAAATATTTTTTG		
	0157-9R		GTGTCAGGTGAGCTACAGCCCGCTTACGCTC		
EH157-12	EH157-12F	PET	ACAGTACCCATGCCAGCAA	314	9
	EH157-12R		GAAAGCTGGGTGAAAACACCGATGC		
EH111-8	EH111-8F1	PET	CCGGACGAGAGGGAGTAAATGAA	163	9
	EH111-8F	PET	CCGGGCGAGTAGGAGTAAATGAA		
	EH111-8R1		CATAAATTATGCTTAATGGAATTAGTAACGCTG		
	EH111-8R		CATGAATTATGCTTAATGGAATTAGTCAAGCTG		
EHC-1	EHC-1F	VIC	GTGCGTAACCTGCTGGCACA	75	6
	EHC-1R		CGCGGCTGCCGGAGTATC		
EHC-5	EHC-5F	NED	ATACTACAGACGCTGCTGATGA	109	6
	EHC-5R		CCGCTTTGTTACCGGTCTTTTTC		
0157-3	0157-3F	NED	GCGCGTAAGGACAACGGGGTGTGTTGAATTG	323	6
	0157-3R		GAACAACCTAAAACCCGCTGCCATCG		
0157-34	0157-34F	6-FAM	TGTTACCAACGCGAAGCTAACAAG	141	18
	0157-34R		AGGCATTAATAGCAGATGTTC		

Primer set 2

遺伝子座	プライマー名	蛍光	配列	offset size	repeat size
EH26-7	EH26-7F	PET	CCCCTATCAAACTGATACCCGATAAG	292	22
	EH26-7R		CGCCGGAAGGCAAAAGATCAT		
0157-19	0157-19F	NED	GCAGTGATCATTATTAGCACCGCTTCTGGATGTTT	273	6
	0157-19R		CGGGCAGGAATAAGGCCACCTGTTAAGC		
EH111-11	EH111-11F	6-FAM	GTCAGTAGTTGCGGCTGTAATATTGAAGA	422	6
	EH111-11R		CCTGTGTCATTGAGTTCTGTACATAG		
EHC-6	EHC-6F	NED	ATGGAGAACCGTCTGAGTGC	387	9
	EHC-6R		TCAGAAATCATCTCCCGGCTCAAC		
0157-37	0157-37F	PET	AATCAGAGCGGCAGGAAAAAGAAGA	84	6
	0157-37R		GGGCTTCTGTCTTTTTCAGACCTG		
0157-17	0157-17F	VIC	GCAGTTGCTCGGTTTTAACATTGCAGTGATGA	121	6
	0157-17R		AGAAATGGTTTACATGAGTTTGACGATGGCGATC		
0157-36	0157-36F	NED	GCGCTCCTTCATCGGCTGTCCGTTAAAC	102	7
	0157-36R		GCCGCTGAAAGCCCACACCATGC		
EH111-14	EH111-14F	6-FAM	ATGAAATTATCGCAGCATACAATCG	154	7
	EH111-14R		GGGTTTCCATTTTCTTTACCTTCAGG		

とを表している。今回は各血清型における株及び各遺伝子座に対して SDI を算出した。株に対する SDI は、全て異なる事例の株を用いていることから 0.99 以上を識別能が高いと設定した。遺伝子座に対する SDI は、MLVA 法が複数の遺伝子座を利用して型別を行っていく方法であるため、0.7 以上を識別能が高いと設定した。

結 果

EHEC 258 株は 198 遺伝子型(SDI:0.995)に識別された。血清型ごとでみると、0157 202 株は 152 遺伝子型 (SDI : 0.993)、026 48 株は 40 遺伝子型 (SDI : 0.993)、0111 8 株は 6 遺伝子型 (SDI : 0.929) に識別された。また、2009 年から 2020 年まで全ての年で搬入のあった 0157 について、各年の遺伝子型数及び SDI を算出したところ、2010 年搬入株は、他の搬入年よりも SDI が低かった (表 3)。

3 株以上同一遺伝子型が検出されたものは 10 遺伝子型あり、全て 0157 であった。特に遺伝子型 0157-1 は 2010 年に 11 株検出された。搬入年の違う株から同一遺伝子型が検出されたものは、0157 が 4 遺伝子型 (0157-1 : 14 株、0157-11 : 2 株、0157-12 : 2 株、0157-13 : 2 株)、026 が 1 遺伝子型 (026-1 : 2 株) であった (表 4)。

各遺伝子座の菌株識別能を表 5 に示す。0157 では、全ての株で 2 遺伝子座 (EH111-14 及び EH26-7) において増幅産物が検出されず、2 遺伝子座 (EH111-11 及び EH111-8) においては、それぞれ単一のリピート数のみが検出された。遺伝子座 EHC-6 では、リピート数が 11 パターン確認されたが、増幅産物が検出されていない株が多く (180/202、89.1%)、SDI は 0.205 と低い値であった。単独遺伝子座で SDI が 0.7 以上と高い値を示したのは、8 遺伝子座 (EHC-1、0157-3、0157-34、0157-9、0157-17、0157-19、0157-36 及び 0157-37) であった。

026 では、全ての株で 2 遺伝子座 (0157-3 及び 0157-17) において増幅産物が検出されず、6 遺伝子座 (EH111-11、EH111-14、EH157-12、0157-34、0157-25 及び 0157-19)

においては、それぞれ単一のリピート数のみが検出された。2 遺伝子座 (EH111-8 及び 0157-36) はそれぞれ 2 パターンのリピート数が確認されたが、増幅産物が検出された株は 1 株のみであり、その他の株では増幅産物が検出されていないため、SDI は 0.042 と低く、識別が全くできていなかった。遺伝子座 EHC-5 では、リピート数が 8 パターン確認されたが、増幅産物が検出されていない株が多く (30/48、62.5%)、SDI は 0.373 と低い値であった。単独遺伝子座で SDI が 0.7 以上と高い値を示したのは、3 遺伝子座 (EHC-1、EHC-2 及び 0157-9) であった。

0111 では、全ての株で 4 遺伝子座 (EH26-7、0157-3、0157-17 及び 0157-36) において増幅産物が検出されず、5 遺伝子座 (EH111-14、EH157-12、0157-34、0157-25 及び 0157-19) においては、それぞれ単一のリピート数のみが検出された。単独遺伝子座で SDI が 0.7 以上の高い値を示したのは、6 遺伝子座 (EH111-11、EH111-8、EHC-1、EHC-2、0157-25 及び 0157-9) であった。

3 血清型全てにおいて、複数のリピート数が確認された遺伝子座は、6 遺伝子座 (EHC-1、EHC-2、EHC-5、EHC-6、0157-9 及び 0157-37) あった。遺伝子座 EH111-14 は、0157 で増幅産物が検出されず、026 及び 0111 でそれぞれ単一のリピート数しか検出されなかったため、今回の供試菌株において菌株識別に全く寄与していなかった。

考 察

EHEC における MLVA 法の菌株識別能は、供試株数が 8 株と少ない 0111 は SDI が 0.929 と低かったが、0157 及び 026 においては、SDI が 0.993 と非常に高い値を示した。しかし、0157 の 2009 年から 2020 年までの各年における結果を見ると、同一遺伝子型が多数検出されている年 (2010 年) も存在した。今回供試した株は、家族内感染例及び集団発生例から各事例 1 株を抽出し、同一事例として疑われる株を排除している。MLVA 法の結果が偶然一致する確率は、10 億分の 1 と低い数字であるとの報告もある⁹⁾ ため、2010 年搬入株には何らかの原因で集

表3 各血清型の搬入年別遺伝子型数及びSDI

搬入年		2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	Total
0157	株数	23	40	15	16	30	12	9	7	10	9	23	8	202
	遺伝子型数	17	23	11	14	25	12	9	7	8	7	16	7	152**
	SDI	0.964	0.918	0.943	0.983	0.982	1.000	1.000	1.000	1.000	0.933	0.944	0.960	0.964
026	株数	0	6	0	1	7	6	2	5	6	9	5	1	48
	遺伝子型数	0	5	0	1	6	5	2	5	5	6	5	1	40**
	SDI	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.993
0111	株数	0	1	0	2	0	3	1	0	0	0	1	0	8
	遺伝子型数	0	1	0	1	0	2	1	0	0	0	1	0	6
	SDI	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.929
全体	株数	23	47	15	19	37	21	12	12	16	18	29	9	258
	遺伝子型数	17	29	11	16	31	19	12	12	13	13	22	8	198**
	SDI	0.964	0.940	0.943	0.982	0.986	0.990	1.000	1.000	1.000	0.967	0.967	0.975	0.972

※ 搬入年の異なる株から同一の遺伝子型が検出されているため、各年の合計とTotalは一致しない。

表4 同一遺伝子型が複数検出された株の搬入年及び各遺伝子座のリピート数

血清型	合計 株数	搬入年	株数	遺伝子座																	
				EH111-11	EH111-14	EH111-8	EH157-12	EH26-7	EHC-1	EHC-2	EHC-5	EHC-6	0157-3	0157-34	0157-9	0157-25	0157-17	0157-19	0157-36	0157-37	
157	14	0157-1	11	2	-2	1	4	4	-2	5	4	7	-2	13	11	16	5	8	4	12	6
	3	0157-2	3	2	-2	1	4	4	-2	6	4	-2	8	12	11	5	7	6	7	8	
	4	0157-3	4	2	-2	1	4	4	-2	5	4	12	-2	13	12	10	5	4	4	12	7
	3	0157-4	3	2	-2	1	4	4	-2	5	4	18	-2	14	12	10	5	4	4	10	7
	3	0157-5	3	2	-2	1	4	4	-2	6	4	-2	8	12	11	5	7	6	6	6	
	3	0157-6	3	2	-2	1	4	4	-2	6	4	9	-2	9	12	3	5	7	6	6	7
	3	0157-7	3	2	-2	1	4	4	-2	5	4	8	17	13	11	16	5	7	4	11	6
	3	0157-8	3	2	-2	1	7	7	-2	11	4	-2	18	9	15	5	3	7	6	7	
	3	0157-9	3	2	-2	1	4	4	-2	5	4	9	-2	10	13	13	9	7	6	3	6
	3	0157-10	3	2	-2	1	4	4	-2	6	4	7	-2	10	11	11	5	8	6	6	6
	2	0157-11	1	2	-2	1	4	4	-2	6	4	-2	10	10	12	7	5	7	5	6	7
	1	0157-11	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	0157-12	1	2	-2	1	4	4	-2	7	4	10	-2	11	12	8	6	6	6	6	7
2	0157-13	1	2	-2	1	4	4	-2	13	5	-2	-2	4	9	-2	3	6	7	6	5	
26	026-1	1	2	1	1	2	3	8	18	-2	-2	-2	-2	1	9	2	-2	1	-2	-2	
		2010	1	1	1	2	3	8	18	-2	-2	-2	-2	1	9	2	-2	1	-2	-2	
		2016	1	1	1	2	3	8	18	-2	-2	-2	-2	1	9	2	-2	1	-2	-2	

-2: 増幅産物検出せず

表5 血清型ごとの遺伝子座パターン及び SDI

遺伝子座	0157		026		0111	
	パターン	SDI	パターン	SDI	パターン	SDI
EH111-11	1	0	1	0	3	0.714
EH111-14	—	0	1	0	1	0
EH111-8	1	0	2 [*]	0.042	4	0.750
EH157-12	6	0.504	1	0	1	0
EH26-7	—	0	6 [*]	0.651	—	0
EHC-1	12	0.751	12	0.851	5	0.893
EHC-2	5	0.495	15	0.921	4	0.821
EHC-5	17 [*]	0.629	8 [*]	0.373	3 [*]	0.464
EHC-6	11 [*]	0.205	13 [*]	0.609	4 [*]	0.643
0157-3	17 [*]	0.917	—	0	—	0
0157-34	9	0.778	1	0	1	0
0157-9	16 [*]	0.892	7	0.787	4	0.821
0157-25	9	0.633	1	0	1	0
0157-17	13	0.823	—	0	—	0
0157-19	7	0.724	1	0	1	0
0157-36	12 [*]	0.866	2 [*]	0.042	—	0
0157-37	13 [*]	0.729	7 [*]	0.463	5 [*]	0.893

—：全株で増幅産物を検出しなかった

※：増幅産物を検出しなかった場合も1パターンとして計上している

団発生を起こしていた株が存在する可能性がある。MLVA 法等の分子疫学解析は、疫学的関連性確認の一助となる科学的根拠を示すために実施するが、本結果のように MLVA 法の一致から疫学的関連性の疑いに気づくこともあるため、EHEC が分離された際には可能な限り早期に MLVA 法を実施することが重要であると考えられる。

