Ⅰ　調　査　研　究　報　告

短　報

中毒原因となる有毒植物の多成分一斉分析法の開発

笠原 翔悟，笠原 義正

Development of Simultaneous Analysis Method for Natural Toxins in Poisonous Plants

By Shogo KASAHARA and Yoshimasa KASAHARA

自然毒による食中毒が起きた際の原因究明方法として，同一の方法で複数の毒成分を同時に分析できるLC-MS/MSによる一斉分析法について検討した．5種類の植物の14成分について検討を行ったところ，マルチモードカラムを用いることで極性の異なる成分を同時に測定可能な分析条件が得られた．また，試料の抽出，精製などの前処理方法についても検討を行った．さらに，この方法を用いた有毒植物の分析により新たな知見が得られた．

Key Word：自然毒 Natural Poisons，一斉分析法 Simultaneous Analysis Method，高速液体クロマトグラフタンデム質量分析計 LC-MS/MS

Ⅰ　はじめに

山形県は山に囲まれ自然が豊かであることから，山菜やキノコを採る人が多く，それゆえ誤食による食中毒が後を絶たない．厚生労働省が公表している2000年から2014年までの食中毒統計によると，山形県は植物性自然毒による食中毒発生件数が全国で2番目に多い県である(Fig. 1)．また人口10万人あたりの発生率は全国で最も高い．これらの自然毒による食中毒を未然に防ぐには，自然毒に関する多くの知見を得ること，中毒発生時に迅速に原因を究明すること，自然毒に関する情報を広く発信していくことが不可欠である．

自然毒による食中毒が起きた際の原因食品の特定では，はじめに未調理品や残品の形態調査を行う．しかし，たいていは調理済みであり元の状態が判別できない場合が多い．また形態的特長および中毒症状で原因を特定するためには，植物の分類や中毒症状に関する専門的な知識が要求される．以上の方法で原因が特定されない場合，分析機器を用いた成分分析法が用いられる．この方法は前述のような形態学的，医学的知識が必要でなく，毒の標準品があれば分析機器を用いて特定できる．しかしながら，現状では中毒原因となりうる各植物に対して，試料前処理方法や機器の分析条件が異なっている．これら

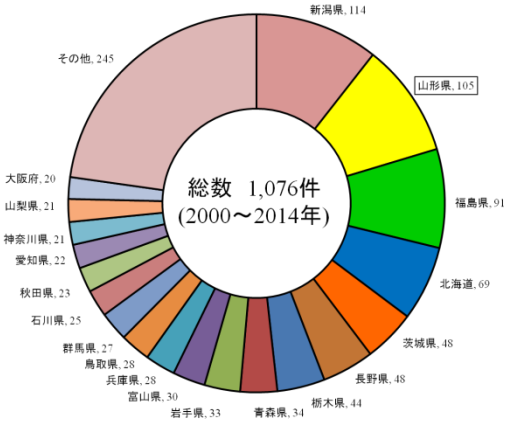


Fig.1 植物性自然毒による食中毒発生件数

を同一の方法で行うことができれば，時間，操作ともに簡略化され，より迅速に中毒の原因究明を行うことができる．そこで本研究では，同一の方法で多様な植物の有毒成分が分析可能になる一斉分析法について検討した．本研究で対象としたのは，山形県において中毒の報告が多いトリカブト，スイセン，チョウセンアサガオ，バイケイソウおよび，全国的に中毒の多いジャガイモの 5 種類 14 成分とした（Table 1）．また，この方法の検討により，一斉分析法に関する知見だけでなく，植物の毒成分に関する新たな知見が得られたのであわせて報告する．

Table 1 対象植物および成分

植物	毒成分	
トリカブト	アコニチン	メサコニチン
	ヒパコニチン	ジェサコニチン
バイケイソウ	ベラトリン	ベラトラミン
	ジェルビン	プロトベラトリンA
チョウセンアサガオ	アトロピン	スコポラミン
スイセン	リコリン	ガランタミン
ジャガイモ	α-ソラニン	α-チャコニン

Ⅱ　実験

試料

分析法検討用試料として，衛生研究所敷地内で採取したスイセン，衛生研究所で栽培したチョウセンアサガオ，山形市蔵王で採取したコバイケイソウおよび県内で流通しているジャガイモを用いた．

試薬

標準品：アコニチン，ヒパコニチン，メサコニチン，ジェサコニチンは三和生薬（株），アトロピン，スコポラミン，ジェルビン，ソラニン，ガランタミンは和光純薬工業（株），ベラトラミン，プロトベラトリン A，チャコニン，リコリンはフナコシ(株)，ベラトリンは Sigma – Aldrich 社から購入した．その他の試薬：ギ酸，ギ酸アンモニウムは和光純薬工業（株）製，メタノール，アセトニトリルはそれぞれ関東化学（株）製, Sigma – Aldrich 社製の高速液体クロマトグラフィー用を用いた．

固相カートリッジ:Waters 社製 OasisHLB 6 cc (500 mg)を用い，使用前にメタノールおよび水でコンディショニングした．

装置

高速液体クロマトグラフは Agilent 社製 1100 シリーズ，質量分析装置は AB Sciex 社製 API2000 を用いた．装置の詳細および測定条件を Table 2 に示す．

Table 2 測定装置及び測定条件

LC装置	Agilent社製 1100シリーズ
カラム	Imtakt社製 Scherzo SM-C18 (2.0 mm i.d. × 150 mm, 3 μm)
移動相	A液:10 mMギ酸アンモニウム水溶液 B液:メタノール系
流量	0.2 mL/min
注入量	5 μL
カラム温度	40 ℃
MS/MS装置	AB Sciex社製API2000
イオン化	ESI

試料溶液の調製

試料の抽出および精製は Fig. 2～4 に示す 3 方法で行った．すなわち，方法 I：メタノールで抽出した後に固相カートリッジによる精製を行う方法(Fig. 2)，方法 II：酸性条件下で塩酸抽出した後に固相カートリッジによる精製を行う方法(Fig. 3)，方法 III：メタノールで抽出し希釈する方法(Fig. 4)である．

Fig. 2　試料調製方法

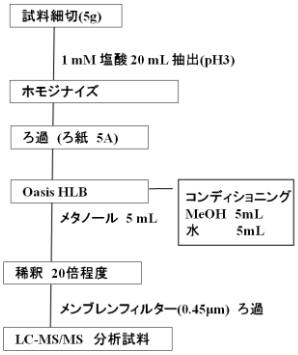


Fig. 3　試料調製方法

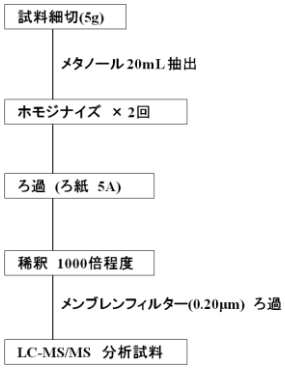


Fig. 4　試料調製方法

III 結果及び考察

一斉分析条件の検討

LC-MS/MS 条件

初めに, Table 1 に示した毒成分の標準品を用いて, これらを測定するために最適な LC-MS/MS の条件の検討を行った. イオン化法は ESI を用い, MRM (Multiple Reaction Monitoring) モードで行った. 全ての対象成分においてポジティブモードでプロトンが付加した分子がみられたため, これをプレカーサーイオンとし, プロダクトイオンのうち, もっとも感度が高いものを定量用, 次を確認用とした. この結果を Table 3 に示す.

Table 3　14 成分モニタリングイオン

	Precursor ions (m/z)	Product ions [a] (m/z)	Product ions [b] (m/z)
Solanine	869.2	98.3	398.9
Chaconine	853.3	98.2	707.3
Hypaconitine	616.2	76.9	555.9
Mesaconitine	632.4	104.9	571.7
Aconitine	646.2	105.1	586.1
Jesaconitine	676.3	135.0	615.9
Lycorine	288.2	147.1	119.2
Galanthamine	288.3	213.2	198.2
Atrppine	290.3	124.2	103.1
Scopolamine	304.3	138.1	156.2
Jervine	426.4	66.9	91.0
Veratramine	410.4	295.3	84.3
Veratrine	592.3	456.1	438.4
ProtoVeratrineA	816.4	698.5	658.9

[a] Used for quantitation
[b] Used for confirmation

LC 条件

対象となる毒成分の分子量は 100 程度から 900 と幅広く, 極性も様々であるため, 一斉分析には極性が異なる物質を幅広く保持できるカラムが必要である.そこで本研究では, 逆相系の ODS とイオン交換の性質を併せ持つマルチモードカラムを用いて検討を行った. 初めに, 移動相として A 液を 10 mM ギ酸アンモニウム, B 液をメタノールとしていたが, 一部でピークの重なりがみられた. そこで B 液をメタノール : アセトニトリル（98 : 2）としたところ, Fig. 5 に示したように, 全成分について良好な分離となり一斉分析可能な LC-MS/MS の条件が得られた.

試料分析法の検討

次に, 対象とする植物ごとに実際の植物を用いて毒成分の抽出方法について検討した.

ジャガイモ：日光に晒し緑化させたジャガイモを用い, 試料調製方法 I, II により抽出を行ったところ, α-ソラニン, チャコニンの含有量はそれぞれ 0.86 μg / g, 0.082 μg / g であり, ともに抽出が可能であった. またこの 2 成分はグリコアルカロイドと呼ばれるアルカロイドであることから, 既に報告されている [1] トリカブト毒の抽出法である塩酸による抽出も試みた. その結果, α-ソラニン 0.98 μg / g, チャコニン 0.096 μg / g であり,いずれの抽出溶媒でも抽出可能であった.

スイセン：鱗茎部を用いて検討を行ったところ, Table 4 に示すとおり, ガランタミンのみが検出され, リコリンは検出されなかった. この原因については後述する. また検出されたガランタミンについては, 鱗茎が大きくなるとともに含有量の減少傾向が見られた.