搬入年の違う株から同一遺伝子型が検出された株は、0157 において 4 遺伝子型 20 株、026 において 1 遺伝子型 2 株存在した。分離年の違う株は、同一 MLVA 結果の株であっても、一塩基多型 (SNP) が多く存在していることが報告されている¹⁰⁾。一方で、複製の際にエラーが起こりにくい株では、リピート数の多様性が低くなり、MLVA 法で菌株間の違いを区別できない Emerging 現象という現象も報告されている¹¹⁾。0157 の 2 遺伝子型 (0157-12 及び 0157-13) 及び 026 の

1 遺伝子型 (026-1) は搬入年が大きく離れているため、SNP 解析等のより詳細な解析をすることが必要であると考えられる。

遺伝子座ごとの菌株識別能は、全ての血清型で高い識別能を示した (SDI : 0.75 以上) 2 遺伝子座 (EHC-1 及び 0157-9) を除き、血清型ごとで異なっていた。0157-3 及び 0157-17 の 2 遺伝子座においては、026 及び 0111 から増幅産物が検出されず、0157-34、0157-25 及び 0157-19 の 3 遺伝子座においては、026 及び 0111 はそれぞれリピート数が単一であった。今回の結果は、既報¹²⁾と比較するとほぼ同様の結果となっていた。しかし、遺伝子座 0157-36 は 026 において増幅産物が検出されないと報告されており、今回は 1 株 (1/48、2.1%) のみ増幅産物が検出された。0157-36 の遺伝子座は、プラスミド上に存在するとされており¹³⁾、当該株へプラスミドが伝播した可能性があるため、

より詳細な解析が必要であると考えられる。また、遺伝子座 EH111-14 は、0111 において菌株識別能をもつ遺伝子座と報告¹²⁾されているが、今回実施した株ではリピート数が異なる株はなかった。そして、遺伝子座 EH157-12 は、3 血清型で菌株識別能をもつとされているが、今回用いた 026 及び 0111 の菌株においてはリピート数が両血清型で単一だった。これは、愛知県の分離株における特徴の可能性も考えられるが、026 及び 0111 の搬入菌株数は 0157 に比べて数が少ないため、今後も調査を継続し、より多数の検体を用いた検討が必要であると考えられた。

以上のことから、MLVA 法には血清型ごと、遺伝子座ごとに特徴があるため、MLVA 法の結果を解釈する上では、それらの特徴を理解して解析を実施することが重要であると考えられる。

今回、2009 年から 2020 年の間に愛知県内で分離された EHEC 258 株の MLVA 法による解析結果をまとめた。EHEC は全国規模で感染が広がる広域事例も発生することが知られているため、MLVA 法により菌株間の関連性を確認することは非常に重要となる。そのため、今後も EHEC が分離された際には、可能な限り早期に MLVA 法を実施可能な体制を整えていくことが必要であると考えられた。

文 献

- 1) 国立感染症研究所感染症情報センター：発生動向調査年別報告数一覧(全数把握) 三類感染症； <https://www.niid.go.jp/niid/ja/ydata/10412-report-ja2019-10.html>
- 2) 感染症発生動向調査事業報告書第 38 報，2019.
- 3) 国立感染症研究所感染症情報センター：IASR Vol. 41, No. 5 (No. 483) 特集関連資料 腸管出血性大腸菌検出例の血清型別臨床症状，2019.
- 4) 厚生労働省健康局結核感染症課 厚生労働省医薬・生活衛生局食品監視安全課事務連絡 “腸管出血性大腸菌による広域的な感染症・食中毒に関する調査について” 平成 30 年 6 月 29 日付け事務連絡.
- 5) 泉谷秀昌：腸管出血性大腸菌の分子疫学解析について. 獣医公衆衛生研究 20(2): 6-11, 2018.
- 6) 「腸管出血性大腸菌 MLVA ハンドブック (0157、026、0111 編)」 第一版 (Ver 1.2) 2018 年 11 月編 地方衛生研究所全国協議会 保健情報疫学部会 マニュアル作成ワーキンググループ編，2018.
- 7) 愛知県保健医療局健康医務部健康対策課長 生活衛生部生活衛生課長通知 “腸管出血性大腸菌による広域的な感染症・食中毒に関する調査について” 令和元年 11 月 29 日付け 31 健対号外 31 生衛号外.
- 8) Hunter PR, Gaston MA: Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *Journal of Clinical Microbiology* 26(11):2465-2466, 1988.
- 9) 薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会食中毒部会参考資料「腸管出血性大腸菌感染症調査のための MLVA 法の活用」，2019.
- 10) Lee K, Izumiya H, Iyoda S, Ohnishi M: Effective Surveillance Using Multilocus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis and Whole-Genome Sequencing for Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157. *Applied and Environmental Microbiology* 85(17): Issue 17 e00728-19, 2019.
- 11) 腸管出血性大腸菌 MLVA 技術研修会講義 「腸管出血性大腸菌の MLVA 型別における異同判定の考え方」，2018.
- 12) Izumiya H, Pei Y, Terajima J, Ohnishi M, Hayashi T, Iyoda S, Watanabe H: New system for multilocus variable-number tandem-repeat analysis of the enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains belonging to three major serogroups: O157, O26, and O111. *Microbiology and Immunology* 54:569-577, 2010.
- 13) 衛生微生物技術協議会第 40 回研究会・熊本レファレンスセンター等関連会議「大腸菌」演題 2「EHEC MLVA について」，2019.

Multiple-Locus Variable-number tandem repeat Analysis (MLVA) of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157, O26 and O111 isolated in Aichi Prefecture from 2009 to 2020

Tatsuya Matsuda, Yuta Takahashi, Kazuhiro Yamada,
Hideaki Tsuzuki, Katsuhiko Sato

The Multiple-Locus Variable-number tandem repeat Analysis (MLVA) method is used in Japan as a molecular epidemiological analysis method for Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC). MLVA is a newly developed genotyping method for bacterial infectious diseases and is based on differences between the isolates with regard to the repeat copy numbers in certain genomic loci. Using 258 strains of O157, O26 and O111 isolated in Aichi Prefecture between 2009 and 2020, we investigated the type of the locus and the number of repeated sequences detected in the isolates in this study. As a result, 258 strains of EHEC were identified in 198 genotypes; for each O157, O26, O111 serotypes, 202, 48, 8 strains were identified in 152, 40, 6 genotypes, respectively.

The discriminatory ability of each locus was different for each serotype, except for two loci (EHC-1 and O157-9). Genomic loci reported to be undetectable in certain serotypes were detected. The results of the MLVA method analysis are characterized by serotype and locus. Since it is important to understand these characteristics in order to interpret the results of the analysis, continued investigation is necessary.

Key words: Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC), Multiple-Locus Variable-number tandem repeat Analysis (MLVA) , characterized by serotype and locus

調 査 研 究

カビ毒デオキシニバレノール及びその類縁体の 一斉分析法の開発

森 久人、舘 昌彦、上野英二、富田浩嗣、棚橋高志

要 旨

デオキシニバレノール (DON) は、フザリウム属菌が産生するカビ毒であり、食品衛生法により小麦に基準値が設定されている。穀類には、DON のほかアセチル体や配糖体等、DON 類縁体が存在することが知られており、これらを摂取すると体内で DON と同様の毒性を示す可能性が懸念されるが、その分析法は公に示されていない。今回、DON 及び 4 種類縁体の一斉分析法の開発を検討し、液体クロマトグラフ-タンデム質量分析計 (LC-MS/MS) 分析条件及び精製に最適な固相カラムを選定した。最適化した本分析法について妥当性評価試験を実施したところ、DON は、全ての評価基準を満たす結果が得られた。また、他の 4 種類縁体については、真度は目標値を満たさなかったものの、併行精度が 2.8~5.7% 及び室内精度が 6.1~8.8% であり、再現性の高い分析法であると考えられた。4 種類縁体の真度が低い原因には、マトリクスによるイオン化抑制効果の影響が考えられ、今後、より夾雑物を除去できる前処理法等の検討が必要と考えられた。

キーワード：カビ毒、デオキシニバレノール、デオキシニバレノール類縁体、
液体クロマトグラフ-タンデム質量分析計

序 文

デオキシニバレノール (DON) 及びニバレノール (NIV) 等のトリコセセン化合物は、穀類の赤カビ病の原因菌であるフザリウム属が産生するカビ毒である (図 1)。なかでも、DON は穀類から比較的高頻度に検出される化合物で、急性毒性として嘔吐、消化管及びリンパ組織への障害、慢性毒性として体重減少等が知られている。このため、平成 14 年に食品衛生法により小麦に対して暫定基準値 (1.1 mg/kg) が設定された。その後、令和 3 年には、規格基準として 1.0 mg/kg が設定された。

日本において DON は、1950 年代に赤カビ病の被害を受けた米または麦を摂取し

た人や家畜が急性赤カビ中毒症を発症し、その原因毒素として発見された¹⁾。その後、いくつかの DON 類縁体の存在が明らかとされた。その主なものとして、DON の生合成過程で生成される 2 つのアセチル体、3-アセチルデオキシニバレノール (3-Ac-DON) 及び 15-アセチルデオキシニバレノール (15-Ac-DON) や植物体内で DON が代謝されたデオキシニバレノール-3-グリコシド (DON-3-Glu) が報告されている²⁾ (図 1)。穀類は DON だけでなく、これら類縁体にも同時に汚染されていると考えられる。近年、これら 3 つの類縁体は、経口摂取されると、体内で脱アセチル化や加水分解を受け DON に代謝されると考えられている³⁾。そ

のため、これら類縁体は DON と同様の毒性を示すと考えられている。日本では小麦中の DON 含有量のみを規制しており、公定法として DON のみを対象とした試験法⁴⁾が定められ、DON 類縁体を測定できる方法は公に示されていない。酒井らの報告⁵⁾ではトリコテセン化合物の一斉分析法の検討を行っているが、DON-3-Glu は検討の対象としていない。

今回、当所の行政検査で分析対象としている DON 及び NIV に加え、上記の類縁体を含めた 5 種化合物の一斉分析法を開発することとした。公定法に準じて調製した試料抽出溶液について、精製に最適な固相カラムの選定を行い、液体クロマトグラフ-タンデム質量分析計 (LC-MS/MS) 分析条件を検討した。また開発した試験法の妥当性評価を行い、その性能を検証した。

方 法

1. 試料

試料は、愛知県内に流通していた小麦を分析対象とし、粉碎混合したものを用いた。

2. 試薬及び標準品

(1) 試薬及び標準品

アセトニトリル、メタノール、超純水及び酢酸アンモニウムは富士フィルム和光純薬 (株) 又は関東化学 (株) の製品を用いた。試薬のグレードは、前処理操作には残留農薬分析用を、移動相には LC/MS 用を用いた。酢酸アンモニウムは、遺伝子工学研究用を用いた。

混合標準溶液 (DON、NIV、3-Ac-DON 及び 15-Ac-DON 各 100 mg/L) は関東化学 (株) の製品を、DON-3-Glu 標準溶液 (50 mg/L) は富士フィルム和光純薬 (株) の製品を用いた。

(2) 標準溶液の調製

アセトニトリルを用いて 2 倍希釈した混合標準溶液及び DON-3-Glu 標準溶液を等量混合後、アセトニトリルを用いて各化合物が 1 mg/L になるように希釈し、標準溶液を調製した。

3. 固相カラム

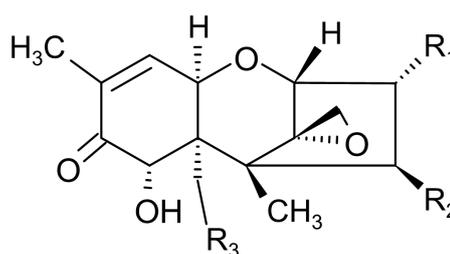
MultiSep#227Trich+ (ジーエルサイエンス (株))、MultiSep#226 AflaZon+ (ジーエルサイエンス (株))、Bond Elute Mycotoxin (ジーエルサイエンス (株))、MycoSpin#400 (ジーエルサイエンス (株))、Bond Elute C18 (ジーエルサイエンス (株))、InterSep C18-C (ジーエルサイエンス (株)) 及び、Supelclean Z-sep/C18 Mixed bed (以下、Z-sep/C18) (SUPELCO、USA) を用いた。

4. 装置及び分析条件

LC-MS/MS は、ExionLC- Triple Quad 5500 システム (AB SCIEX、USA) を用い、表 1 の条件で測定した。各化合物の多重反応モニタリング (MRM) 条件を表 2 に示した。その他、粉碎機 (R-440、Kalita)、振とう機 (SA320、ヤマト科学 (株))、遠心分離機 (Model5930、KUBOTA) を用いた。

5. 検量線

標準溶液をアセトニトリル、水及びメタノールの混液 (1 : 18 : 1) (以下、溶媒混液) で適宜希釈し、0.025、0.05、0.1、0.2、0.4 mg/L の検量線用標準溶液を調製した。各検量線用標準溶液を LC-MS/MS により測定し、得られたピーク面積値を用いて絶対検量線法により検量線を作成した。



	R ₁	R ₂	R ₃
DON	OH	H	OH
NIV	OH	OH	OH
3-Ac-DON	OAc	H	OH
15-Ac-DON	OH	H	OAc
DON-3-Glu	O-Glu	H	OH

図 1 各化合物の構造式

表 1 LC-MS/MS 条件

LC 条件	
カラム	CAPCELL CORE ADME (内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 2.7 μm、(株) 大阪ソーダ)
移動相流速	0.2 mL/min
注入量	3 μL
カラム温度	40°C
移動相	A 液 : 5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液 B 液 : メタノール
グラジエント条件	B 液 2%(0 min) → 55%(1.0-5.0 min) → 95%(12.0 min) → 99%(13.0-14.0 min) → 2%(14.1-15.0 min)

MS 条件

	MS/MS
測定モード	ESI (+, -)
イオン化モード	5.5 kV (+) 及び -4.5 kV (-)
キヤピラリー電圧	400°C
ターボガス温度	50 psi
コーンガス	80 psi
ターボガス	窒素
コリジョンガス	Unit/Low
分解能 Q1/Q3	

表 2 各化合物の MRM 条件

化合物名	保持時間 (分)	定量イオン				定性イオン			
		イオン化モード	プリカーサーイオン (m/z)	プロダクトイオン (m/z)	CE* (eV)	イオン化モード	プリカーサーイオン (m/z)	プロダクトイオン (m/z)	CE* (eV)
DON	4.4	Negative	295	265	15	Negative	295	138	24
NIV	4.0	Negative	371	281	20	Negative	371	311	14
3-Ac-DON	6.3	Positive	339	231	12	Positive	339	203	16
15-Ac-DON	6.0	Positive	356	321	30	Positive	356	137	30
DON-3-Glu	4.2	Negative	517	427	30	Negative	517	457	20

* CE: コリジョンエネルギー

6. 試験溶液の調製

(1) 抽出

通知⁴⁾に準じて、試料 5 g にアセトニトリル及び水の混液 (17 : 3) 20 mL を加え、振とう機を用いて 30 分間激しく振り混ぜた。その後、3000 rpm で 5 分間遠心分離を行い、上澄みを試料抽出溶液とした。

(2) 精製

試料抽出溶液を固相カラムに負荷し、初流 3 mL は捨て、次の流出液 3 mL を分取した。この 2 mL を正確に採り減圧濃縮した後、45℃以下で窒素気流を用いて乾固した。残留物に溶媒混液 0.5 mL を加えて溶かした後、遠心式メンブランフィルター (Ultrafree-CL PTFE membrane 0.2 μm、Merck Millipore、USA) で遠心ろ過し、得られたろ液を試験溶液とした。図 2 に試験溶液調製のスキームを示した。

7. 精製用固相カラムの選定

試料 5 g に標準溶液 1 mL を添加して、試料中の各化合物濃度を 0.2 mg/kg とし、30 分間放置後、方法 6 (1) に従い、試料抽出溶液を調製した。得られた試料抽出溶液を各固相カラムに負荷し、方法 6 (2) に従い精製し、試験溶液を調製した。固相カラム MycoSpin#400 については、試料抽出溶液 1 mL をカラムに負荷した後、遠心分離 (10000 rpm、1 min) を行い、上清 0.4 mL を分取した。濃縮乾固後、溶媒混液 0.1 mL を加えて溶かした後、遠心式メンブランフィルターでろ過したものを試験溶液とした。

8. 妥当性評価試験

通知⁴⁾に従い、試験法の妥当性評価を行った。標準溶液を加えず試料のみから抽出、精製を行い調製したブランク溶液において DON と考えられるピークが観察されたが、添加濃度に相当するピーク面積値の 1/10 未満であったことから評価に影響しないと判断した。

(1) 選択性

マトリクスによるイオン化への影響を確認することにより選択性を評価した。試料から調製したブランク溶液及び溶媒混液に、各化合物が 0.1 mg/L となるよう標準溶液を添加し、それぞれマトリクス添加標準溶液及び溶媒標準溶液とした。それらを LC-MS/MS により分析し、マトリクス添加標準溶液の溶媒標準溶液に対するピーク面積値の比を求め、その比が 0.9~1.1 の範囲にあるかを確認した。

(2) 真度及び精度

試料 5 g に標準溶液を 0.5 mL を添加して、試料中の各化合物濃度を 0.1 mg/kg とし、30 分間放置後、方法 6 (1) に従って抽出操作を行った後、固相カラム Z-sep/C18 を用いて精製し試験溶液を得た。試験溶液を LC-MS/MS を用いて測定し、5 種化合物を定量した。試験者 1 名が 2 併行の添加回収試験を 5 日間行った。真度、併行精度及び室内精度の目標値は、公定法通知に従いそれぞれ 80~110%、10% 未満、及び 15% 未満とした。

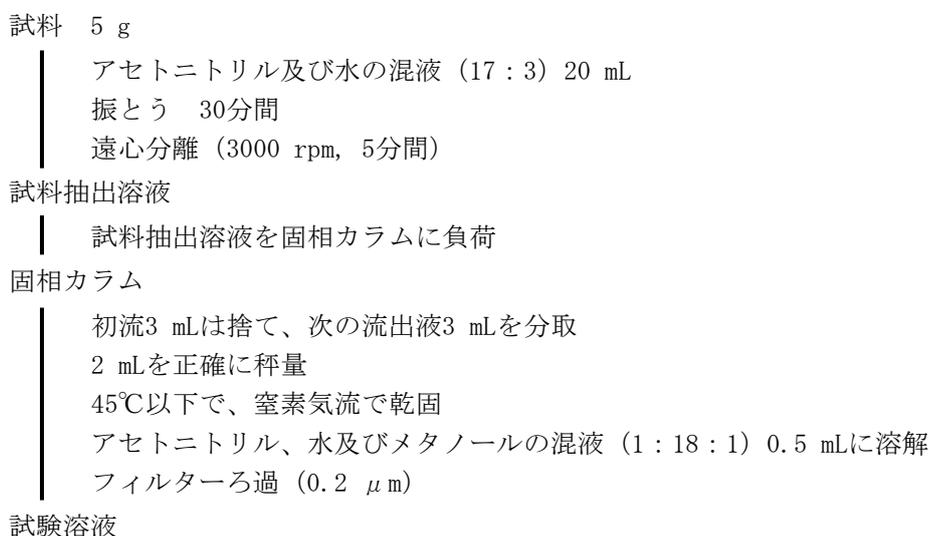


図 2 試験溶液の調製方法

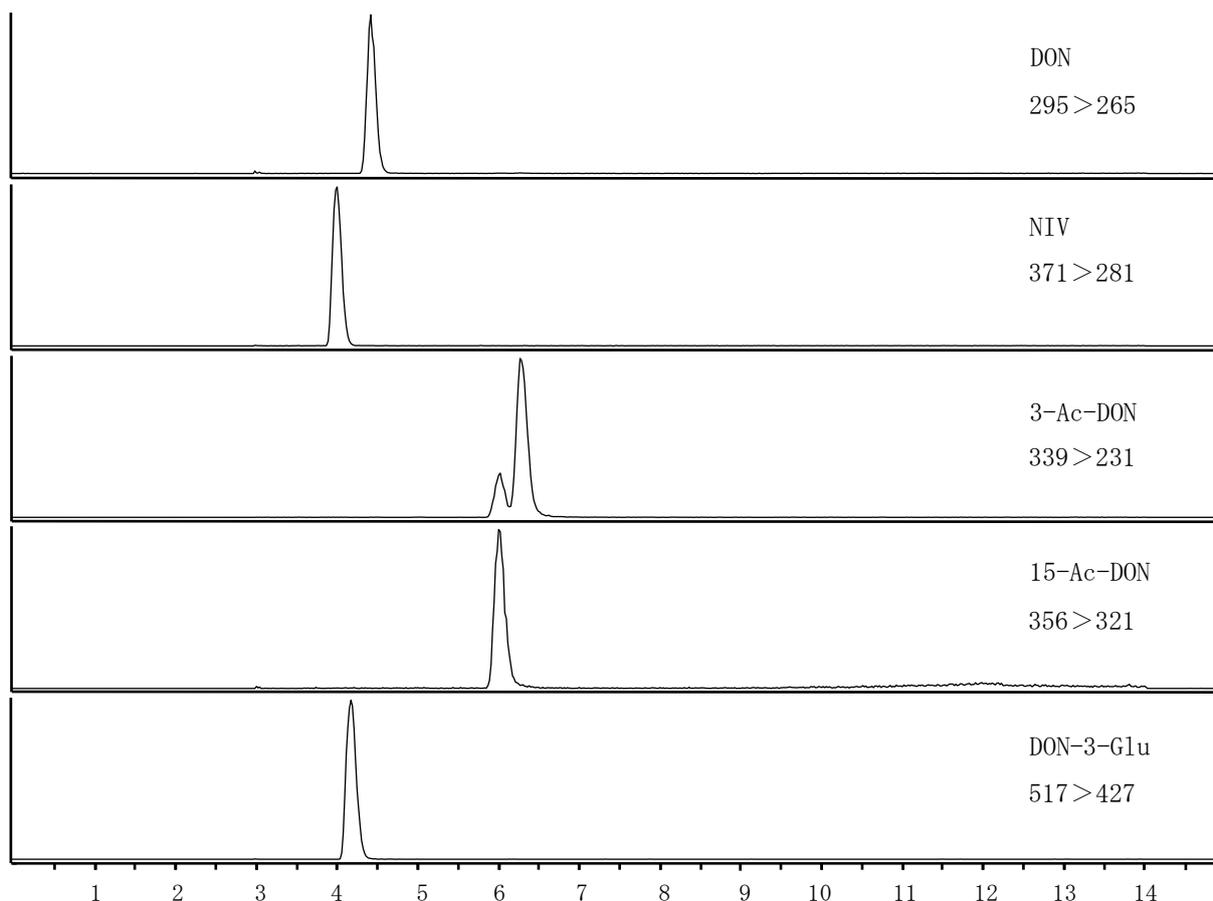


図3 各化合物のMS/MS クロマトグラム

結果及び考察

1. LC-MS/MS 分析条件の検討

LCカラムに、これまでにDON及びNIVの測定で使用実績のあったCAPCELL PAK C18 MGⅢを用いて標準溶液を測定したところ、DON、NIV、DON-3-Gluは分離できたが、位置異性体の関係にある3-Ac-DON及び15-Ac-DONは分離できなかった。そこで、既報⁵⁾を参考にして、アダマンチル基の分離の効果を期待してCAPCELL CORE ADMEを用いて測定したところ、MRMモードのMS/MSクロマトグラムにおいて、全ての化合物が、保持時間4.0分から6.3分間に分離して良好なピークとして検出された(表2及び図3)。

2. 検量線

5種化合物の定量イオンのピーク面積値を用いて絶対検量線を作成したところ、全ての化合物において0.025~0.4 mg/Lの範

囲で相関係数が0.997以上と良好な直線性が得られた(データ非表示)。

3. 精製用固相カラムの選定

精製用固相カラムを選定するため、カビ毒分析前処理用カラムMultiSep#227Trich+、MultiSep#226 AflaZon+、Bond Elute Mycotoxin、MycoSpin#400、無極性相互作用によるマトリクス保持特性が高いBond Elute C18、無極性相互作用に加え二次相互作用によるマトリクス保持特性も期待できるInterSep C18-C、及びルイス酸塩基相互作用によるマトリクス保持特性のあるZ-sep/C18の7種類のカラムを用いて添加回収試験を実施し、5種化合物の回収率を求めた。その結果、表3に示すように、MultiSep#227Trich+及びMultiSep#226 AflaZon+では、DON、NIV、3-Ac-DON及び15-Ac-DONは70%以上の回収率を得られたが、DON-3-Glu(それぞれ0.2%、0.3%)

表 3 各カラムにおける各化合物の回収率 (%)

カラム名	DON	NIV	3-Ac-DON	15-Ac-DON	DON-3-Glu
MultiSep#227Trich+	97.8	79.3	92.0	85.2	0.2
MultiSep#226AfalaZon+	94.0	73.4	89.0	83.8	0.3
Bond Elute Mycotoxin	99.6	79.7	86.3	84.2	66.0
MycoSpin#400	110.4	78.4	88.0	86.5	61.3
Bond Elute C18	98.1	72.3	88.2	80.8	58.9
InterSep C18-C	92.7	77.9	83.3	77.5	65.0
Z-sep/C18	97.6	82.6	87.9	82.0	79.0