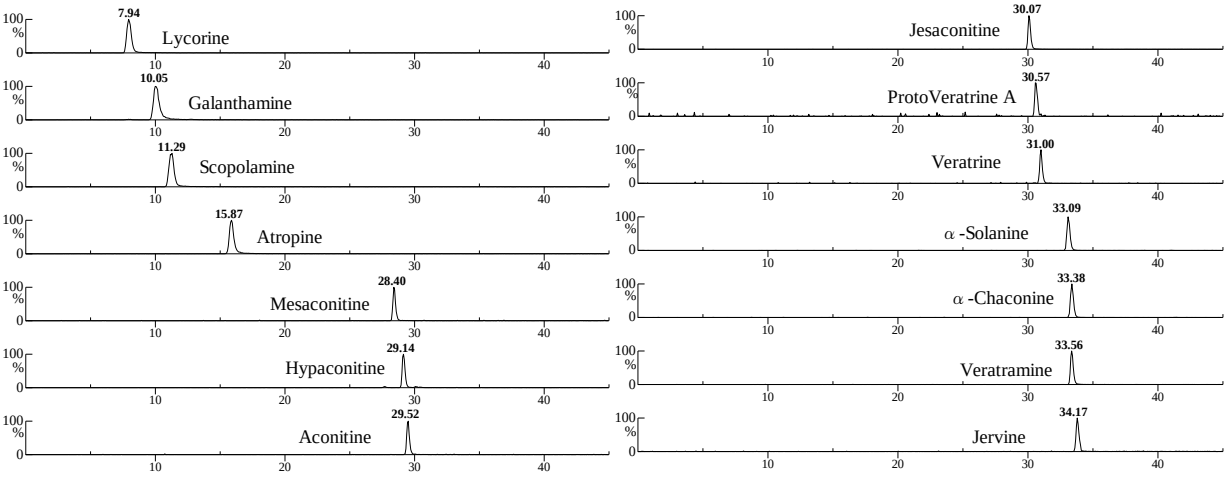


Fig.5　14 成分一斉クロマトグラム

Table 4　スイセン鱗茎中のリコリン，ガランタミン含有量

重量(g)	鱗茎の アルカロイド含有量(μg/g)		鱗茎1個当たりのガランタミン含量(μg)
	リコリン	ガランタミン	
1.22	N.D.	135	165
2.41	N.D.	114	274
3.23	N.D.	120	386
4.37	N.D.	99	433
5.73	N.D.	98	560

チョウセンアサガオ：葉を用いて抽出を行ったところTable 5に示す結果となり，スコポラミンのみが検出され，アトロピンは検出されなかった．またスコポラミン含有量は葉の大きさが大きくなるほど減少していた．

Table5 チョウセンアサガオの葉中のアトロピン，スコポラミン含有量

重量(g)	アルカロイド類含有量(mg/g)		葉1枚当たりのスコポラミン含量(μg)
	アトロピン	スコポラミン	
0.093	N.D.	1.097	102
0.552	N.D.	0.243	134
1.197	N.D.	0.049	58.5

コバイケイソウ：メタノール抽出，塩酸抽出のいずれの方法においても，バイケイソウ類の4種の毒成分のうちベラトラミン，ジェルビンのみが検出された．また,試料調製方法IIおよびIIIで前処理時間を比較したところ，方法IIIでは固相抽出カートリッジによる精製を行わないため，方法IIに比べ1時間以上短い時間で調製が可能であった．食中毒検査のような迅速性が求められる検査の場合では方法IIIがより適していると考えられる．しかし，精製が不十分であるため，試料には夾雑成分も多く含まれてしまう．通常, LC-MS/MSによる測定では夾雑を多く含んだ状態で測定を行うと，マトリックス効果によりイオンサプレッションやイオンエンハンスメントが引き起こされる場合がある．本検討においてはマトリックスによる影響は確認されず，精製を簡略化した方法でも測定が可能であることがわかった．

スイセン，チョウセンアサガオ，コバイケイソウで検出されない成分があった原因について，以下のことが考えられる. Fig 2に示したとおり，標準品を用いた分析ではすべて検出されていることから今回設定した分析条件に不備があるとは考えられない．またいずれの成分もアルカロイドの一種であり，メタノールもしくは塩酸による抽出が可能であると考えられる．ジャガイモでは2成分ともに抽出されており，他の植物でも1成分以上は抽出されていることから抽出溶媒によって特定の成分が抽出されないことは考えにくく，抽出操作が原因である可能性も低い.一方で,トリカブトでは種や地域によって4種のアコニチン類の含有率が異なっており，毒成分が全く含まれていないトリカブトがあることを我々は報告している[1)]．これらのことから今回，一部の成分が検出されなかった原因は，分析を行った試料にそれらの成分が含まれていなかった可能性が高い．しかしながら，前処理過程における消失や構造変化など不確定な部分が多いため今後さらなる検討が必要である．

まとめ

食中毒の原因物質となる有毒植物の毒成分について, LC-MS/MSを用いた一斉分析法を検討した．

ODSとイオン交換の性質を併せ持つマルチモードカラムを用いることにより，極性の異なる14成分の毒成分を分離可能な条件を確立した．

対象とする植物を用いて前処理条件の検討を行ったところ, 14成分のうち4成分が検出されなかったが，これは前処理方法によるものではなく，用いた試料にもとから含まれていなかった可能性が示唆された．

IV　文献

1)笠原義正，伊藤健：トリカブトおよび食中毒原因食品中のアコニチン系アルカロイドの一斉分析，食品衛生学雑誌, 42, 76-81(2008)

資　料

山形県におけるＣ型インフルエンザウイルスの分離状況(2014)

田中 静佳, 的場 洋平, 青木 洋子, 矢作 一枝, 水田 克巳

Detection and Antigenic Analysis of Influenza C virus from Patients in Yamagata Prefecture(2014)

by Shizuka TANAKA, Yohei MATOBA, Yoko AOKI, Kazue YAHAGI and Katsumi MIZUTA

2014年1月から12月の1年間に山形県内の医療機関で採取された咽頭拭い液および鼻汁1957検体について山形県感染症動向調査に基づきウイルス分離を行ったところ,22検体からＣ型インフルエンザウイルスが分離された.分離は4月から8月の期間に集中し, A型,B型インフルエンザのシーズンが終息した春に流行するというこれまでの傾向が続いていることが確認された.またＣ型インフルエンザウイルス分離株の抗原性解析により, 2014年はSao Paulo/82系統からKanagawa/76系統へと流行株が変わっていることが明らかとなった.

Key Words : Ｃ型インフルエンザウイルス (influenza C virus), 抗原解析

Ⅰ　はじめに

Ｃ型インフルエンザウイルス（FluC）は小児における上気道炎の起因ウイルスの１つである．一般的に症状は軽度であるとされているが,気管支炎や肺炎などの下気道炎を引き起こすことも知られている[1)].

当所では山形県感染症発生動向調査事業に基づき,急性ウイルス性呼吸器疾患の発生状況を把握することを目的にウイルスの分離,同定を実施している.

今回,2014年の調査におけるFluCの分離状況,ならびに分離株の抗原性について検討を行った.

Ⅱ　材料及び方法

1. 調査対象

2014年1月から12月までに県内医療機関を受診した患者から採取された鼻咽頭ぬぐい液および鼻汁1957検体を対象とした.

2. ウイルスの分離・同定

ウイルス分離はHEF,HEp-2,VeroE6,MDCK,RD18S,GMKの6種類の細胞を用いた96wellマイクロプレート法により実施した[2)].FluCの分離はMDCK細胞での細胞変性効果の確認と,0.8 %モルモット血球および0.5 %ニワトリ血球を用いた血球凝集試験で判定し（図１）,Conventional RT-PCR法で同定を行った.

３．FluCのConventional RT-PCR法

ウイルス培養上清からHigh Pure Viral RNA kit（Roche）を使用してRNAを抽出後, PrimeScript RT Master Mix（タカラバイオ）を使用して逆転写反応を行った．PCRはNS遺伝子をターゲットとするMatsuzakiらのプライマー[3)]を用いて実施した.

4.抗原解析

抗原解析はFluCの表面蛋白であるヘマグルチニンエステラーゼ(HE)に対するモノクローナル抗体をプローブとし,0.5%ニワトリ血球を用いた血球凝集抑制(HI)試験により実施した[4) 5)].

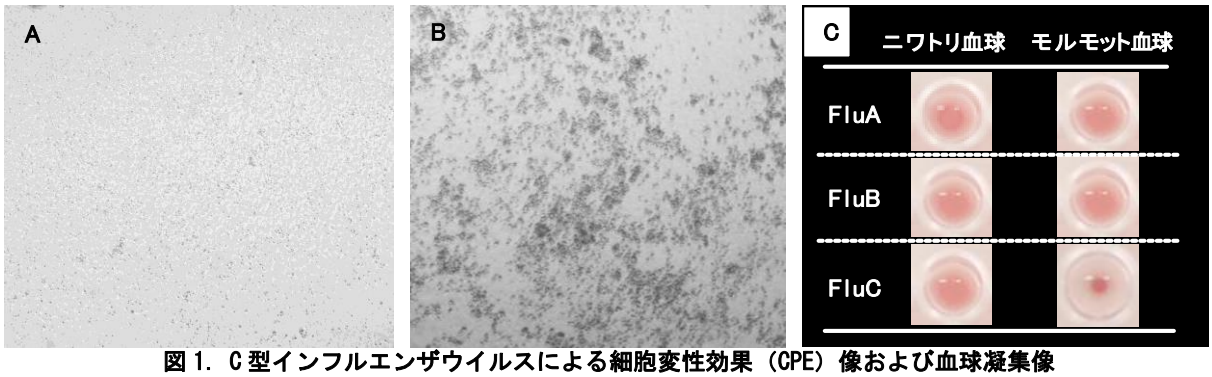


図 1. C 型インフルエンザウイルスによる細胞変性効果（CPE）像および血球凝集像

A.MDCK 細胞（検体未接種,×100）B. FluC による CPE が現れた MDCK 細胞（×100）C.インフルエンザウイルスによる血球凝集像

Ⅲ　結果

1．FluC の分離状況

2014 年 1 月から 12 月までに 22 検体から FluC が分離された.月別の分離状況を図 2 に示す. 分離は 4 月から始まり 5 月をピークとして 8 月まで毎月続き,この期間に 21 株が分離された.以降は 9 月から 11 月まで分離はなく,12 月に散発的に 1 件分離されたのみであった.分離数が最も多かった 5 月における分離率は 7.6 %（11 株/145 検体）であった.

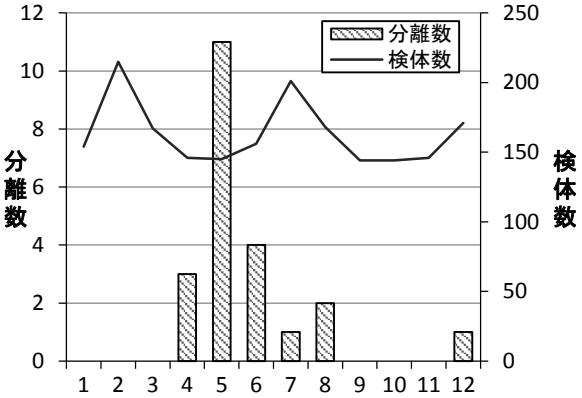


図 2.C 型インフルエンザウイルス月別分離状況

2．抗原解析

分離された 22 株について抗 HE モノクローナル抗体を用いて抗原解析を行った.分離代表株の HI 試験結果の一例を表 1 に示す.抗原性既知の参照株と分離株の抗原共通性を各抗 HE モノクローナル抗体に対する反応パターンで比較すると,2014 年分離株は J14 のみに強く反応し,U4,U9,U1 に対してはほとんど反応しない点で Kanagawa/76 系統と共通する 14 株と,J14,U4,U9,U1 のいずれにも反応を示す点で Sao Paulo/82 系統と共通する 8 株に大別された[6)](図３).