はほとんど回収されなかった。DON-3-Glu が回収されなかった要因として、DON-3-Glu はイオン交換樹脂に保持され、溶出されていない可能性が考えられた。Bond Elute Mycotoxin、MycoSpin#400、Bond Elute C18 及び InterSep C18-C では、DON-3-Glu は回収されたが回収率は低かった。DON、NIV、3-Ac-DON 及び 15-Ac-DON については、用いたカラムによる大きな差は認められなかった。一方、Z-sep/C18 では、5 種全ての化合物で良好な結果が得られたことから、本分析法の精製用固相カラムに Z-sep/C18 を選定した。

4. 妥当性評価試験

令和 3 年 7 月に厚生労働省告示⁶⁾により、小麦中の DON は、暫定基準(1.1 mg/kg)から成分規格として 1.0 mg/kg を超えて含有するものであってはならないと改定され、令和 4 年 4 月 1 日から適用となった。それに伴い、令和 3 年に新たな小麦中のデオキシニバレノール試験法が発出され、同試験法と同等以上の性能を有する独自試験法を用いても差し支えないとされた⁴⁾。そこで同通知に示された妥当性評価の方法により、DON 及び DON 類縁体を含む 5 種化合物の一斉分析法の妥当性評価を実施した。

(1) 選択性

マトリクス添加標準溶液と溶媒標準溶液中の各化合物のピーク面積値を比較することによりマトリクスによるイオン化

への影響を確認した。通知の濃度は 1.0 mg/L だが、本法の直線性が得られた検量線範囲は 0.025~0.4 mg/L であったことから、濃度を 0.1 mg/L とし評価を行った。表 4 のピーク面積比に示したとおり、DON(0.91)、NIV (0.94)、及び DON-3-Glu (0.94) において目標値 (0.9~1.1) を満たした。全ての化合物でマトリクス効果によるイオン化抑制が認められたが、特に 3-Ac-DON (0.80) 及び 15-Ac-DON (0.71) についてその影響が大きいと考えられた。

(2) 真度及び精度

本分析法の選択性と直線性の範囲から、小麦中の濃度が 0.1 mg/kg になるように標準溶液を添加した添加回収試験を実施し、各化合物における真度、併行精度及び室内精度を求めた(表 4)。DON は、真度(96.4%)、併行精度 (6.7%) 及び室内精度 (9.2%) とともに目標値 (それぞれ 80~110%、10%未満、及び 15%未満) を満たした。一方で、NIV、3-Ac-DON、15-Ac-DON 及び DON-3-Glu の 4 種類縁体は、併行精度及び室内精度は目標値を満たしたが、真度 (それぞれ 78.1%、72.7%、65.9%、75.7%) は目標値と比べて低い値であった。添加回収試験より得られた真度をピーク面積比で除し、マトリクスの影響を除いた真度 (補正真度) を推定したところ、補正前に比べて改善が認められたことから、イオン化抑制効果の影響を取り除ければ真度においても目標値を達成できると考えられた。

表4 各化合物の妥当性評価試験結果

化合物名	添加濃度 (mg/kg)	真度 (%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)	ピーク面積比	補正真度 (%)
DON	0.1	96.4	6.7	9.2	0.91	105.9
NIV	0.1	78.1	4.5	7.6	0.94	83.1
3-Ac-DON	0.1	72.7	2.8	6.1	0.80	90.9
15-Ac-DON	0.1	65.9	2.9	8.6	0.71	92.8
DON-3-Glu	0.1	75.7	5.7	8.8	0.94	80.5

まとめ

本研究では、DON 及びその類縁体の一斉分析法の開発を目的として、LC-MS/MS 分析条件及び精製に最適な固相カラムを選定した。LC カラムに CAPCELL CORE ADME を用いて検討した結果、5 種化合物の分離検出が可能となった。また、精製用の固相カラムに Z-sep/C18 を用いたところ、5 種全ての化合物において良好な回収率が得られた。次に、本分析法の妥当性評価を実施したところ、DON については評価基準を満たす結果が得られた。他の 4 種類縁体については、低回収率ではあるが、精度よく再現性が高い結果が得られた。低回収率の原因には、マトリクスによるイオン化抑制効果の影響が考えられ、今後より夾雑物を除去できる前処理法の検討等が必要と考えられる。

参考文献

- 1) 芳澤宅實: トリコテセン系マイコトキシンによるヒトの中毒事例. *Mycotoxin* 53(2):113-118, 2003
- 2) Clemens S, Benedikt W, Philipp F, Herbert M, Alexandra M, Franz B,

Rainer S, Rudolf K, Gerhard A: The Metabolic Fate of Deoxynivalenol and Its Acetylated Derivatives in a Wheat Suspension Culture. Identification and Detection of DON-15-O-Glucoside, 15-Acetyl-DON-3-O-Glucoside and 15-Acetyl-DON-3-Sulfate. *Toxins* 7:3112-3126, 2015

- 3) 食品安全委員会: かび毒評価書 デオキシニバレノール及びニバレノール 第2版 2019
- 4) 厚生労働省大臣官房生活衛生・食品安全審議官通知 “小麦中のデオキシニバレノールの試験法について” 令和3年9月30日付け生食発第0930第1号
- 5) 酒井康行、小西伊久江: フザリウムトキシン一斉分析法の検討. 福井県衛生環境研究センター年報 15:72-77, 2016
- 6) 厚生労働省大臣官房生活衛生・食品安全審議官通知 “食品、添加物等の規格基準の一部を改正する件について(小麦中のデオキシニバレノールに係る基準値の設定)” 令和3年7月30日付け生食発0730第7号

Development of simultaneous analysis method for mycotoxin deoxynivalenol and its analogues

Hisato Mori, Masahiko Tachi, Eiji Ueno, Koji Tomita, Takashi Tanahashi

Deoxynivalenol (DON) is a toxic secondary metabolite produced by *Fusarium* species, and its standard value has been set for wheat in Japan. Several analogues of DON, such as acetylated and glycosylated derivatives, have been found in cereal. Although such analogues are considered to cause a potential toxicity similar to DON in the body, an analytical method for those analogues has not been publicly established. In this study, we determined the liquid chromatograph-tandem mass spectrometer (LC-MS/MS) analysis conditions and selected the optimal solid-phase column for purification in order to develop a simultaneous analysis method for DON and four analogues. The developed method was validated by evaluating a series of parameters such as specificity, accuracy and precision. The result showed that DON achieved acceptable values for all parameters. The four analogues did not achieve acceptable values for accuracy, but achieved for repeatability and reproducibility, range from 2.8 to 5.7%, and 6.1 to 8.8%, suggested that this method was reproducible. A probable factor contributing to the low accuracy of the four analogues would be an effect of ionization suppression by sample matrix.

Key words : Mycotoxin, Deoxynivalenol, Deoxynivalenol analogues, LC-MS/MS

調 査 研 究

室内環境中における ピレスロイド系ワンプッシュ式殺虫剤についての検討

山本優子、青木梨絵、神徳好美、續木洋一、上山 純¹、棚橋高志

¹名古屋大学大学院医学系研究科

要 旨

ピレスロイドは、衛生害虫等の防除に汎用されている化学物質群である。近年、家庭用殺虫剤としてワンプッシュ式のピレスロイド系殺虫剤が複数発売されている。これらの製品は1回の噴霧で薬剤の粒子が広がり、長時間効果が持続することを謳っているが、室内での分布状況等については公開されていない。そこで、ピレスロイドのうち家庭用殺虫剤の有効成分として頻用されているトランスフルトリンを対象とし、3種の製品を単回使用した際の分布状況、経時推移及び室内塵中含有量、並びに複数回使用した際の蓄積状況について調査したところ、製品により分布状況が異なること、噴霧された薬剤は空気中を漂った後に沈降し、室内に長時間残留することが判明した。また、複数回使用により床面付着量、室内空気中濃度ともに増加したが、換気により室内空気中濃度の増加は抑制された。これらのことから、室内でワンプッシュ式の殺虫剤を使用する場合は、使用回数に注意し、適度な換気や清掃が必要であると考えられた。

キーワード：ピレスロイド、ワンプッシュ、室内

序 文

ピレスロイドとは除虫菊（シロバナムシヨケギク）に含まれる殺虫成分であるピレトリン及びこれと化学構造が類似した合成化合物の総称であり、農薬や家庭用殺虫剤として広く使用されている。ピレスロイドは昆虫の体内に取り込まれると、神経軸索の膜の表面にあるナトリウムチャンネルに作用し、チャンネルを開放状態にすることで、正常な神経伝達を阻害する^{1,2)}。阻害を受けた昆虫は神経系の異常興奮が持続し、けいれん、麻痺を起こして死に至る。ヒトではピレスロイドは速やかに代謝、排泄されるため毒性が低いとされているが、大量曝露や大量吸入により呼吸困難、喉頭浮腫、咳・

喉の違和感、悪心、眼症状などが生じることが報告されている³⁻⁵⁾。厚生労働省が発表している「家庭用品に係る健康被害の年次取りまとめ報告」によると、2021年度では家庭用品の吸入事故等に関する報告（68件）のうち、殺虫剤に関するものが12件であり、すべてがピレスロイド含有剤によるものであった⁶⁾。また、妊娠期のピレスロイドの曝露が子供の神経発達に影響を及ぼす可能性も指摘されている^{7,8)}。

家庭用殺虫剤が対象とする害虫は蚊の成虫が主である。従来、蚊の防除には主に蚊取り線香や電気蚊取りマット、液体蚊取りなどが用いられてきたが、近年、ワンプッシュ式製品が多種販売されている。これら

の製品は1回の噴霧で薬剤の粒子が広がり、長時間に渡り蚊を駆除することが謳われているが、室内での分布状況等については公開されていない。そこで、ピレスロイドのうちワンプッシュ式の製品に頻用されているトランスフルトリンを対象とし、含有製品を単回使用した際の分布状況、経時推移及び室内塵中含有量、並びに複数回使用した際の蓄積状況について調査した。

方 法

1. 試料

トランスフルトリンを有効成分とするワンプッシュ式殺虫剤3製品(A, B, C)を試料とした。製品A及びCは医薬部外品、製品Bは一般家庭用品であった。いずれも4.5~8畳あたり1回使用するよう使用方法に記載されていた。

2. 測定場所

当所の3室を模擬居室(実験室1:約23.6 m²、実験室2:約13.9 m²、実験室3:約10.3 m²)とし調査を行った。実験室1は広い床面積が得られること、実験室2は北に窓、南に出入り扉があり窓開放による換気効率が高いこと、実験室3は窓がなく施設の機械換気以外の要因による気流が少ないことから実験室として選定した。

3. 測定項目及び測定方法

(1)測定項目

トランスフルトリンの床面付着量、室内空气中濃度及び室内塵1gあたりの含有量を測定した。

(2)測定方法

床面付着量は定量ろ紙(No.5C、55 mm、ADVANTEC)を床面に配置し、殺虫剤を噴霧して一定時間後に回収した。

室内空気はエムポアディスクC18(2215(FF)、47 mm、CDS Analytical、USA)を接続したミニポンプ(MPΣ100H、柴田科学株式会社)を床面高さ120 cmにセットし、流速1 L/分で24時間吸引捕集した。エムポアディスクC18は1 µg/mLブチルヒドロキシトルエン溶液に浸潤し、風乾したものを使用した。

室内塵の採取には、ダストサンプラーを接続した家庭用掃除機を用いた。ダストサンプラー内部には、目開き1 mm(16メッシュ)及び75 µm(200メッシュ)の篩を各1枚重ねて装着し、床面から室内塵を吸い取り、200メッシュ上の微細塵を測定用試料とした。

回収した定量ろ紙、エムポアディスクC18及び室内塵をそれぞれ10 mL共栓付試験管に入れ、アセトン(環境分析用、富士フイルム和光純薬株式会社)を添加し、超音波を10分間照射した。さらに3,000 rpmで5分

表1 GC-MS条件

カラム	HP-5MS(Agilent Technologies、USA) (30 m × 0.25 mm、0.25 µm)	
昇温条件	50°C(2分)→40°C/分→170°C →10°C/分→290°C(5分)	
キャリアガス	ヘリウム(ガス流量:1.0 mL/min)	
注入口温度	250°C	
イオン化法	電子イオン化法	
イオン源温度	230°C	
MS四重極温度	150°C	
注入量	1 µL	
測定イオン	トランスフルトリン	定量イオン:m/z 163 確認イオン:m/z 91
	アントラセン-d10	定量イオン:m/z 188 確認イオン:m/z 186
	9-ブロモアントラセン	定量イオン:m/z 258 確認イオン:m/z 256

間遠心分離を行い、上清を試験液として GC-MS (6890 GC/5973 MSD、Hewlett Packard、USA) により分析を行った。GC-MS 条件は表 1 に示した。