表 1. 抗モノクローナル抗体を用いた HI 試験結果

分離株	HE系統	HI価 J14	U4	U9	U1
参照株					
C/Kanagawa/1/76	Kanagawa/76	512000	40	160	<20
C/Yamagata/2/2010	Sao Paulo/82	64000	1600	64000	128000
C/Yamagata/29/2012	Sao Paulo/82	64000	3200	64000	128000
2014年分離株					
C/Yamagata/13/2014	Kanagawa/76	1024000	40	640	<20
C/Yamagata/14/2014	Kanagawa/76	512000	20	320	<20
C/Yamagata/16/2014	Kanagawa/76	1024000	40	320	<20
C/Yamagata/35/2014	Kanagawa/76	512000	40	160	<20
C/Yamagata/6/2014	Sao Paulo/82	16000	1600	16000	16000
C/Yamagata/33/2014	Sao Paulo/82	25600	1600	32000	32000

Ⅳ　考察

2014 年の調査において 22 株の FluC が分離された.うち 21 株は 4 月から 8 月に集中して分離されており,この時期に FluC の地域的な流行があったと推測された.我々のこれまでの調査により,山形県における FluC の流行は 1 年おき偶数年の,A 型,B 型インフルエンザのシーズンが終息した春に発生する傾向があることがわかっている[7)]. 2013/2014 シーズンのインフルエンザの流行の終盤頃から始まった今回の流行は,2012 年以来 2 年ぶりの発生であり, この傾向から予測された通りであった（図３）.

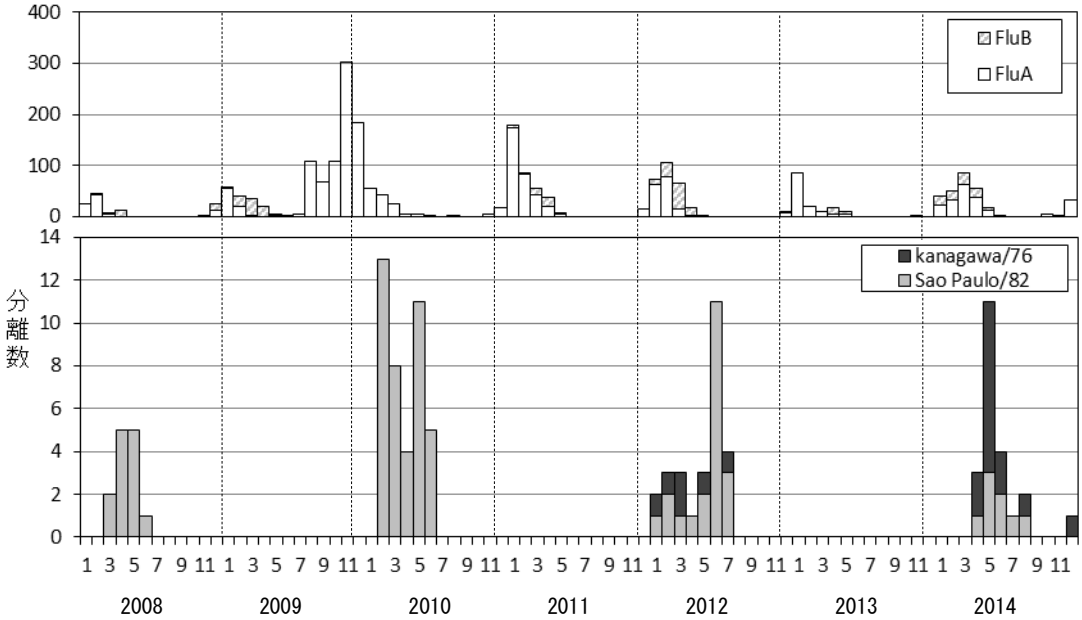


図 3. インフルエンザウイルスの月別分離数(2008－2014)

上段：A、B 型インフルエンザウイルス（FluA,B）の分離数,下段：FluC の月別系統別分離数（Tanaka et ら[6]を引用・改変）

FluC は HE の抗原性の違いにより 6 つの系統（Taylor/47,Kanagawa/76,Mississippi/80,Yamagata/81,Aichi/81,Sao Paulo/82）に分類され,山形県においてはこれまでに Taylor/47 系統を除く 5 つの系統の FluC が分離されている.Sao Paulo/82 系統は 2006 年から 2012 年まで流行の主流株となっていた[7].しかし,2014 年は Kanagawa/76 系統の分離が優勢となり,流行株の系統が交代していることが明らかとなった.山形県における流行株の交代は 2002 年に Yamagata/81 系統から Kanagawa/76 系統へ,2006 年に Kanagawa/76 系統から Sao Paulo/82 へと,過去 2 回確認されている[7].特に 2002 年とそれに続く 2004 年には Kanagawa/76 系統による大きな流行が確認されている[3]ことから,今後も調査を継続し発生動向を注視する必要がある.

V 文献

1) Matsuzaki Y et al. Clinical features of influenza C virus infection in children. J Infect Dis. 2006;193: 1229-35.

2) Mizuta K. et al. Analysis of monthly isolation of respiratory viruses from children by cell culture using a microplate method:a two-year study from 2004 to 2005 in Yamagata,Japan. Jpn.J.Infect.Dis. 2008;61:196-201.

3) Matsuzaki Y et al. A nationalwide epidemics of influenza C virus infection in Japan 2004. J Clin Microbiol. 2007;45:783-8

4) Matsuzaki Y et al. Antigenic and genetic characterization of influenza C viruses which caused two outbreaks in Yamagata City, Japan in 1996 and 1998. J Clin Microbiol. 2002;40:422-429

5) Sugawara K et al. Construction of an antigenic map of the haemagglutinin-esterase protein of influenza C virus.J Gen Virol. 1993;74:1661-6

6) Tanaka S et al. The dominant antigenic Group of influenza C infections changed from C/Sao Pauo/378/82-lineage to C/Kanagawa/1/76-lineage in Yamagata, Japan in 2014. Jpn J Infect Dis 2015;68:166-168

7) Matsuzaki Y et al. Epidemiological information regarding the periodic epidemics of influenza C virus in Japan (1996-2013) and the seroprevalence of antibodies to different antigenic groups. J Clin Virol. 2014;61:87-93

資　料

ヒスタミン測定キットを利用した水産調理加工品中のヒスタミン分析法検討

太田 康介

Studies on Determination of Histamine in Marine Products Using Histamine Measuring Kit

By Kosuke OTA

水産調理加工品に含まれるヒスタミンの分析法として，蛍光誘導体化後に高速液体クロマトグラフで分析する方法をはじめとし，様々な方法が報告されている．そのうち，生魚等を試料とした場合において迅速にヒスタミンの定量が可能なヒスタミン測定キットが市販されている．このキットを用いて水産調理加工品に含まれるヒスタミンの分析を行うため，精製工程を追加して添加回収試験を行ったところ，生魚だけでなく水産調理加工品でもヒスタミンの回収率は90%以上と良好であった．

Key Word：ヒスタミン，ヒスタミン測定キット，添加回収試験，精製

Ⅰ　はじめに

ヒスタミンによる食中毒は摂食直後から数時間以内に発疹，頭痛，吐き気などの症状を呈する食中毒であり，原因食品のほとんどは魚類やその加工品，調理品である．また，原因食品を調理方法で比較すると焼きものが全体の約60%を占め，生ものは7%にすぎなかった[1)]という報告がある．

当所では，食品衛生検査指針理化学編(2005)に高速液体クロマトグラフ法(B)(参考法)法[2)]として掲載されているダンシルクロライドでの蛍光誘導体化後に高速液体クロマトグラフで分析する方法(以下，DC誘導体化-HPLC法)を採用し,ヒスタミンによる食中毒が疑われる検体の検査を行っている[3)]．しかし，当該分析法の前処理は煩雑であり,数時間を要する．

この他にヒスタミンの分析方法として，食品衛生検査指針理化学編(2015)掲載の高速液体クロマトグラフ法(定性・定量)(B)(参考法)[4-6)]，液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析計[7-9)]やヒスタミン測定キットなどを用いる方法がある．

このうち，ヒスタミン測定キットによるヒスタミンの定量は迅速かつ簡便な手法であり，他の分析法のように高額な機器を必要としないというメリットがある．一方で，調理加工品や発酵食品などを試料とした場合には色素や酸化還元物質などの影響を受けるため使用できない．そこで，ヒスタミン測定キットでの通常処理に精製工程を追加し，ヒスタミンの定量を試みた．

Ⅱ　材料および方法

1 試料

市販のサバ（生，干物，照り焼き），ナンプラーを用いた．サバはあらかじめ細切，均一化したものを試料とした．また，生サバ５ｇに対してベニバナのメタノール抽出物（以下，ベニバナエキス）を１ｇの比率で添加し，均一化したものも試料とした．

2 試薬

ヒスタミン二塩酸塩（特級），オクタンスルホン酸

ナトリウム（鹿 1 級），メタノール(HPLC 用)は関東化学製，りん酸水素二ナトリウム･12 水和物(特級)，りん酸二水素ナトリウム・2 水和物(特級)，25 %アンモニア水（有害金属測定用），1M 塩酸（容量分析用）は和光純薬製，EDTA・2Na・$2H_2O$(純度 99.5 %)は同仁化学研究所製を用いた．水はヤマト科学製 Autostill WA770 および東洋製作所製 RUF424BB で精製した超純水を用いた．ODS ミニカラムには MEGA BE-C18(1000 mg，6 mL)，強陽イオン交換ミニカラムには Bond Elut SCX(500 mg，3 mL)を用いた（以上，Agilent Technologies 社製）．ヒスタミン測定キットはキッコーマンバイオケミファ製のチェックカラーヒスタミン（以下，キット）を用いた．なお，キット付属のマニュアルは版数 201141 を参照した．ヒスタミン二塩酸塩を 0.1M 塩酸に溶解することで 1000 ppm としたものを標準原液とし，これを 0.1M 塩酸で希釈し，100 ppm としたものを添加用標準液として用いた．

3 装置

紫外可視分光光度計は島津製作所製 UV-2500PC を用い，10 mm 角の石英セルを使い，波長 470 nm での吸光度測定，および波長 800 - 400 nm の吸収スペクトル測定を行った．冷却遠心分離機は久保田製作所製 5922 を用いた．

4 試験溶液の調製

4．1 前処理

キット付属のマニュアルに従って抽出を行った．試料 1g を 50 mL ポリプロピレン製遠沈管にはかりとり，0.1M EDTA 水溶液 24 mL を加え，沸騰水中で約 20 分間加熱した．氷冷の後，スパチュラで細かくほぐしてから冷却遠心機にて 5 分間（10 krpm，5℃）遠心分離し，上澄み液をろ紙(No.5C)にてろ過し，そのろ液を抽出液とした．

4．2 精製

ODS ミニカラムを用いた精製は DC 誘導体化-HPLC 法での精製方法に準じて行った．すなわち，メタノール 10 mL，水 5 mL，0.05M オクタンスルホン酸ナトリウム水溶液 5 mL であらかじめコンディショニングした ODS ミニカラムに，試料 5 mL と 0.1M オクタンスルホン酸ナトリウム 5 mL をよく混ぜ，さらに塩酸で pH1.5 付近に調整したものを負荷した．続いて，ミニカラムを水 10 mL で洗浄した後，60 %メタノール水溶液 10 mL で溶出させた．溶出液をロータリーエバポレーターで濃縮，窒素ガスにより乾固させたのち，0.1M EDTA 水溶液 5 mL に溶解させた．

タンデム固相抽出法での精製は既報[8)]に準じて行った．すなわち，ODS ミニカラムの下に SCX ミニカラムを連結させ（以下，タンデム固相カラム），メタノール 5 mL，水 5 mL，100 mM りん酸緩衝液 5 mL であらかじめコンディショニングした．このタンデム固相カラムに，抽出液 10 mL と 100mM りん酸緩衝液 10 mL をよく混ぜたものを負荷した後，50mM りん酸緩衝液 10mL で洗浄を行った．ここで，ODS ミニカラムと SCX ミニカラムの連結をはずして SCX ミニカラムのみとし，さらに 25mM りん酸緩衝液 10 mL，水 10 mL，メタノール 10 mL で洗浄を行った．溶出は 25 % アンモニア水・メタノール(5:95)10 mL で行い，得られた溶出液はロータリーエバポレーターで濃縮，窒素ガスにより乾固させたのち，0.1M EDTA 水溶液 10 mL に溶解させた．

4．3 ヒスタミンの定量

キット付属のマニュアルに従い，遮光しながら水浴中(37 ℃)で 15 分間反応をさせ，分光光度計にて吸光度の測定を行った．

Ⅲ　結果および考察

キットを使い，5 種類の試料（生サバ，サバ干物，サバ照り焼き，ナンプラー，ベニバナエキス添加生サバ)についてヒスタミンの添加回収試験(n=3)を行った．平均回収率は生サバで 90 %以上となったが，サバ干物とサバ照り焼きは約 70 %，ナンプラーは約 50 %，ベニバナエキス添加生サバでは吸光度が 1 を超えてしまったため測定不可能であった(表 1)．これは，食品由来の色素や油分などの影響と考えられたため，精製工程の追加を検討した．

はじめにDC蛍光誘導体化-HPLC法での精製法を試みた．試料としてベニバナエキス 0.2 g を 0.1M EDTA 水溶液 25 mL に溶解したものを用いた．試料溶液を 5 mL 分取し，20 %トリクロロ酢酸水溶液 1 mL，0.1M オクタンスルホン酸ナトリウム 5 mL を添加し混和した後，ODS ミニカラムによる精製を行った．すなわち，ODS ミニカラムに試料を負荷し，水で洗浄後，60 %メタノール水溶液で溶出させ，溶出液は濃縮乾固後に，0.1M EDTA 水溶液 5 mL に溶解させた．これを分光光度計で吸収スペクトルを測定した．その結果，精製後の吸光度は精製前よりわずかに低くなったが，キットでの測定波長 470 nm 付近の吸光度は 1 をはるかに超えていた(図 1)．これは 60 %メタノール水溶液で溶出させる際に，ODS ミニカラムに保持されていた色素も溶出されてしまったためと考える．

そこで，タンデム固相抽出法での精製法 [4-6] を試みた．この精製方法は，逆相系カラムである ODS ミニカラムの下部に強陽イオン交換カラムである SCX ミニカラムを連結させたタンデム固相カラムを使い精製を行うものである．SCX ミニカラムでイオン交換により保持させた化合物はアンモニウムイオンと競合させることで溶出させるため，溶出を行う前に水やメタノールでミニカラムを洗浄できることから，より幅広い夾雑物を除去できることが期待された．試料はベニバナエキス 0.2 g を 0.1M EDTA 水溶液 25 mL に溶解したものを用いた．これを 10 mL 分取し，100mM りん酸緩衝液(10 mL)とよく混和させた後，タンデム固相抽出法による精製を行った．すなわち，ODS ミニカラムと SCX ミニカラムを連結させたものに試料を負荷し，50mM りん酸緩衝液での洗浄後に ODS ミニカラムを外して SCX ミニカラムだけとした後，25mM りん酸緩衝液，水，メタノールでの洗浄後，25 %アンモニア水・メタノール(5:95)で溶出させた．溶出液は濃縮乾固させたのち，0.1M EDTA 水溶液 10 mL に溶解させた．これを分光光度計にて吸収スペクトルの測定を行った．その結果，精製前と比較して精製後の波長 470 nm 付近の吸光度は著しく低下し，超純水と同等の吸収スペクトルが得られた(図 1)．

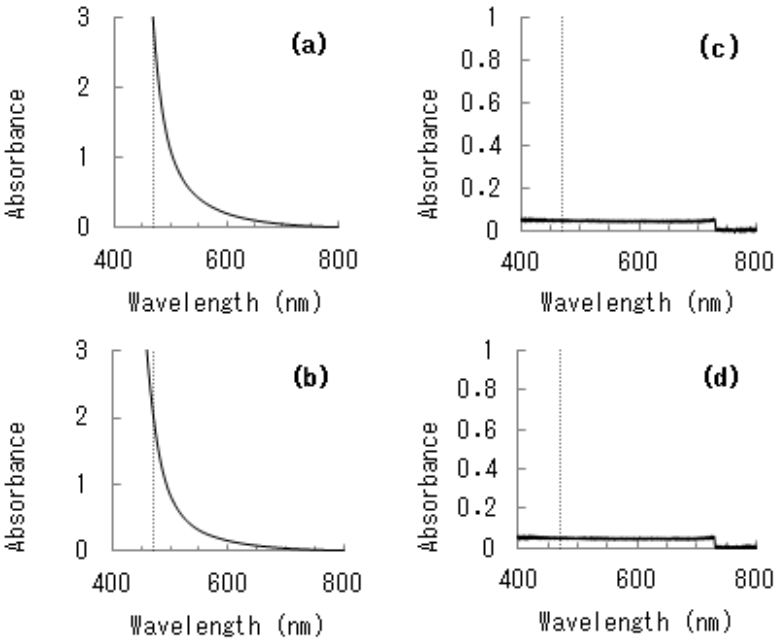


図 1.　ベニバナエキス添加 EDTA 水溶液（試料溶液）の精製前後，および超純水の吸収スペクトル

(a)試料溶液．(b)試料溶液を ODS ミニカラムで精製し濃縮乾固後に 0.1M EDTA 水溶液に溶解，(c)試料溶液をタンデム固相抽出法で精製し濃縮乾固後に 0.1M EDTA 水溶液に溶解，(d)超純水

ベニバナにはカルタミン，サフロミン A，サフロミン B 等が含まれており，これらの色素の極大吸収波長はキットでの測定波長の比較的近傍にある．しかし，今回検討したタンデム固相抽出法を適用することで，キットでの分析が可能になるような精製効果が得られることが示唆された．

そこで，実際に抽出後にタンデム固相抽出法での精製を追加して，キットを用いたヒスタミンの添加回収試験(n=3)を行った．試料として生サバ，サバ干物，サバ照り焼き，ナンプラー，ベニバナエキス添加生サバを用いた．その結果，

表 1 ヒスタミン測定キットによる添加回収試験

試料		添加量	平均回収率(%) (n=3)	
			通常法	改良法 [a]
サバ	生		91.2	97.4
	干物		72.3	91.4
	照り焼き	100 μg	72.3	90.1
	ベニバナエキス添加		– [b]	95.5
	ナンプラー		48.9	92.2

[a] 通常法にタンデム固相抽出法による精製を追加した方法

[b] ”–“は測定不可であったことを意味する

全ての試料で回収率 90 %を超えた(表 1).

以上のことから，本手法を用いることで水産調理加工品もキットでの測定対象となりうることが示唆された.

しかし，ヒスタミン以外の不揮発性アミンもこの食中毒の原因として関与している可能性も考えられている[10]ため，不揮発性アミンの迅速な一斉分析法の検討を引き続き行いたいと考える.

Ⅳ 文献

1) Toda, M. Yamamoto, M., Uneyama, C., Morikawa, K. Histamine food poisonings in Japan and other countries. Bulletin of National Institute of Health Sciences, 127, 31-38(2009).

2) 厚生労働省監修. 食品衛生検査指針理化学編 2005.東京,日本食品衛生協会,2005,pp.621-630

3) 「食中毒の発生状況-平成 26 年」2014 年 12 月 26日更新 山形県ホームページ(http://www.pref.yamagata.jp/ou/kankyoenergy/020071/05/05-01.html) (2015 年 8 月現在)

4) Awazu,K., Nomura, C., Yamaguchi, M., Obana, H. Determination of histamine in fish and fish products by tandem solid-phase extraction. Shokuhin Eiseigaku Zasshi(J. Food Hyg. Saf. Sci.), 52, 199-204(2011).

5) Kikuchi,H. ,Tsutsumi, T., Matsuda, E. Parformance evaluation of a fluoresceamine-HPLC method for determination of histamine in fish and fish products. Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Saf. Sci.), 53, 121-127(2012).

6) 食品衛生検査指針理化学編 2015. 東京，日本食品衛生協会，2015，pp. 791-794

7) Kakigi, Y., *et al*. Quantification of non-volatile amines in beer using hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometer. Bunseki Kagaku, 60, 157-162 (2011)

8) Takizawa, Y., Shoji, M., Chiba, Y., Okura, Y. Examination of the quick analysis method of the histamine. Annual Report of Miyagi Prefectural Institute of Public Health and Environment, 32, 73-76(2014)

9) G. Sagratini, *et al*. Simultaneous determination of eight underivatised biogenic amines in fish by solid phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Food Chemistry, 132, 537-543(2012).