標準液はトランスフルトリン標準液 (Dr. Ehrenstorfer GmbH、Germany) を用いた。内部標準は、定量ろ紙及びエムポアディスク C18 分析時にはアントラセン-d10 (関東化学株式会社)、室内塵分析時には 9-プロモアントラセン (入手元等不明) を用いた。内部標準濃度はどちらも 0.1 mg/L とした。

4. 調査内容

4.1. 分布状況調査

実験室 1 において各製品の単回使用時の床面付着量を調査した。図 1 に示すように定量ろ紙を縦 3 m、横 2 m の範囲に 50 cm 間隔で 35 枚配置した。配置後に③の真上 (高さ 148 cm) から製品 A、B 及び C を 1 回噴霧し、1 時間後に定量ろ紙を回収した。

4.2. 経時推移調査

実験室 2 において、製品 A 及び C の床面付着量と室内空气中濃度、製品 B の室内空气中濃度を調査した。床面付着量では図 2 に示すように、噴霧位置から 1 m 及び 2 m 離れた 2 か所に定量ろ紙を各 8 枚配置した。製品を 1 回噴霧し、噴霧から 10 秒、10 分、30 分、1 時間、3 時間、6 時間、24 時間、48 時間後にそれぞれ 1 枚ずつ定量ろ紙を回収

した。室内空気は噴霧位置から 2.5 m 離れた場所にポンプを設置し、1) 噴霧直後から 24 時間後まで、及び 2) 24 時間後から 48 時間後まで、の 2 回捕集した。

4.3. 室内塵中含有量調査

実験室 3 においてトランスフルトリンの室内空气中濃度、室内塵 1 g あたりの含有量を測定した。手順を図 3 に示した。室内空気及び室内塵の採取方法は測定方法に示したとおりである。まず初めに、製品噴霧前に家庭用掃除機を用いて室内塵を採取した。室内塵採取後、製品 A を噴霧し、その直後から 24 時間後までミニポンプを用いて室内空気を捕集した。室内空気捕集終了後、噴霧から 24 時間後時点の室内塵を採取した。製品噴霧の 96 時間後から 24 時間、再度室内空気を捕集し、捕集終了後に噴霧から 120 時間後時点の室内塵を採取した。

4.4. 蓄積状況調査

実験室 2 において、製品 A 及び C の床面付着量と室内空气中濃度、製品 B の室内空气中濃度を調査した。床面付着量では図 2 に示す 2 か所に定量ろ紙を各 4 枚配置した。図 4a) に示すように 24 時間ごとに製品を 1 回、計 4 回噴霧し、床面付着量では初回の噴霧から 24、48、72、96 時間後にそれぞれ 1 枚ずつ定量ろ紙を回収した。室内空気は、1) 初回の噴霧直後から 24 時間後まで、2) 24

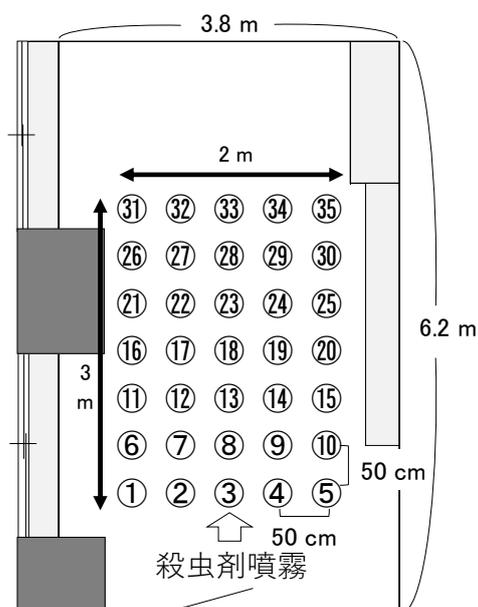


図 1 分布状況調査見取り図

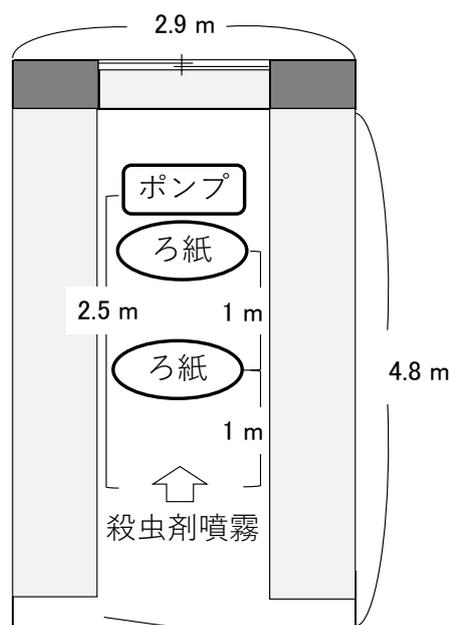


図 2 経時推移及び蓄積状況調査見取り図



図 3 室内塵中含有量調査プロトコール

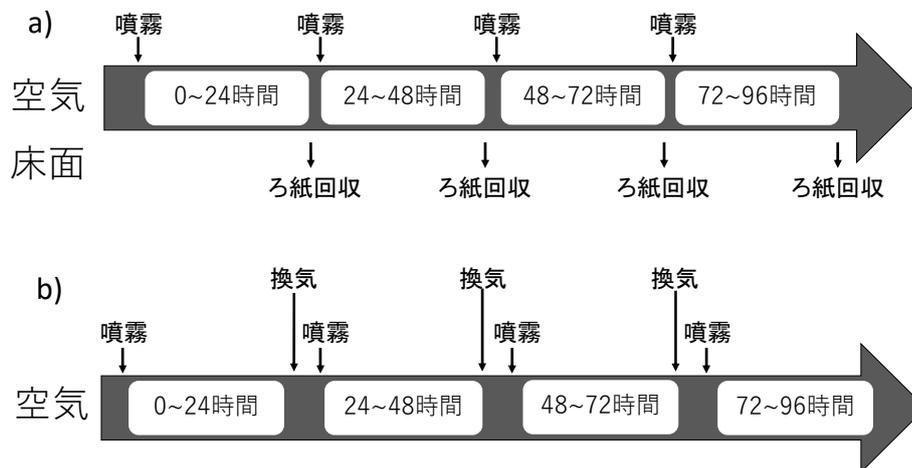


図 4 蓄積状況調査プロトコール

a) 換気未実施 b) 換気実施

時間後から 48 時間後まで、3) 48 時間後から 72 時間後まで、4) 72 時間後から 96 時間後まで、の 4 回捕集した。加えて、窓開け換気の効果を検討するために、図 4b) に示すように 24 時間ごとの空気捕集終了後に 5 分間、実験室の窓と扉を開放し換気を行った後に製品を噴霧し、上記と同様に室内空気を捕集した。

結 果

1. 分布状況調査

分布状況調査には広い床面積を必要とするため、模擬居室のうち一番広い実験室 1 を使用した。一畳を 1.62 m² で計算すると、4.5~8 畳は 7.29~12.96 m² となり適用畳数より広いが、今回定量ろ紙を配置した範囲は 6 m² となることから、1 回の噴霧で実験に十分な量の薬剤が噴霧されたと考えられた。

全ての製品で、噴霧した位置から前方 3 m 及び左右それぞれ 1 m の範囲の床面からトランスフルトリンが検出された。今回の調査では縦 3 m×横 2 m の範囲に定量ろ紙を配置したが、実際にはさらに広い範囲に薬剤

表 2 各製品の床面付着量の
平均値、最大値及び最小値 (µg)

製品	平均値	最大値	最小値
A	0.39	0.50	0.30
B	1.21	2.75	0.50
C	0.77	1.28	0.57

が分布したと推測される。

各製品の 35 地点の定量ろ紙 1 枚当たりのトランスフルトリンの付着量の平均値、最大値及び最小値を表 2 に示した。床面付着量の平均値は製品 B が最も高値であった。また製品 B は、最小値と最大値の間には 5 倍以上の開きがあった。それぞれの製品の床面付着量の平均値を 100 とした場合の各地点の床面付着量の割合を図 5 に示した。各製品の地点ごとの付着割合は製品 A では 76~129%、製品 B では 41~227%、製品 C では 73~166%であった。製品 A 及び C では床面にまんべんなく広がっていたが、製品 B では地点による床面付着量のばらつきが大きいなど、分布状況は製品ごとに違いがあった。

83	76	87	93	96
97	80	98	101	105
78	97	102	115	107
85	111	93	114	106
87	97	129	102	105
93	107	128	107	105
88	89	112	115	114

44	49	44	64	130
44	45	51	78	150
42	43	74	136	156
54	48	96	145	143
86	70	140	216	192
67	65	66	173	221
41	58	106	138	227

90	112	131	115	95
83	118	123	104	101
85	131	95	100	105
133	99	97	97	99
166	101	86	97	88
105	101	81	82	82
82	84	84	73	73

図5 各製品の分布状況

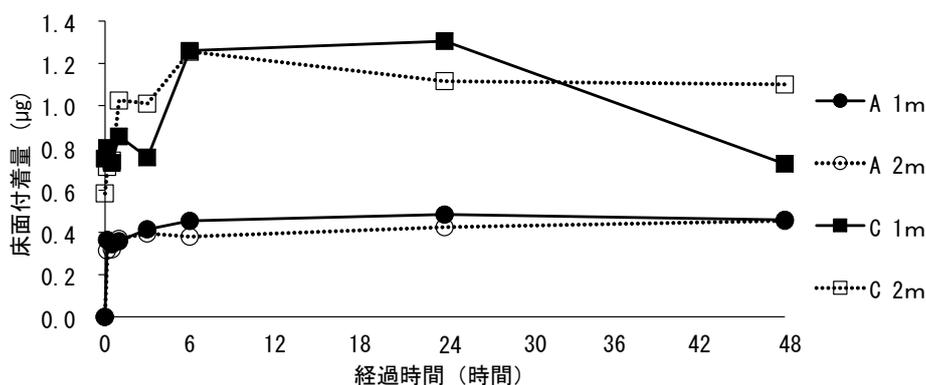


図6 単回使用時の床面付着量の経時推移

※各床面付着量は噴霧時から経過時間まで床面に配置したろ紙への付着量を表す

2. 経時推移調査

各製品を単回使用した場合の床面付着量の推移を図6に示した。製品Bは、分布状況調査で採取場所によるばらつきが大きかったため、床面付着量測定は実施しなかった。製品Aは噴霧から10分後には床面からトランスフルトリンが検出され、その後時間の経過に伴い付着量が上昇するものの、噴霧10分後から48時間後まで付着量はほぼ安定していた。製品Cは噴霧から10秒後に床面からトランスフルトリンが検出され、噴霧から6時間後にかけて付着量が上昇し、その後24時間後まで付着量は安定していた。48時間後には付着量の減少傾向が見られるものの、3時間後と同レベルのトランスフルトリンが検出された。付着量が減少した理由は明らかではなく、採取地点におけるばらつきの可能性や時間経過による分解の可能性が考えられた。

室内空气中濃度の推移を図7に示した。室内空气中濃度では噴霧直後から24時間

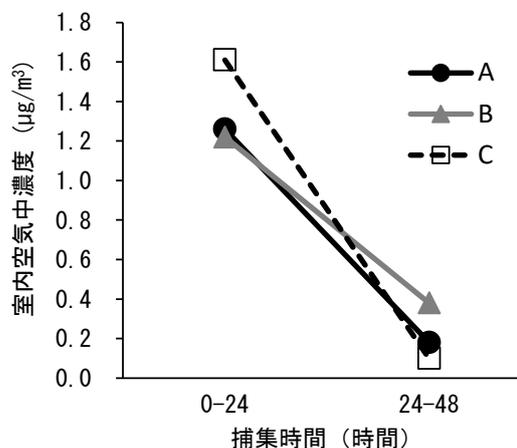


図7 単回使用時の室内空气中濃度の経時推移

後までの濃度と比較し、24時間後から48時間後までの濃度は製品Aが14%、製品Bが31%、製品Cが6%と大幅に減少していた。

本調査では床面へのトランスフルトリンの付着について、定量ろ紙を用いた調査を行ったが、より実態に即した調査を行うため、室内塵中の含有量について検討した。

3. 室内塵中含有量調査

製品Aの室内塵1gあたりのトランスフルトリン量及び室内空气中トランスフルトリン濃度を図8に示した。製品噴霧前の室内塵からもトランスフルトリンが5.3 µg/g fine dust 検出されているが、本調査に先立つ予備調査でも同室を使用しており、その際のトランスフルトリンが残存していたと考えられる。製品噴霧前の室内塵と比較して、噴霧から24時間経過後に採取した室内塵で