10) EFSA Panel on Biological Hazards(BIOHAZ). Scientific opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods. EFSA Journal, 9, 2393, 1-93(2011)

資　料

LC-MS/MS を用いた不揮発性アミンの一斉分析法の検討

佐藤 陽子，太田 康介，笠原 義正

Studies on Simultaneous Analysis of Non-volatile Amines by LC-MS/MS

By Yoko SATO, Kosuke OTA and Yoshimasa KASAHARA

蛍光検出器付き高速液体クロマトグラフを用いた食品中の不揮発性アミンの分析は誘導体化が必要なため，前処理に長時間を要する．そこで，誘導体化を必要としない高速液体クロマトグラフ・タンデム質量分析計を用いて不揮発性アミン５種の一斉分析を検討した．生サバを対象として検討したところ，ヒスタミンを含めた５種の不揮発性アミンは分析可能で，添加回収試験では 92.2－119 %の回収率であった．

Key Word：ヒスタミン,不揮発性アミン,食中毒,LC-MS/MS

Ⅰ　はじめに

平成 26 年 9 月に山形県内でヒスタミン(Him)が原因と疑われる食中毒が発生し，当所において検査を実施した．検査方法は食品衛生検査指針の参考法[1)]にしたがい蛍光検出器付き高速液体クロマトグラフ(HPLC-FL)を用いHimを含め5種類の不揮発性アミンの一斉分析を実施した.しかし,この検査法は抽出，精製後，ダンシルクロライドにより誘導体化する過程が含まれ前処理に長時間を要する．そこで，選択性の高い高速液体クロマトグラフ・タンデム質量分析計(LC-MS/MS)を用いて誘導体化を必要としない一斉分析法について検討した．

生サバを用いた添加回収試験を指標に HPLC-FL 法と LC-MS/MS 法を比較した．同時に，サバの干物及び照焼きについても検討した．

Ⅱ　材料および方法

1.　試料

市販の生サバ，サバの干物及び照焼きをフードプロセッサーで細切，均質化後冷凍保存したものを解凍して用いた．

2.　装置

HPLC-FL は日本分光製Galliver1500 シリーズを用いた．LC-MS/MS は Agilent 社製 1100 シリーズ(LC)及び AB SCIEX 社製 API2000(MS/MS)を用いた．

3.　標準品

ヒスタミン二塩酸塩，チラミン塩酸塩，カダベリン二塩酸塩は関東化学製，プトレシンは和光純薬工業製，スペルミジン三塩酸塩は MP Biomedicals 社製を用いた．Him，チラミン(Tym)，カダベリン(Cad)，プトレシン(Put)，スペルミジン(Spd)は 1000 μg/mL となるように，それぞれ 0.1 M 塩酸に溶解し標準原液とした．混合標準溶液は各標準原液から 0.1 M 塩酸:アセトニトリル(2:8)で希釈して調製し用いた．

4.　測定条件

4.1 HPLC-FL 条件

LC カラムは Inertsil ODS-SP 4.6 mm i.d.×250 mm，5 μm (GL Science 社製) を用い，カラム温度は 40 ℃とした．移動相には A 液:アセトニトリル-水(6:4)，B 液:アセトニトリル-水(7:3)のグラジエント条件(100 %A 液(0 min)→100 %A 液(23 min)→0 %A 液(24 min)→0 %A 液(39 min)→100 %A 液(40 min))で溶出を行った．移動相流量は 1.0 mL/min，試料注入量は 10 μL とした．検出波長は励起波長 325 nm，蛍光波長 525 nm とした．

4.2 LC-MS/MS 条件

LC カラムは CAPCELL CORE PC 2.1 mm i.d.×150 mm, 2.7 μm（資生堂製）を用い，カラム温度は 40 ℃とした．移動相は A 液:アセトニトリル-100 mM ギ酸アンモニウム(pH 3.0)(9:1)，B 液:10 mM ギ酸アンモニウム(pH 3.0)のグラジエント条件(90 %A 液(0 min)→90 %A 液(1 min)→10 %A 液(10 min)→90 %A 液(10 min))による溶出を行った．移動相流量は 0.25 mL/min，試料注入量は 5 μL とした．MS/MS のイオン源には ESI(positive)を用い，イオンスプレー電圧は 4200 V，イオン源温度は 500 ℃に設定した．測定は MRM モードで行い，定量イオン(*m/z*)は 112→95(Him)， 138 → 121(Tym),103 → 86(Cad),89 → 72(Put),146→72(Spd)とした．

5. 試験溶液の調製

5.1 HPLC-FL 法

試料 5.0 g を食品衛生検査指針の参考法[1)]にしたがい試験溶液を調製した(Fig.1)．

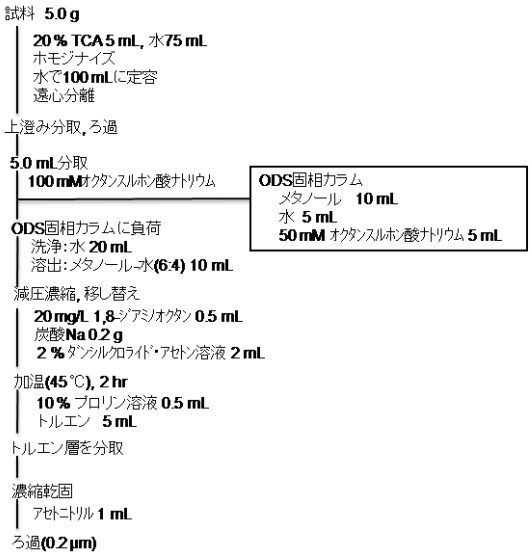


Fig.1 HPLC-FL 法の試験溶液調製法

5.2 LC-MS/MS A 法

試料 5.0 g を HPLC-FL 法と同様の操作により抽出して精製し得られた溶液を濃縮乾固後，誘導体化せず 0.1 M 塩酸-アセトニトリル(2:8)2 mL に溶解した．この溶液を 1 mL 分取し同溶媒で 25 mL に定容，0.2 μm のメンブランフィルターを通し試験溶液とした(Fig.2)．

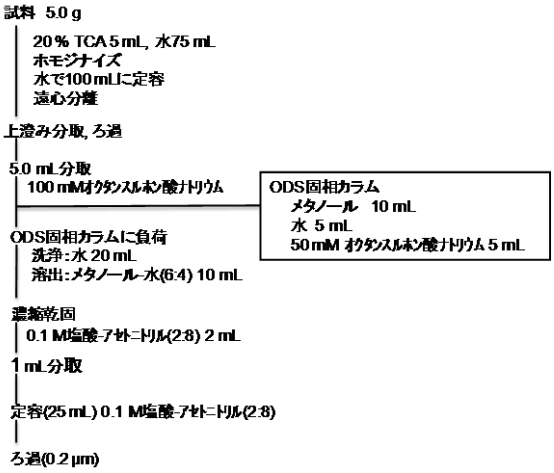


Fig.2 LC-MS/MS A 法の試験溶液調製法

5.3 LC-MS/MS B 法

試料 2.0 g を 50 mL 目盛付遠沈管に採り，抽出溶媒 30 mL を加えホモジナイズ後，50 mL に定容した．これを撹拌し静置後，遠心分離を行った．この上澄み液 1.0 mL を分取し 0.1 M 塩酸-アセトニトリル(2:8)で 20 mL に定容，0.2 μm のメンブランフィルターを通し試験溶液とした[2-6)] (Fig.3)．

抽出溶媒の検討は，①1.3 %トリクロロ酢酸水溶液，②1.5 %トリフルオロ酢酸水溶液(TFA aq.)-アセトニトリル(15:85)，③0.1 M 塩酸-アセトニトリル(2:8)及び④0.1 M EDTA・2Na 水溶液(pH 8)の 4 種を用いて行った．抽出溶媒②，③，④を使用した場合ホモジナイズ後の定容(50 mL)にそのまま抽出溶媒を用いたが，①の場合は精製水を用いた．

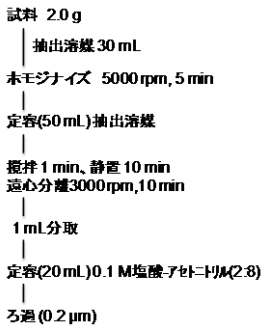


Fig.3 LC-MS/MS B 法の試験溶液調製法

Ⅲ 結果および考察

1. 試験溶液の溶媒の検討

水-メタノールの比率を水，(2：8)，(5：5)，(8：2)，メタノールに調製し，同様に 0.1 M 塩酸-メタノール，水-アセトニトリル及び 0.1M 塩酸-アセトニ

トリルについても同じ比率で調製し混合標準溶液を作成し，各アミンのピーク高及び形状を比較した．Spd についてはどの溶媒を用いても良好なピーク形状は得られなかった．Spd 以外のアミンでは 0.1 M 塩酸-アセトニトリル(2:8)を用いた場合に良好なピークが得られため，これを試験溶液の溶媒とした．

2. 試験溶液調製方法の検討

生サバにアミン濃度が各々100 μg/g となるよう標準溶液を添加し，LC-MS/MS 法と HPLC-FL 法の回収率を比較した(Table 1)．

LC-MS/MS A 法では，各アミンの回収率は 86.3-105 %と良好な結果が得られた．この方法は抽出,精製する過程は HPLC-FL 法と同じであるが,誘導体化を行わず測定するため，前処理に要する時間は短縮できる．

LC-MS/MS B 法では,ホモジナイズ後,遠心分離し,上澄みを希釈し試験溶液とする方法である．この方法では固相カラムによる精製過程及び誘導体化がないため，操作が HPLC-FL 法及び LC-MS/MS A 法に比べ簡便で迅速に検査結果を得ることができる．抽出溶媒に②0.1 M 塩酸-アセトニトリル(2:8)を用いたときの各アミンの回収率は 92.2-119 %と他溶媒を使用した場合に比べ良好であった．

3.添加回収試験

次に食中毒検体として想定されるサバの干物及び照焼きを用いて添加回収試験を行った．アミン濃度は各々100 μg/g となるよう試料に添加した．各アミンの回収率は干物では 95.7-111 %，照焼きでは 49.1-98.2 %であった (Table 2)．照焼きで回収率が低かった要因は調味料や油分等の夾雑物が多いため，イオン化の抑制が生じたものと考えられる．

なお，Him に限れば回収率は干物では 101 %，照焼きでは 77.8 %と残留農薬等の妥当性評価ガイドラインの真度の目標値 70-120 %の範囲内であった．

また，今回用いた Him の検量線では標準溶液の最小濃度が 12.5 ppb なので，これは LC-MS/MS B 法の試料濃度に換算すると 6.25 ppm になる．これは HPLC-FL 法の Him の定量限界 20 ppm[1)]に比べても感度が良い．なお，この最小濃度(12.5 ppb)での S/N 比は 356 と定量限界の目安となる S/N 比 10 よりも十分大きい．

文献 [7)]によると食品中の Him 濃度が 50-100 ppm で感受性の高いグループは食中毒をおこす可能性が指摘されているが，現在，国内では食品中の Him 濃度の基準値は設定されていない．しかし，Him による食中毒の原因究明のためには多様な食品が検体として想定されるため，夾雑物の多い調理品でも一斉分析が可能となるよう分析法の検討が必要と考える．