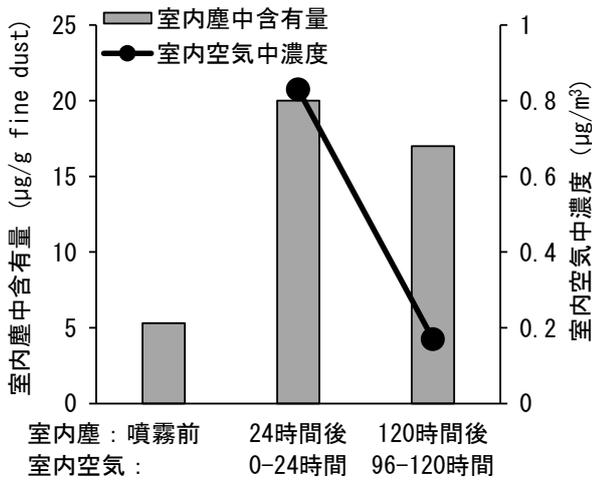


図8 単回使用時の室内塵中含有量及び室内空气中濃度 (A)

はトランスフルトリン量が増加しており、トランスフルトリンが室内塵に吸着していることが確認された。噴霧から120時間後に採取した室内塵中トランスフルトリン量は24時間後に採取した室内塵中量の85%であり、トランスフルトリンは室内塵に吸着し、室内に残存していると推測された。噴霧から96時間後から120時間後の室内空气中濃度は、噴霧直後から24時間後までの室内空气中濃度の20%まで減少していた。

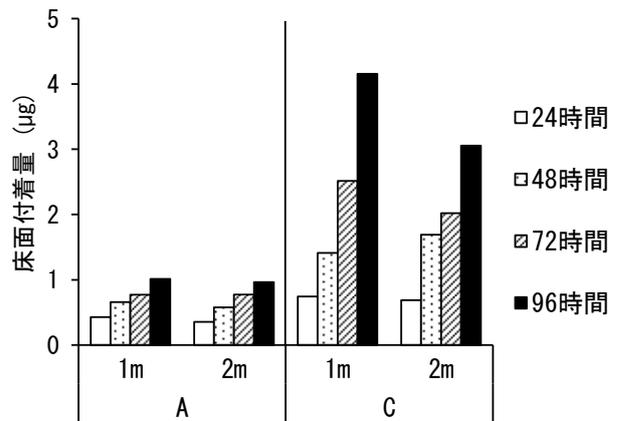


図9 複数回使用時の床面付着量の蓄積状況

※各床面付着量は初回噴霧時から回収時間まで床面に配置したろ紙への付着量を表す

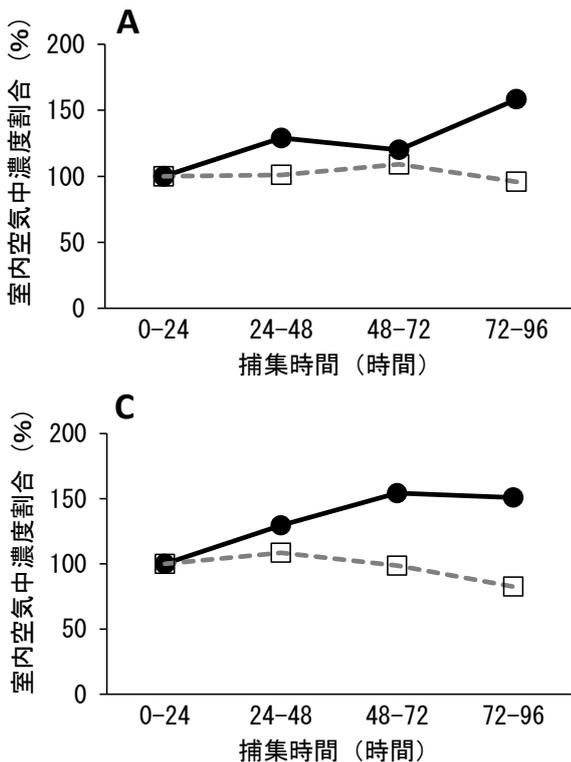


図10 複数回使用時の室内空气中濃度の蓄積状況

●換気未実施
□換気実施

4. 蓄積状況調査

24時間ごとに製品A及びCをそれぞれ複数回使用した場合の床面付着量を図9に示した。先の調査では床面への薬剤の吸着について、室内塵を用いることの有用性を示したが、連日の室内塵の採取では、分析に足りる量の室内塵の採取が困難となることから、定量ろ紙を用いて床面付着量を検討した。床面付着量は製品A、Cともに使用回数の増加に伴い上昇する傾向が認められた。

室内空气中濃度の変化を図10に示した。窓開け換気を実施した場合及び実施しなかった場合のそれぞれ初回の噴霧直後から24時間後までの室内空气中濃度を100とし、濃度の変化を示した。換気を実施しなかった場合は、噴霧回数が増えるにつれ室内空气中濃度が上昇する傾向があった。製品A及びCでは換気を実施することで室内空气中濃度の上昇が抑制された。製品Bでは換気の有無による室内空气中濃度の差は確認できなかった。

考 察

分布状況調査の結果から、ワンプッシュ式ピレスロイド系殺虫剤は1回の噴霧で少なくとも前方3m及び左右それぞれ1mの範囲の床に薬剤が広がることが判明した。製品を単回使用した場合、室内空气中濃度は噴霧直後から24時間後までの濃度に比較し、24時間後から48時間後では大幅に減少していたが、床面からは48時間後でもトランスフルトリンが検出された。また床面から採取した室内塵からは120時間後でもトランスフルトリンが検出された。これらの結果から、噴霧後に空气中に浮遊したトランスフルトリンは時間の経過に伴い床面あるいは室内塵に付着し、室内に長時間とどまると考えられた。このため、薬剤が浮遊する範囲のテーブルや床に飲食物や食器などがあると、薬剤が付着し、飲食により体内に取り込む可能性がある。特に乳幼児は、室内のおもちゃやハイハイをした手を口に運ぶことがあり、これは経口的に薬剤を摂取する機会が増える要因になる。ワンプッシュ式の殺虫剤を噴霧する際には、近

くに飲食物、食器やおもちゃなど口に入る可能性があるものを置かないこと、使用後は適宜、床面やテーブルなどを清掃し、薬剤を除去することが必要であると考えられる。

欧州議会及び理事会規則528/2012による評価ではトランスフルトリンの無毒性量(NOEL)は1.0 mg/kg bw/day(ラット)である⁹⁾。ハザード比(HQ)を用いてリスク評価を試みた。HQは以下の式で表される¹⁰⁾。

$$HQ = \text{ヒトへの推定暴露量 (EHE)} / \text{耐容一日摂取量 (TDI)}$$

TDIは、ヒトが一日あたりに摂取しても安全な量であり、動物試験などで求められたNOELを不確実係数で除してヒトへの無毒性量としたものである。不確実係数を100とすると、トランスフルトリンのTDIは0.01 mg/kg bw/dayとなる。分布調査で最も付着量の多かった定量ろ紙からは2.75 µgのトランスフルトリンが検出されており、仮にこれを3歳児(体重15 kg)が摂取したとすると、HQは0.018となりリスクの懸念は低いと考えられた。

また、連続して複数回使用することでトランスフルトリンの室内空气中濃度及び床面付着量は上昇する傾向がある。今回の調査では、室内空气中のトランスフルトリン濃度は、換気を行うことで上昇を抑えることができた。製品Bでは換気の有無による差が認められなかったが、これは製品Bが今回調査した3製品の中で床面への付着量が最も多く、換気のみでは床面に付着した薬剤を除去できなかったためではないかと考えられる。トランスフルトリンは蒸気圧が高く揮散しやすい性質があるため、床面に残留したトランスフルトリンが再度揮散した可能性があり、今後の調査が必要である。また今回は調査を行っていないが、製品A及びCの説明書きには、噴霧後の薬剤は天井や壁に付着することが記載されており、床面だけでなく天井や壁に付着したトランスフルトリンが再揮散し、室内空气中濃度を上昇させていることが推測される。これらのことから、室内でワンプッシュ式の殺虫剤を使用する場合は、使用回数に注

意し、適度な換気や清掃が必要であると考
えられた。

文 献

- 1) 平田晃一：神経系作用化合物の作用機構
に関する研究．日本農薬学会誌 41(2)：
160-167, 2016.
- 2) Field LM, Emyr Davies TG, O'Reilly AO,
Williamson MS, Wallace BA: Voltage-gated
sodium channels as targets for pyrethroid
insecticides. *European Biophysics Journal*
46(7):675-679, 2017.
- 3) 内藤裕史：中毒百科 - 事例・病態・治療
- (改訂第2版) . 254-257, 2001, 南江
堂, 東京.
- 4) 永美大志, 末永隆次郎, 中崎美峰子, 前
島文夫, 西垣良夫, 夏川周介：花卉栽培者
の農薬曝露調査 - 大量曝露者との対話 - .
日本農村医学会雑誌 64(4):671-679, 2015.
- 5) 秋月裕則, 岩崎英隆, 武市充生, 庄野仁
志, 福田靖：ピレスロイドによる咽喉頭浮
腫の1例. *Tokushima Red Cross Hospital
medical journal* 18(1):47-51, 2013.
- 6) 厚生労働省医薬・生活衛生局医薬品審査
管理課化学物質安全対策室：2021年度家
庭用品に係る健康被害の年次とりまとめ
報告； [https://www.mhlw.go.jp/content/
/11124000/001023951.pdf](https://www.mhlw.go.jp/content/11124000/001023951.pdf)
- 7) Miani A, Imbriani G, De Filippis G,
De Giorgi D, Peccarisi L, Colangelo M,
Pulimeno M, Castellone MD, Nicolardi
G, Logroscino G, Piscitelli P: Autism
spectrum disorder and prenatal or
early life exposure to pesticides: A
short review. *International Journal
of Environmental Research and Public
Health* 18(20):10991, 2021.
- 8) Watkins DJ, Fortenberry GZ, Sánchez
BN, Barr DB, Panuwet P, Schnaas L,
Osorio-Valencia E, Solano-González M,
Ettinger AS, Hernández-Ávila M, Hu H,
Téllez-Rojo MM, Meeker JD: Urinary 3-
phenoxybenzoic acid (3-PBA) levels
among pregnant women in Mexico City:
Distribution and relationships with
child neurodevelopment. *Environmental
Research* 147:307-313, 2016.
- 9) Regulation (EU) n° 528/2012 concerning
the making available on the market and
use of biocidal products; [https://ci
rcabc.europa.eu/sd/a/910c7533-aba6-4
a93-87c3-31c5f2b04445/Transfluthrin%
20-%20PT18](https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2012/528/oj)
- 10) 独立行政法人製品評価技術基盤機構：
化学物質のリスク評価についてーよりよ
く理解するためにー3； [https://www.nit
e.go.jp/chem/shiryo/ra/about_ra3.html](https://www.nite.go.jp/chem/shiryo/ra/about_ra3.html)

A study of pyrethroid one-push insecticides in indoor environments

Yuko Yamamoto, Rie Aoki, Yoshimi Shintoku,
Hirokazu Tsuzuki, Jun Ueyama¹, Takashi Tanahashi
¹Nagoya University Graduate School of Medicine

Pyrethroids are a group of chemicals used widely for the control of sanitary pests and other insects. In recent years, many one-push pyrethroid insecticides have become available as household insecticides. These products claim that the particles of the chemical spread and the insecticidal effect lasts for a long time with a single injection, but other information such as the indoor distribution of the chemical has not been disclosed. Transfluthrin, which is frequently used as an active ingredient in household insecticides among pyrethroids, was the subject of this study. The distribution status, temporal trends, content in floor dust, and accumulation after multiple uses of the three products were investigated. The survey revealed that the distribution status differs depending on the product and that the sprayed insecticide settles after drifting in the air and remains for a long time. In addition, both the amount of adhesion to the floor and indoor concentration increased after multiple uses, but ventilation suppressed the increase in indoor concentration. From these results, it was considered that when using one-push insecticides indoors, attention should be paid to the number of times they are used, and adequate ventilation and cleaning are necessary.