Ⅳ 文献

1) 食品衛生検査指針理化学編，厚生労働省監修，日本食品衛生協会，東京，2005，p.621-630
2) 山本圭吾,木本聖子,森居京美，城山二郎：LC-MS/MS による魚介類中ヒスタミン分析法の検討，奈良県保健環境研究センター年報，44，53-57(2009)
3) 吉田達雄 他：水産物中ヒスタミン分析の検討，熊本県保健環境科学研究所，40，20-24(2010)
4) 大月史彦,肥塚加奈江,林隆義,山本淳:LC/MS/MS を用いた不揮発性腐敗アミンの一斉分析法の検討,岡山県環境保健センター年報,34,99-103(2010)
5) 多田裕之,南谷臣昭,神山恵里奈,河村博：LC-MS/MS によるキノコ及び魚介類の中毒成分迅速分析法，岐阜県保健環境研究所報，21,1-7(2013)
6) 瀧澤裕,庄司美加,千葉美子，大倉靖：LC-MS/MS による不揮発性アミン類迅速分析法,第 50 回全国衛生化学技術協議会年会 講演集，174-175(2013)
7) 登田美桜,山本都,畝山智香子,森川肇:国内外におけるヒスタミン食中毒，国立医薬品食品衛生研究研報告，127，31-38(2009)

Table 1. 添加回収試験の結果

調製方法	平均回収率(%)※				
	Him	Tym	Cad	Put	Spd
HPLC-FL 法	102	97.9	96.9	96.9	88.7
LC-MS/MS A 法	105	87.2	90.4	86.2	98.9
LC-MS/MS B 法					
①1.3 % トリクロロ酢酸水溶液	116	100	91.2	87.5	124
②0.1 M 塩酸-ｱｾﾄﾆﾄﾘﾙ(2:8)	112	105	92.4	92.2	119
③1.5 % TFA aq.-ｱｾﾄﾆﾄﾘﾙ(15:85)	119	90.8	85.1	63.5	119
④0.1 M EDTA･2Na 水溶液	21.1	101	34.9	0	23.4

※添加濃度 各アミン 100 μg/g, n=3

Table 2. 添加回収試験の結果

試料	平均回収率(%)※				
	Him	Tym	Cad	Put	Spd
干物	101	104	109	111	95.7
照焼き	77.8	98.2	50.9	76.3	49.1

※添加濃度 各アミン 100 μg/g, n=3

資　料

自然毒による食中毒事例（2014 年）

長岡 由香，笠原 義正

Food Poisoning by Natural Toxins in Yamagata Prefecture in 2014

By Yuka NAGAOKA and Yoshimasa KASAHARA

2014 年に山形県内で発生した自然毒による食中毒事例は 6 件であった．これらは，すべて植物性自然毒であり，原因物質としては，スイセンによる食中毒 1 件，ツキヨタケによる食中毒 4 件，ハイイロシメジによる食中毒 1 件であった．

そのうち当研究所に検査依頼のあった事例は 3 件であった．この 3 件は，いずれもキノコの調理品を喫食し，吐き気，嘔吐，腹痛，下痢等の症状を呈した事例である．残品について，高速液体クロマトグラフ/タンデム質量分析計(LC-MS/MS) により分析した結果，いずれもツキヨタケの誤食による食中毒と判明した．

その他の 3 件については，残品の形態的特徴等で判定可能であったため，検査依頼がなかった．

Key Word：食中毒，自然毒，植物性自然毒，ツキヨタケ，illudin S

Ⅰ　はじめに

自然毒による食中毒事例において，理化学的検査が必要な場合は，食品安全衛生課又は管轄保健所長から依頼を受け，当所で原因物質の調査を行っている．

2014 年，自然毒による食中毒は 6 件発生しており(Table 1)，そのうち，植物性自然毒のツキヨタケによる食中毒 3 件について検査依頼があり実施した．それらの検査概要について報告する．

事例の概要は，保健所及び食品安全衛生課による調査報告からまとめた．当所で調査を行った分析条件や結果については，当所の検査報告書からまとめた．

Ⅱ　事例の概要

事例１：ツキヨタケの煮物による食中毒

10 月 9 日，医療機関から保健所に，キノコによる食中毒を疑う患者 2 人が受診した旨の連絡があった．保健所が調査したところ，10 月 8 日に山林でキノコを採取し，午後 7 時頃自宅で調理し食べたところ，喫食者 5 人中 4 人が午後 8 時頃から吐き気，嘔吐を呈し，医療機関を受診した．入院患者はなかった．

事例２：ツキヨタケの炒め物による食中毒

10 月 13 日，医療機関から保健所に，キノコによる食中毒を疑う患者 2 人が受診した旨の連絡があった．保健所が調査したところ，同日に山林でキノコを採取し，午後 1 時 30 分頃自宅で調理し食べたところ，喫食者 3 人中 2 人が午後 8 時頃から吐き気，嘔吐，下痢，腹痛を呈し，医療機関を受診した．その後の報告による発症者数は 3 人であった．入院患者はなかった．

事例３：販売されたムキタケにツキヨタケが混入したことによる食中毒

10 月 17 日，山形県内の果実野菜販売業の店舗において購入したムキタケを，10 月 18 日午前 9 時頃から調理し食べたところ，喫食者 2 人中 2 人が午前 10 時頃から吐き気，嘔吐，倦怠感の症状を呈した．患者は仙台市在住であり，医療機関受診者は 1 人，入院患者数は 1 人であった．10 月 19 日，仙台市の管轄保健所から山形の販売店舗管轄保健所に調理済み残品（ツキヨタケのお吸いもの）が搬入され，山形の保健所から検査依頼があった．また，食中毒患者が食したムキタケと同一と考えられるキノコは，その他 3 店舗で販売されており，販売者が自主回収を行った．他に発症報告はなかった．同日，山形の販売店舗管轄保健所により，当該食品を購入した飲食店がありツキヨタケ混入の疑いがあるとの理由で調理品が回収された．その調理品 2 検体（喫食者なし）について検査依頼があった．

Ⅲ　材料及び方法

1．試料

事例 1 は，調理済み残品 1 検体を均質化して試料とした．事例 2 は，未調理品及び調理済み残品をそれぞれ均質化して試料とした．事例 3 は，仙台市の食中毒検体 1 検体及び飲食店調理品 2 検体をそれぞれ均質化して試料とした．

2．標準品

ツキヨタケからメタノールエキスを作成し，これを各種クロマトグラフィーで分離精製し，illudin S を単離した [1]．Illudin S を 5.0 mg 秤量し，5.0 mL のメタノールに溶解したものを適宜希釈して標準溶液とした．

3．抽出及び精製

試料 5.0 g を量り，メタノール 50 mL を加えてホモジナイズした．これをろ過後減圧濃縮して，10 %メタノール 20 mL に溶解し，メタノール 5 mL，水 5 mL でコンディショニングを行った Oasis HLB に負荷した．20 %メタノール 5 mL で洗浄後，メタノール 5 mL で溶出した．これを減圧濃縮し，メタノール 1 mL に溶解して試料溶液とした．試料量が 5 g に満たない場合には全量はかりとった．

4．分析条件

装置は，高速液体クロマトグラフ/タンデム質量分析計(LC-MS/MS)（高速液体クロマトグラフ：Agilent 社製 Agilent 1100 シリーズ，質量分析計：AB Sciex 社製 API 2000）を用いた．

既報 [2] に従い LC-MS/MS を次の条件で測定した．分析カラムは Inertsil ODS-3 (2.1 mm i.d. ×150 mm，5 μm)を用い，カラム温度は 40 ℃，移動相は 5 mM ギ酸アンモニウム：メタノール (7：3)，移動相流速は 0.2 mL/min とした．イオン化法は ESI(Positive)，ターボガス温度は 450 ℃，試料注入量は 5 μL とした．定量用モニタリングイオンは(m/z)：265→217，確認用モニタリングイオンは(m/z)：265→201 とした．

Ⅳ　結果及び考察

本法における illudin S の定量限界は 0.28 μg/g である [1]．検査依頼は，illudin S が検出されるかどうかの定性試験であったが，定量限界を超えた検体について，検出と判定した．

事例 1 の検体からは illudin S が検出された (定量値：28 μg/ g)．事例 2 の検体は，未調理品及び調理済み残品のどちらからも illudin S が検出された．(未調理品定量値：1067 μg/ g，調理済み残品定量値：106 μg/ g)．事例 3 の仙台市の食中毒検体からは illudin S が検出された (定量値：1 μg/ g)．飲食店調理品 2 検体からは検出されなかった．

山形県内において，ツキヨタケによる食中毒は頻繁に発生している．ムキタケ，ヒラタケ等の食用キノコと形態が似ていることが誤食の原因と考えられる．

ツキヨタケに関しては中毒症状とそれを引き起こす illudin S の量の正確な知見は無いが，illudin S として 1 mg 以上の摂食により中毒が起こると推定されている [1)].

2014 年は，ツキヨタケによる食中毒は 4 件発生し，そのうちの 3 件について理化学的検査を行った．1 件は残品の形態的特徴等で判定可能であったため，検査依頼がなかった．

調理品の場合，illudin S は，煮汁にも移行している．事例 1 及び事例 3 における illudin S の定量値が低い理由は，食中毒検体が具材のみであり，illudin S の多くが汁に移行していたためと推定される．また，事例 3 の飲食店調理品については，検体に煮汁も含まれていたが検出されなかったことより，ツキヨタケが混入していなかったと考えられる．食中毒の原因物質の理化学的検査において，検体が調理品の場合，可能であれば煮汁も共に回収してもらうように依頼することが必要と考えられる．

自然毒の食中毒は，事例 1 及び事例 2 のように，採取者が家庭内で調理し誤食することで発生する場合が多い．しかし，事例 3 のように，市場流通品の食用キノコに有毒キノコが混入した場合，被害が広域に発生する危険性がある．今回の発症者は 1 家族 2 人であったが，被害を最小限にするためにも，迅速な原因物質の究明を行うことが必要である．

V 文献

1) 笠原義正ら：LC/MS/MS によるツキヨタケおよび食中毒原因食品中の illudin S の分析，食品衛生学雑誌，50，167-172，(2009)

2) 和田章伸，笠原義正：ツキヨタケの中毒成分 illudin S の LC/MS/MS による分析，山形県衛生研究所報，43，1-5，(2010)

Table 1　2014 年に発生した自然毒による食中毒事例の概要

発生	発症時間	発症者数	喫食者数	原因食品	症状	原因物質	
5 月	30 分後	4	4	スイセンの葉	吐き気、嘔吐、腹痛	スイセン	
10 月	1 時間後	4	5	ツキヨタケの煮物	吐き気、嘔吐	ツキヨタケ	※
10 月	1 時間半後	3	3	ツキヨタケの炒め物	吐き気、嘔吐、下痢、腹痛	ツキヨタケ	※
10 月	直後	4	5	ツキヨタケの煮物	吐き気、嘔吐、下痢	ツキヨタケ	
10 月	1 時間後	2	2	ツキヨタケのお吸い物	吐き気、嘔吐、倦怠感	ツキヨタケ	※
10 月	不明	1	10	ハイイロシメジの焼物	下痢、嘔吐	ハイイロシメジ	