Key words: pyrethroid, one-push, indoor

 他誌掲載論文抄録

Impact of the Coronavirus Disease 2019 Pandemic on the Clinical Features of Pediatric Respiratory Syncytial Virus Infection in Japan

Ozeki S¹, Kawada J¹, Yamashita D¹, Yasufuku C¹, Akano T¹, Kato M¹, Suzuki K¹, Tano C¹, Matsumoto K¹, Mizutani S¹, Mori A¹, Nishio N^{1,2}, Kidokoro H¹, Yasui Y, Takahashi Y¹, Sato Y^{1,3} on behalf of Nagoya Collaborative Clinical Research Team

¹Department of Pediatrics, Nagoya University Graduate School of Medicine,

²Department of Advanced Medicine, Center for Advanced Medicine and Clinical Research, Nagoya University Hospital, ³Division of Neonatology, Center for Maternal-Neonatal Care, Nagoya University Hospital

Open Forum Infectious Diseases 9(11):ofac562. doi:10.1093/ofid/ofac562(2022)

Mitigation measures implemented during the coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic remarkably reduced the incidence of infectious diseases among children. However, a re-emergence of respiratory syncytial virus (RSV) infection was observed in 2021 in Japan. We compared the clinical characteristics of hospitalized patients with RSV infection before and during COVID-19. Compared with before COVID-19, a 2.6-fold increase in RSV cases in the 2–5 years age group was observed from sentinel surveillance during COVID-19, whereas a 1.2-fold increase was noted in the same age group

among hospitalized patients. On average for all patients, consolidation shadows obtained on radiography were less frequently observed, and reduced respiratory assistance and hospitalization stay was required in patients with RSV infection during COVID-19. Coronavirus disease 2019 and social activity restriction caused epidemiological changes in pediatric RSV infections, and a majority of patients with RSV infection aged ≥ 2 years did not develop severe symptoms requiring hospitalization. The RSV symptoms during the COVID-19 outbreak were equivalent to or milder than in the previous seasons.

Nationwide and long-term molecular epidemiologic studies of mumps viruses that circulated in Japan between 1986 and 2017

Kidokoro M¹, Shiino T², Yamaguchi T³, Nariai E⁴, Kodama H⁴, Nakata K⁵, Sano T⁶, Gotou K⁷, Kisu T⁸, Maruyama T⁹, Kuba Y¹⁰, Sakata W¹¹, Higashi T¹¹, Kiyota N¹², Sakai T¹², Yahiro S¹², Nagita A¹³, Watanabe K¹⁴, Hirokawa C¹⁴, Hamabata H¹⁵, Fujii Y¹⁶, Yamamoto M¹⁶, Yokoi H¹⁷, Sakamoto M¹⁷, Saito H¹⁸, Shibata C¹⁸, Inada M¹⁹, Fujitani M¹⁹, Minagawa H, Ito M, Shima A²⁰, Murano K²¹, Katoh H²¹, Kato F²¹, Takeda M²¹, Suga S²², The Surveillance Team for Mumps Virus in Japan

¹Department of Quality Assurance, Radiation Safety, and Information Management, National Institute of Infectious Diseases, ²Center for Clinical Sciences, National Center for Global Health and Medicine, ³Public Hygiene Division, Gifu Prefectural Tono Region Public Health Center, ⁴Department of Health and Food Safety, Ishikawa

Prefectural Institute of Public Health and Environmental Science, ⁵Division of Virology, Osaka Institute of Public Health, ⁶Division of Microbiology, Kanagawa Prefectural Institute of Public Health, ⁷Division of Virology, Ibaraki Prefectural Institute of Public Health, ⁸Virus Research Center, Clinical Research Division, Sendai National Hospital, ⁹Department of Infectious Diseases, Gifu Prefectural Research Institute for Health and Environmental Sciences, ¹⁰Department of Medical Microbiology and zoology, Okinawa Prefectural Institute of Health and Environment, ¹¹Kitakyushu City Institute of Health and Environmental Sciences, ¹²Department of Microbiology, Kumamoto Prefectural Institute of Public-Health and Environmental Science, ¹³Department of Pediatrics, Mizushima Central Hospital, ¹⁴Virology Section, Niigata Prefectural Institute of Public Health and Environmental Sciences, ¹⁵Awase Daiichi Clinic, ¹⁶Division of Biological Science, Hiroshima City Institute of Public Health, ¹⁷Health Science Division, Chiba City Institute of Health and Environment, ¹⁸Department of Microbiology, Akita Prefectural Research Center for Public Health and Environment, ¹⁹Virology and Epidemiology Division, Nara Prefecture Institute of Health, ²⁰Microbiology Division, Saga Prefectural Institute of Public Health and Pharmaceutical Research, ²¹Department of Virology III, National Institute of Infectious Diseases, ²²Department of Pediatrics, National Hospital Organization Mie National Hospital

Frontiers in Microbiology 13:728831. doi:10.3389/fmicb.2022.728831(2022)

In Japan, major mumps outbreaks still occur every 4–5 years because of low mumps vaccine coverage (30-40%) owing to the voluntary immunization program. Herein, to prepare for a regular immunization program, we aimed to reveal the nationwide and long-term molecular epidemiological trends of the mumps virus (MuV) in Japan. Additionally, we performed whole-genome sequencing (WGS) using next-generation sequencing to assess results from conventional genotyping using MuV sequences of the small-hydrophobic (SH) gene. We analyzed 1,064 SH gene sequences from mumps clinical samples and MuV isolates collected from 25 prefectures from 1986 to 2017. The results showed that six genotypes, namely B (110), F (1), G (900), H (3), J (41), and L (9) were identified, and the dominant genotypes changed every decade in Japan since the 1980s. Genotype G has been exclusively circulating since the early 2000s. Seven clades were identified for genotype G using SH sequence-based classification. To verify the results, we

performed WGS on 77 representative isolates of genotype G using NGS and phylogenetically analyzed them. Five clades were identified with high bootstrap values and designated as Japanese clade (JPC)-1, -2, -3, -4, -5. JPC-1 and -3 accounted for over 80% of the total genotype G isolates (68.3 and 13.8%, respectively). Of these, JPC-2 and -5, were newly identified clades in Japan through this study. This is the first report describing the nationwide and long-term molecular epidemiology of MuV in Japan. The results provide information about Japanese domestic genotypes, which is essential for evaluating the mumps elimination progress in Japan after the forthcoming introduction of the mumps vaccine into Japan's regular immunization program. Furthermore, the study shows that WGS analysis using NGS is more accurate than results obtained from conventional SH sequence-based classification and is a powerful tool for accurate molecular epidemiology studies.

Discrimination of SARS-CoV-2 Omicron Sublineages BA.1 and BA.2 Using a High-Resolution Melting-Based Assay: a Pilot Study

Aoki A¹, Adachi H, Mori Y¹, Ito M, Sato K, Okuda K, Sakakibara T, Okamoto Y¹, Jinno H¹

¹Faculty of Pharmacy, Meijo University

Microbiology Spectrum 10(4):e0136722. doi:10.1128/spectrum.01367-22(2022)

The Omicron variant of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2(SARS-CoV-2) has spread worldwide. As of March 2022, Omicron variant BA.2 is rapidly replacing variant BA.1. As variant BA.2 may cause more severe disease than variant BA.1, variant BA.2 requires continuous monitoring. The current study aimed to develop a novel high-resolution melting (HRM) assay for variants BA.1 and BA.2 and to determine the sensitivity and specificity of our method using clinical samples. Here, we focused on the mutational spectra at three regions in the spike receptor-binding domain (RBD; R408, G446/L452, and S477/T478) for the variant-selective HRM analysis. Each variant was identified based on the mutational spectra

as follows: no mutations (Alpha variant); L452R and T478K (Delta variant); G446S and S477N/T478K (Omicron variant BA.1); and R408S and S477N/T478K (Omicron variant BA.2). Upon analysis of mutation-coding RNA fragments, the melting curves of the wild-type fragments were distinct from those of the mutant fragments. The sensitivity and specificity of this method were determined as 100% and more than 97.5%, respectively, based on 128 clinical samples (40 Alpha, 40 Delta, 40 Omicron variant BA.1/BA.1.1, and 8 Omicron variant BA.2). These results suggest that this HRM-based assay is a promising screening method for monitoring the transmission of Omicron variants BA.1 and BA.2.

Rapid Identification of SARS-CoV-2 Omicron BA.5 Spike Mutation F486V in Clinical Specimens Using a High-Resolution Melting-Based Assay

Aoki A¹, Adachi H, Mori Y¹, Ito M, Sato K, Kinoshita M, Kuriki M, Okuda K, Sakakibara T, Okamoto Y¹, Jinno H¹

¹Faculty of Pharmacy, Meijo University

Viruses 14(11):2401. doi:10.3390/v14112401(2022)

Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Omicron subvariant BA.5 emerged as of February 2022 and replaced the earlier Omicron subvariants BA.1 and BA.2. COVID-19 genomic surveillance should be continued as new variants seem to subsequently

appear, including post-BA.5 subvariants. A rapid assay is needed to differentiate between the currently dominant BA.5 variant and other variants. This study successfully developed a high resolution melting (HRM)-based assay for BA.4/5-characteristic spike mutation F486V

detection and demonstrated that our assay could discriminate between BA.1, BA.2, and BA.5 subvariants in clinical specimens. The mutational spectra at two regions (G446/L452 and F486) for the variant-selective HRM analysis was the focus of our assay. The mutational spectra used as the basis to identify each Omicron subvariant were as follows: BA.1 (G446S/L452/F486), BA.2 (G446/L452/F486), and BA.4/5 (G446/L452R/F486V). Upon mutation-coding RNA

fragment analysis, the wild-type fragments melting curves were distinct from those of the mutant fragments. Based on the analysis of 120 clinical samples (40 each of subvariants BA.1, BA.2, and BA.5), this method's sensitivity and specificity were determined to be more than 95% and 100%, respectively. These results clearly demonstrate that this HRM-based assay is a simple screening method for monitoring Omicron subvariant evolution.

新型コロナウイルス感染症の流行でその他の感染症の発生動向はどう変化したか？「エンテロウイルス感染症、アデノウイルス感染症の発生動向の変化」

伊藤 雅、皆川洋子、廣瀬絵美、佐藤克彦
臨床と微生物 49(2):127-136, 2022

新型コロナウイルス感染症流行開始後、エンテロウイルス・アデノウイルス感染症の患者報告数及びウイルス検出数は減少し

ており、その影響は新型インフルエンザ (fu1AH1pdm2009)より長期に渡っている。

2014～2021年に愛知県で検出されたRSウイルスの分子疫学解析

安達啓一、廣瀬絵美、中村範子、新美 瞳、皆川洋子、齋藤典子、伊藤 雅、安井善宏、佐藤克彦
病原微生物検出情報 43(4):82-83, 2022

2014年1月～2021年12月に名古屋市を除く県内の病原体定点医療機関を受診した患者検体から当所で検出したRSV 165件について報告する。

系統解析の結果、RSV-AのNA1が7件(4.2%)、ON1が70件(42.4%)、RSV-B BA9が88件(53.3%)であった。患者の発生動向と比較すると、流行の主流となるサブグループが1、2シーズンごとに遷移する一方、

多くのシーズンで両方のサブグループが検出された。

患者の臨床診断名は、下気道炎が82.9%、上気道炎が13.4%であったが、急性脳症3例、劇症型心筋炎1例からも検出された。これらの疾患では後遺症が残る症例や死に至るケースもあることから、RSV感染症の流行時には呼吸器外症状の可能性も含めて注意喚起していく必要があると考えられた。

愛知県で 2021 年にパキスタン渡航者から検出された B3 型麻疹ウイルス

齋藤典子、諏訪優希、水谷裕子、皆川洋子、安井善宏、伊藤 雅、佐藤克彦
病原微生物検出情報 43(9):204-205, 2022

国内麻疹患者は 2019 年に 744 件報告され、愛知県では 42 例が報告された。2020 年以降は新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) 流行による海外渡航制限の影響で患者報告数は激減し、2020 年は 10 件、2021 年は 6 件であった (愛知県では各 2 例)。今回は本格的な COVID-19 国内流行後、2022 年第 25 週までに海外輸入症例が疑われ、遺伝子型を決定した唯一の麻疹事例を報告する。

患者は愛知県在住の 10 歳未満の女性で、パキスタンから同年 12 月 2 日に帰国後、3 日に発症し、県内医療機関を受診した。8 日に麻疹臨床診断例として届出され、管内保健所を通じて当所に遺伝子検査依頼があった。

検体から RNA を抽出し、麻疹ウイルス (MeV) N 遺伝子の検出を行ったところ、すべての検体 (咽頭ぬぐい液、尿、全血) から検出された。その後、遺伝子型決定領域 (N-450) の塩基配列を決定し、系統解析を行ったところ、遺伝子型 B3 と同定された。

日本国内では麻疹の流行はみられなかったが、パキスタンを含む世界保健機関・東地中海地域における 2021 年の麻疹患者報告数は 1.6 万例以上であり、海外渡航制限が解除されれば本事例と同様に国内侵入例が増加する可能性がある。麻疹排除状態を維持するため、今後も地方衛生研究所によるウイルス検査に基づく実験室診断が求められる。

麻疹の抗体保有状況-2021 年度感染症流行予測調査 (暫定結果)

新井 智¹、林 愛¹、菊池風花¹、北本理恵¹、多屋馨子¹、神谷 元¹、鈴木 基¹、大槻紀之²、竹田 誠²、2021 年度麻疹感受性調査実施都道府県 (愛知県他)

¹ 国立感染症研究所 感染症疫学センター、² 国立感染症研究所ウイルス第三部
病原微生物検出情報 43(9):206-207, 2022

2021 年度の麻疹感受性調査は 19 都道府県で実施され、ゼラチン粒子凝集 (PA) 抗体価が各都道府県地方衛生研究所において測定された。2 歳以上の麻疹 PA 抗体保有率は、おおむね 95% 以上を維持していた。10 代を中心に PA 抗体価 1:128 以上の抗体価が 90% に満たない年齢層が複数確認されてい

る。COVID-19 流行にともない制限されていた海外との往来が緩和され、麻疹感染者の海外からの流入に起因する集団発生を抑え込むために、今後も高い予防接種率とすべての年齢層の 95% 以上の抗体保有率の維持が重要である。

BA.5 系統と BA.2 系統の組換え体と推察された新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) 株の検出について

安達啓一、鈴木雅和、宮本真由歌、青山文生、新美 瞳、廣瀬絵美、高橋新次、皆川洋子、諏訪優希、佐藤穂奈美、齋藤典子、伊藤 雅、佐藤克彦
病原微生物検出情報 43(10):240-241, 2022

愛知県衛生研究所では国立感染症研究所（感染研）の方法にのっとり、SARS-CoV-2 のゲノム解析を実施している。今回、BA. 5. 2. 1 系統と BA. 2. 9 系統の組換え体と考えられる 2 株を検出した。

当該株の検体採取日はそれぞれ 2022 年 7 月 31 日、8 月 2 日であり、両患者は家族であった。両患者とも 2 つ以上の系統が異なる株による同時感染を示唆する混合アレルは検出されなかった。Nextclade によるゲノムアライメントを確

認したところ、S タンパク質領域までは S:F486I 変異を有する BA. 5. 2. 1 系統の株と類似の配列をもつ一方で、ORF3a 領域以降については BA. 2. 9 系統に高い相同性を示した。

今回の組換え体では S タンパク質の配列は BF. 12 系統から変化はなく、組換えによる公衆衛生上のリスク増大を積極的に疑う根拠はないと考えるが、モニタリングを行ううえで、今後も組換え体出現の可能性を念頭に置いてゲノム解析を実施する必要があると考えられた。

2021/22 シーズンのインフルエンザ分離株の解析

岸田典子¹、中村一哉¹、藤崎誠一郎¹、高下恵美¹、佐藤 彩¹、秋元未来¹、三浦秀佳¹、森田博子¹、永田志保¹、白倉雅之¹、菅原裕美¹、渡邊真治¹、長谷川秀樹¹、インフルエンザ株サーベイランスグループ（安達啓一他）

¹国立感染症研究所インフルエンザ・呼吸器系ウイルス研究センター
病原微生物検出情報 43(11):247-252, 2022

2021/22 インフルエンザシーズンは、世界的にはインフルエンザの流行が戻ってきた。北半球では、SARS-CoV-2 の流行前ほどの規模ではなかったが検査陽性数の上昇が確認された。特徴的であったのは、早い時期に流行がピークに達し収束した国、収束したようにみえたが再び陽性数が上昇し二峰性のピークがみられた国、および流行が遅くに始まり 5 月くらいになり収束した国と、流行の様相が国によって違ったことである。南半球では、SARS-CoV-2 の流行前の規模と同等の流行規模であり、特にオース

トラリアでは、最大陽性数は SARS-CoV-2 の流行前の過去 3 年間と比較して最も多かった。ウイルスの型としては、A 型・B 型ともに検出され、A 型の検出数が B 型のそれよりも多かった。A 型は A (H3N2) の流行が A (H1N1) pdm09 より大きく、B 型はほぼすべてが Victoria 系統であった。日本での流行は、SARS-CoV-2 の流行への対策の影響と思われるが、昨シーズンと同様にインフルエンザの流行は大変小さいものであった。ただし、2022 年 7 月中旬頃から患者報告数が増える傾向が確認された。

2021 年度感染症流行予測調査におけるインフルエンザ予防接種状況および抗体保有状況

林 愛¹、菊池風花¹、新井 智¹、北本理恵¹、神谷 元¹、鈴木 基¹、渡邊真治²、長谷川秀樹²、2021 年度インフルエンザ感受性調査実施都道府県（愛知県他）

¹国立感染症研究所 感染症疫学センター、²国立感染症研究所インフルエンザウイルス研究センター
病原微生物検出情報 43(11):252-255, 2022

2021年度のインフルエンザ感受性調査は、15都道府県で実施された。対象は2021年7～9月の期間に採取された血清を用いて、各都道府県衛生研究所において赤血球凝集抑制試験(HI法)により2021/22シーズンのインフルエンザワクチン株HA抗原を用いてA(H1N1)pdm09亜型、A(H3N2)亜型、B型(Victoria系統)、B型(山形系統)について測定が行われた。0～4歳群における抗体保有割合はすべての亜型でB型(山形系

統)を除き10～20%前後、また、65歳以上の年齢群でA(H3N2)亜型を除き20%前後と低い傾向であった。2020/21シーズンのインフルエンザウイルスの流行状況は非常に抑制されており、例年インフルエンザの流行にともなう抗体保有者も抗体保有割合にある程度影響をしていると考えられるが、2021/22シーズン前の調査ではこの影響が非常に小さかったと推測される。

Analysis of the complete genome sequences of *Clostridium perfringens* strains harbouring the binary enterotoxin BEC gene and comparative genomics of pCP13-like family plasmids

Ueda K¹, Kawahara K¹, Kimoto N¹, Yamaguchi Y¹, Yamada K, Oki H², Yoshida T¹, Matsuda S³, Matsumoto Y², Motooka D², Kawatsu K⁴, Iida T^{3, 6}, Nakamura S^{2, 5}, Ohkubo T⁶, Yonogi S^{7, 8}

¹Laboratory of Biophysical Chemistry, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, ²Department of Infection Metagenomics, Genome Information Research Center, Research Institute for Microbial Diseases (RIMD), Osaka University, ³Department of Bacterial Infection, Research Institute for Microbial Disease (RIMD), Osaka University, ⁴Division of Microbiology, Osaka Institute of Public Health, ⁵Center for Infectious Disease Education and Research (CiDER), Osaka University, ⁶Laboratory of Biophysical Chemistry, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, ⁷Department of Bacterial Infection, Research Institute for Microbial Disease (RIMD), Osaka University, ⁸Division of Microbiology, Osaka Institute of Public Health

BMC Genomics 23(1):226. doi:10.1186/s12864-022-08453-4(2022)

BEC-producing *Clostridium perfringens* is a causative agent of foodborne gastroenteritis. It was first reported in 2014, and since then, several isolates have been identified in Japan and the United Kingdom. The novel binary ADP-ribosylating toxin BEC, which consists of two components (BECa and BECb), is encoded on a plasmid that is similar to pCP13. Despite the high in vitro conjugation frequency of pCP13, its dissemination and that of related plasmids, including bec-harboring plasmids, in the natural environment have not been

characterised. This lack of knowledge has limited our understanding of the genomic epidemiology of bec-harboring *C. perfringens* strains. In this study, we determined the complete genome sequences of five bec-harboring *C. perfringens* strains isolated from 2009 to 2019. Each isolate contains a ~ 3.36 Mbp chromosome and 1–3 plasmids of either the pCW3-like family, pCP13-like family, or an unknown family, and the bec-encoding region in all five isolates was located on a ~ 54 kbp pCP13-like plasmid. Phylogenetic and SNP analyses of these

complete genome sequences and the 211 assembled *C. perfringens* genomes in GenBank showed that although these be harbouring strains were split into two phylogenetic clades, the sequences of the bec-encoding plasmids were nearly identical (>99.81%), with a significantly smaller

SNP accumulation rate than that of their chromosomes. This study demonstrates the potential significance of pCP13-like plasmids, including bec-encoding plasmids, for the characterisation and monitoring of the dissemination of pathogenic *C. perfringens* strains.

Quantitative detection and genetic characterization of thermotolerant *Campylobacter* spp. in fresh chicken meats at retail in Japan

Asakura H¹, Yamamoto S¹, Yamada K, Kawase J², Nakamura H³, Abe K⁴, Sasaki Y¹, Ikeda T⁵, Nomoto R⁶

¹Division of Biomedical Food Research, National Institute of Health Sciences, ²Department of Bacteriology, Shimane Prefectural Institute of Public Health and Environmental Science, ³Department of Microbiology, Osaka Institute of Public Health, ⁴Kawasaki City Institute of Public Health, ⁵Department of Infectious Diseases, Hokkaido Institute of Public Health, ⁶Department of Infectious Diseases, Kobe Institute of Health

Frontiers in Microbiology 13:1014212. doi:10.3389/fmicb.2022.1014212(2022)

Campylobacter jejuni and *C. coli* are one of the leading causes of gastrointestinal illnesses, and which are considered to be transmitted to humans mainly from chicken meats. Considering the less availability of quantitative contamination data in the retail chicken meats in Japan, 510 fresh chicken meats retailed at five distinct regions in Japan between June 2019 and March 2021 were examined. The quantitative testing resulted that 45.7% of the samples (254/510) were positive at mean \pm standard deviation of 1.15 ± 1.03 logCFU/g, whereas 43 samples (8.4%) exceeded 3.0 logCFU/g. Seasonal comparison revealed increased bacterial counts in fall compared with spring and summer. As for the chicken slaughter age, those slaughtered at >75 days old were less contaminated than those at <75 days old. Genome sequencing analyses of 111 representative *C. jejuni* isolates resulted in the detection of three

antimicrobial resistance genes (*gyrA* substitution T86I, *tetO* and *blaOXA-61*) at 25.2, 27.9 and 42.3%, respectively. In silico MLST analysis revealed the predominance of sequence types (ST)-21 clonal complex (CC), followed by ST-45CC and ST-464CC. The single nucleotide polymorphism (SNP)-based phylogenetic tree largely classified the sequenced *C. jejuni* isolates into two clusters (I and II), where all *C. jejuni* from highly contaminated samples (STs-21CC, -22CC and -45CC) belonged to cluster I, independent of both season and slaughter age. To our knowledge, this is the first example to study the current status of *Campylobacter* contamination levels in fresh chicken meats retailed in Japan. Our data would be contributable to future quantitative microbial risk assessment, to establish effective control measures for campylobacteriosis.

Hierarchical clustering of liquid chromatography–tandem mass spectrometry data for screening of phosphodiesterase type 5 inhibitors and their analogues in adulterated dietary supplements

Tachi M, Kobayashi S, Tomita K, Tanahashi T, Imanishi SY¹

¹Faculty of Pharmacy, Meijo University

Journal of Chromatography A 1678:463366. doi:10.1016/j.chroma.2022.463366(2022)

Sexual enhancement dietary supplements have often been adulterated with phosphodiesterase type 5 (PDE-5) inhibitors used for treatment of erectile dysfunction, and widely distributed through online markets. As the illegal adulterants, the original PDE-5 inhibitor drugs and a numerous number of synthesized analogues, more than 80, have already been found. Therefore, analytical methods that detect various PDE-5 inhibitors and uncover newly synthesized analogues are needed. In this study, we have developed a rapid and reliable screening method for PDE-5 inhibitors and their structural analogues by using liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) followed by hierarchical clustering based on similarity of MS/MS spectra. Forty reference standards of PDE-5 inhibitors/analogues were measured using a quadrupole-orbitrap mass spectrometer in data-dependent mode. The 60 most intense fragment ions were

extracted from each MS/MS spectra, and the ions observed within 1.5 mDa mass tolerance were considered to be the same ion. Based on fragment ion tables representing detected ions for each compound, hierarchical clustering was performed. The resulting dendrogram showed that the reference standards were separated into seven clusters according to their characteristic structures. Subsequently, two additional standards spiked into a herbal sample were analyzed. While herbal components were clearly separated from the clusters of the reference standards, the spiked standards were clustered closely with the structurally similar standards. Furthermore, application of our method to dietary supplements allowed for detection of sildenafil and tadalafil as adulterants. These results suggest that our screening method facilitates discovery of adulterant PDE-5 inhibitors/analogues by illustrating their structural similarity.

愛知県衛生研究所報

第 73 号

令和 5(2023)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

電話：052-910-5618（代表）

FAX：052-913-3641

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

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

電話（ダイヤルイン）

総務課	052-910-5618
企画情報部	
健康科学情報室	052-910-5619
生物学部	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	052-910-5638
医薬食品研究室	052-910-5639
生活科学研究室	052-910-5643

Published by

AICHI PREFECTURAL INSTITUTE OF PUBLIC HEALTH
7-6 Nagare, Tsuji-cho, Kita-ku, Nagoya, 462-8576 Japan
(この刊行物は再生紙を使用しています)