※：検査依頼のあった事例（依頼のなかった事例は残品の形態鑑定で判定した）

資　料

ツキヨタケ中の中毒成分 illudin S の含有量および塩蔵による消長

大河原 龍馬，和田 章伸，笠原 義正

Concentration of illudin S in *Omphalotus guepiniformis* and its reduction by salting

by Ryuma OKAWARA,　Akinobu WADA and Yosimasa KASAHARA

ツキヨタケ中の illudin S 含有量は子実体が大きくなるほど増加するが，ある重量で減少に転じることが分かった．また，石突の黒紫色のシミの部分に毒があり，これを取り除くと中毒しないという伝承は，illudin S を定量することにより否定された．さらに，塩蔵による毒抜きを検討したところ，半分に切断したツキヨタケの場合では，1ヶ月間の塩蔵により illudin S 残存率が 0.4 %となったが，サンプル調製の際の切り方で残存率が変わる可能性が示唆された．

Key Words: ツキヨタケ *Omphalotus guepiniformis*, イルジンS　illudin S, 塩蔵　salting

Ⅰ　はじめに

ツキヨタケ（*Omphalotus guepiniformis*）による食中毒は毎年のように発生しているが，これは食用のヒラタケ，ムキタケ，シイタケなどと形態が似ていることが原因と考えられる．これを誤食すると30分から3時間で嘔吐，腹痛，下痢などの症状を呈する．

厚生労働省の統計によると，全国のツキヨタケ中毒の件数は平成12年から平成26年までの15年間で296件である[1]．これはキノコによる食中毒の発生件数の約4割を占める．我々は既にツキヨタケの食中毒原因物質の illudin S について固相抽出を用いた前処理法および高速液体クロマトグラフ/タンデム質量分析計(LC-MS/MS)を用いた定量法を確立した[2]．

前報[2]ではこの方法を用いてツキヨタケの採取地域の違いによる illudin S 含有量の差について検討を行った．今回はツキヨタケの子実体の大きさまたは部位の違いについて検討を行った．また，毒キノコについて「塩蔵すると毒が抜ける」，「干して乾燥すれば食べられる」，「ナスと一緒に調理すると食べられる」等といったような言い伝えが全国的に知られている[3]．さらに，以前我々が行ったアンケート調査からも同様に，キノコを毒抜きして食べるかという問いに対して「水に浸す」，「塩蔵をする」ことで食するという回答があった[4]．そこで塩蔵による減毒について真偽のほどを検証した．

Ⅱ　材料および方法

1.　試料

2009年，2010年および2013年に山形県鶴岡市田麦俣および西川町志津に自生していたツキヨタケを採取し，-20 ℃で凍結保存したものを用いた．

2.　試薬

標準品 ： illudin S は前報[2]に従い，ツキヨタケから分離精製したものを用いた．標準溶液は illudin S を 5 mg 秤量し，5 mL のメタノールに溶解したものを適宜稀釈したものを用いた．

試薬 ： ギ酸およびギ酸アンモニウムは関東化学㈱製の特級，メタノールは関東化学㈱製の高速液体クロマトグラフィー用を使用した．　食塩は食用の市販品を用いた．

固相カートリッジ：Waters社製Oasis HLB 6 cc (500 mg) を用いた．使用前にメタノール 5 mL 及び水 5 mL を用いてコンディショニングを行った．

3. 装置

LC-MS/MS ： 高速液体クロマトグラフはAgilent社製Agilent 1100シリーズを用いた．質量分析計は㈱エービーサイエックス社製API2000を用いた．

4. 測定条件

LC-MS/MSは前報[2)]に従って，移動相を5 mMギ酸アンモニウム-メタノール（7:3）とした．定量用モニタリングイオン(*m/z*)を265 → 217，確認用モニタリングイオン(*m/z*)を265 → 201とした．

5. 試料溶液の調製

細切したツキヨタケ5 gを量り取り，メタノール50 mLを加えてホモジナイズした後，ろ過した．ろ液を減圧濃縮後，10％メタノールで溶解し，Oasis HLBに負荷した．20％メタノール5 mLで洗浄後，メタノール5 mLで溶出させた．これを減圧濃縮し，メタノール1 mLで溶解して0．45 µmのメンブレンフィルターを通し試料溶液とした．

6. 検量線および定量

Illudin Sを1，5，10，25 µg/mlになるように調製し，その5 µLをLC-MS/MSに注入した．測定で得られたクロマトグラムからピーク面積を求め，絶対検量線法により検量線を作成した．

7. 塩蔵によるilludin Sの消長

食用きのこと間違われやすい大きさのツキヨタケ(25.3 g～33.3 g)を，ツキヨタケの重量に対して1.5～2倍の重量の食塩と混合して一定期間塩漬けを行った後に，流水で24時間塩抜きした菌体について「5. 試料溶液の調製」にしたがい試料溶液を作成した．

Ⅲ 結果および考察

1. 子実体の大きさの違いによるilludin S含有量の差

2009年9月に山形県鶴岡市田麦俣で採取した様々な大きさのツキヨタケについて，それぞれのilludin S含有量を測定した．ツキヨタケの重量は20～50 gを中心に2．2～120．3 gであった（30個）．その結果，子実体1個当たりのilludin S含有量は0.018～32.57 mgであった(Figure 1)．子実体が大きくなるほど，そこに含まれるilludin Sは増加していくが，約70 gを超えると減少傾向に転じることが分かった． このことから，ツキヨタケがある程度まで成長するとilludin Sの生産が行われなくなることが示唆される．

さらに，発生する倒木の違いによってilludin S含有量に差があるのかどうか見るために，倒木ごとに分けてツキヨタケを採取し，illudin S含有量を測定した．測定には2010年に西川町志津で採取したものを用いた．このツキヨタケはそれぞれ隣接する3本の倒木（倒木A, B, Cとする）に自生していた．よって，場所，時期，気象条件等は同様である．

その結果，子実体1個当たりのilludin S含有量は重量の大きい個体ほど大きくなることは同様であるが，その増え方に一定の傾向は見られなかった．しかし，70 g以上のツキヨタケを採取できなかったので，Fig.1に示したようなilludin Sの減少は確認できなかった(Figure 2)．

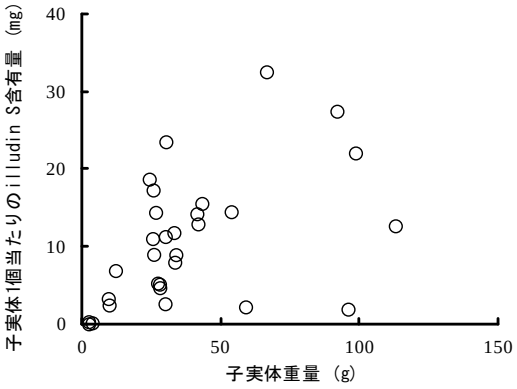
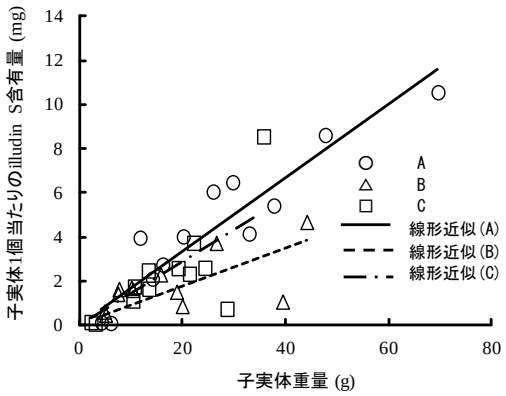


Fig. 1. 様々な大きさのツキヨタケ中のilludin S



A
B
C

Fig.2. illudin S contents in Omphalotus guepiniformis of different tree growing

2. 部位の違いによる illudin S 含有量の差

ツキヨタケの柄の基部に位置する石突の中央部には黒紫色のシミがあり，他の食用キノコとツキヨタケとを判別する最大の特徴とされている．聞き取り調査によれば，この黒紫色のシミの部分に毒があるとされている．したがって石突の部分を取り去れば中毒しないと言われている．そこで，黒紫色のシミの部分に illudin S が集まっているのか，また，それ以外には含まれていないのか検討を行った．

試料は 2009 年 9 月に鶴岡市田麦俣および 2013 年 10 月に西川町志津で採取したツキヨタケを用いて，おのおの黒いシミを含む石突部分，傘の部分，傘と石突の中間の柄の部分の３つの部位に分けて，illudin S 含有量を測定した．

測定の結果，鶴岡市田麦俣のツキヨタケでは石突に含まれる単位重量当たりの illudin S 含有量は傘の 4.1 倍であり，西川町志津では 2.4 倍，柄についてはそれぞれ傘の 1.9 倍，1.2 倍であった．すなわち，いずれも石突，柄，傘の順に多かった(Table1)．一柳らは菌糸体で illudin S が生産され，子実体発生時に吸い上げられて蓄積されることを示唆している[5]．これらのことから，シミの部分に毒が集まるというよりも，菌糸体から石突を通して子実体全体に illudin S が供給されていると考える．したがって，菌糸体に近い石突部分のほうが単位重量当たりの illudin S 含有量が大きくなり，先端に行くほど illudin S が稀釈されて小さくなっていくものと考えられる．

一方，単位重量当たりではなく傘，柄，石突おのおのに含まれる illudin S 含有量を見ると，傘の部分が最大であった．よって，シミ(石突)を除けば食べられるという言い伝えは否定される．

3. 塩蔵による illudin S 含有量の消長

山形県内の一部地域では，有毒キノコであるツキヨタケを塩蔵して毒抜きを行い食す習慣があったと言う．また，2005 年に実施した山形県内の食生活改善推進協議会会員を対象としたアンケート調査では，ツキヨタケを水に浸す，あるいは塩漬けにして毒抜きをして食すると回答した人が 2．8 %いた[4]．

塩蔵の方法は生のキノコを茹でた後流水にさらし，水切りした後に大量の塩で漬ける．さらに 1～3 ヵ月後に水にさらして塩抜きを行った後に調理に供すると言う．

今回，この塩蔵の過程において各段階でどの程度 illudin S が減少するかを検討するために，単位重量当たりの含有量を比較した．

そこで，塩漬け前の illudin S 含有量が分かっていなければならないので，ツキヨタケを細切して均一に混合し，その一部を塩漬け前の含有量とした．それ以外は 1 週間，1 ヶ月，2 ヶ月，3 ヶ月塩蔵した後に含有量を測定した．その結果，1 ヶ月後には微量になり，2 ヵ月後には検出されなかった(Table 2)．

Table 2. ツキヨタケの塩蔵による illudin S含有量の経時変化（細切）

塩蔵期間	単位重量当たりの含有量（μg/g）[a]
塩蔵前	130.37 ± 15.62
1週間	0.36 ± 0.37
1ヶ月	0.05 ± 0.05
2ヶ月	N.D.
3ヶ月	N.D.

a)平均値±標準偏差(n=4-5)

しかし実際に塩蔵して 3 ヶ月後に塩抜きしても中毒した事例があるので，illudin S が検出されないことは考えにくい．これは細切したために illudin S が流出して減少した可能性が高い．そのため，菌体の左右で含有量が変わらないことをあらかじめ確認したうえで，半分にして片方を定量し，もう一方を塩蔵して 1 週間後および 1 ヵ月後に illudin S を定量した．

その結果を Table3 に示した．半分にしたものは 1 ヵ月後

Table1. ツキヨタケの部位の違いによるilludin S 含有量の差

採取地	含有量(μg/g)[a]		
	傘	柄	石突
鶴岡市田麦俣[b]	291.8 ± 126.9	638.6 ± 98.4	1221.8 ± 462.0
西川町志津[c]	63.7 ± 23.8	131.1 ± 67.7	158.6 ± 87.8

a)平均値±標準偏差(n=4-5)
b)2009年採取(n=4)
c)2013年採取(n=5)

Table 3. ツキヨタケの塩蔵によるilludin S 含有量の経時変化

塩蔵期間	単位重量当たりの含有量 (μg/g)[a]	
	半分	細切
塩蔵前	401.7 ± 244.2	401.7 ± 244.2
1週間	1.24 ± 0.29	0.143 ± 0.175
1ヶ月	1.79 ± 1.49	0.005 ± 0.008

a)平均値±標準偏差(n=4-5)

に1.79 μg/gになり，細切したものは0.005 μg/gであった．細切したもののほうが半分にしたものと比較して含有量が小さくなったことから，細かく切断することでよりilludin Sが流出しやすくなる可能性が高い．したがって，今後はキノコを切断せずに塩蔵を評価する方法を検討する．

Ⅳ 文献

1) 厚生労働省：食中毒に関する情報，4 食中毒統計資料 (http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryou/shokuhin/syokuchu/index.html)

2) 和田章伸，笠原義正：ツキヨタケの中毒成分illudin SのLC/MS/MSによる分析，山形県衛生研究所報，43，1-5，2010

3) 登田美桜，畝山智香子，豊福肇，森川馨：わが国における自然毒による食中毒事例の傾向(平成元年～22年)，食品衛生学雑誌，53，105-121，2012

4) 笠原義正，伊藤健：健康と食べ物の言い伝えに関するアンケート調査，山形県衛生研究所報，39，25-33，2006

5) 一柳剛他：ツキヨタケ（*Omphalotus guepiniformis*）によるilludin Sの生産，日本きのこ学会誌，21(2)，98-102，2013

資　料

畜水産食品中の動物用医薬品におけるLC-MS/MS一斉分析法の妥当性評価

須貝 裕子

The validity value of the LC-MS/MS simultaneous analysis way in medical supplies for animals in the Livestock Products and Seafoods

By Hiroko SUGAI

畜水産食品中に残留する動物用医薬品を高速液体クロマトグラフ質量分析計により測定するために，「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドライン」(以下，ガイドライン）に基づき妥当性評価を実施した．すなわち，移動相及び希釈倍率等に検討を加えた方法を用い，表面多孔性（コアシェル型）カラムを選定した場合，今回対象としたすべての食品，動物用医薬品においてガイドラインに適合する結果が得られた．

Key Words：動物用医薬品，畜水産食品，妥当性評価，LC-MS/MS

Ⅰ　はじめに

当所における残留動物用医薬品（以下，動物薬）検査は，「HPLC による動物用医薬品等の一斉試験法Ⅰ（畜水産物）（以下，一斉法Ⅰ）」等により，紫外分光光度型検出器付き高速液体クロマトグラフ（HPLC-UV）を中心に測定を実施してきたが，一斉法Ⅰは精製操作が十分ではなく，紫外線吸光度を指標にしているため，様々な目的外成分（夾雑成分）を含んでいる畜水産食品の測定には困難なことが多かった．

また，平成22年に「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドライン」（以下，ガイドライン）が改正され，さらに平成25年12月14日以降はこのガイドラインに基づき，妥当性を確認したものでなければ検査対象とならないこととなった．このため，一斉法Ⅰにおける妥当性評価を実施したところ，ガイドラインで評価すべきパラメータのうち，特に「選択性」を満足しない成分がほとんどであった．

一方，高速液体クロマトグラフ質量分析計（LC-MS/MS）はHPLC-UVに比べて高感度であり，物質を質量の違いで特定するため同定能力に優れているが，夾雑成分が目的成分のイオン化に影響を及ぼすことが考えられる．

そこで，夾雑成分の影響を減らしLC-MS/MSにより測定を行うために，一斉法Ⅰに検討を加えた方法（以下，「検討法」という．）により，妥当性評価を行ったので報告する．

Ⅱ　材料と方法

LC-MS/MS 測定において夾雑成分の影響を減らすために，試験液を希釈する検討を行った．

1 対象食品及び対象成分

対象食品は鶏卵，養殖魚，生乳及び食鳥肉（鶏筋肉）であり，対象成分はチアベンダゾール(TBZ)，5-ヒドロキシチアベンダゾール(5-OH-TBZ)，ピリメタミン(PYR)，スルファジアジン(SDZ)，スルファメトキサゾール(SMXZ)，オキソリニック酸(OXA)，スルファメラジン(SMR)，オルメトプリム(OMP)，

スルファジミジン(SDD),スルファモノメトキシン(SMMX), スルファクロルピリダジン(SCPD), トリメトプリム(TMP), スルファキノキサリン(SQX), スルファジメトキシン(SDMX)及びフルベンダゾール(FBZ)の 14 項目（15 成分）である.

2 装置及び測定条件

高速液体クロマトグラフ（LC）は Agilent 社製 1200 シリーズ, タンデム型質量分析計（MS/MS）は AB SCIEX 社製 API2000 をそれぞれ用いた.

測定条件の検討内容を Table 1 に示した. 移動相は①から③の 3 種類, 試験液溶媒はアセトニトリル及び水の混合液（①から④）とし, 混合割合を変えて最も感度の高い組み合わせを検討した.

測定カラムは分離の良い表面多孔性充填剤（コアシェル型）カラム①及び従来型の全多孔性充填剤カラム②を用い, LC-MS/MS により測定を行った.

Table 1. LC-MS/MS 測定条件の検討

移動相
- ①A 液；0.05%ギ酸
  B 液；アセトニトリル
- ②A 液；5mmol/L 酢酸アンモニウム水溶液
  B 液；アセトニトリル
- ③A 液；5mmol/L 酢酸アンモニウム水溶液
  B 液；5mmol/L 酢酸アンモニウムメタノール溶液

各グラジェント溶出

試験液溶媒
- ①アセトニトリル-水(1:9)
- ②アセトニトリル-水(2:8)
- ③アセトニトリル-水(3:7)
- ④アセトニトリル-水(4:6)

分析カラム
- ①資生堂社製 CAPCELLCORE C18 2.1mmi.d.×150mm
- ②Waters 社製 Atlantis®T3 2.1mmi.d.×150mm

3 定量限界

ここで, 動物薬のうち, 抗生物質や合成抗菌剤で残留基準値が定められていないものは,「残留してはならない」とされている. この場合, ガイドラインによる定量限界は, 定量限界相当の抽出液を添加した標準液又は添加サンプルにおいて S/N≧10 であることとされ, マトリックスの共存下における S/N 比を求める必要がある.

マトリックスの共存下ではイオン化に影響を与える可能性があるため, 希釈倍率は,「**2 装置及び測定条件**」の測定条件の検討で得られた条件を用いて, 定量限界相当の標準液の測定を行い, 目的成分のピークの S/N を求めて S/N≧10 である濃度範囲を算出し、マトリックスによる影響を考慮した上で決定した.

4 試験溶液の調製

一斉法 I においては脱脂操作に用いた溶媒（アセトニトリル-水(4:6)）がそのまま試験液溶媒となるが, これを変更する場合, 脱脂操作から溶媒を変更することが可能かどうか確認する必要がある. そこで, 試験液溶媒と同じ 4 種類の溶媒（①から④）により脱脂操作を行い, 最適となる条件を「検討法」とした.

5 妥当性評価

ガイドラインに基づき,妥当性評価を実施した. 添加濃度は, 鶏卵, 生乳及び食鳥肉においてはそれぞれの食品の残留基準値相当濃度, 養殖魚は複数の魚種の検査を実施しているため, 0.1ppm 及び 0.01ppm 相当の 2 濃度とした.

Ⅲ 結果および考察

1「検討法」

1.1 LC-MS/MS 測定条件

Table 1 により, 試験液の溶媒を変えて標準液の LC-MS/MS 測定を行ったところ, ①アセトニトリル-水(1:9)の標準液のピーク形状が最も良かった. 移動相においては,対象成分によって感度の良し悪しは異なっており,一概にどの移動相が良いとは言えなかったが,最も感度の小さい SDZ の S/N 比が最大となった移動相①を用いることにした. また, カラム①の方がカラム②に比べて感度が高かったため,カラム①を用いることにした（Table 2）.

希釈倍率については,移動相①において SDZ ピークが S/N≧10 となる濃度範囲を求めたところ, 20ng/ml 以上となり, 定量限界は 0.01ppm(一斉法 I においては 50ng/ml に相当)であるので, 2.5 倍まで希釈可能であることがわかった.

Table 2.　LC-MS/MS 測定条件

移動相	
A 液；0.05%ギ酸	
B 液；アセトニトリル　　グラジェント溶出	
試験液溶媒	
アセトニトリル-水(1:9)	
分析カラム	
資生堂社製 CAPCELLCORE C18 2.1mmi.d.×150mm	
測定温度	：40℃
注入量	：5μl
流速	：0.2ml/min
イオン化モード	：ESI ポジティブモード

1.2　抽出操作の検討

1.2.1　脱脂操作

LC-MS/MS 測定から試験液溶媒を①アセトニトリル-水(1:9)に変更することにしたが，一斉法Ⅰにおいては，脱脂操作に用いた溶媒がそのまま試験液となるため，脱脂操作から溶媒の変更が可能かどうかTable 1 に示す 4 種類の溶媒により検討した．その結果，水が多くなるにつれて夾雑成分が n-ヘキサン層に分配しにくくなることがわかり，一斉法Ⅰどおりのアセトニトリル-水(4:6)が最も良好であった．

1.2.2　希釈倍率

本検討には，新たな精製操作を加えたわけではないが，試験液を希釈することにより，試験液中の夾雑成分の割合を減らすことができた．

そこで，検討した条件により標準液を測定したところ，定量限界相当の標準液において 2.5 倍までの希釈が可能であることが分かったが，前述のⅡ-3 のとおり，マトリックス成分の影響を考慮して 2 倍に希釈することにした．

また，抽出操作において，最終試験液の量を 2 倍にすることが最も簡単であるが，脱脂工程における液液分配の際の層分離が不十分であることから，n-ヘキサンによる脱脂効果を上げるため，加える溶媒を 2ml，アセトニトリル飽和-n-ヘキサンを 1ml とし，遠心分離後にアセトニトリル-水層を 1ml 分取し，再度乾固してアセトニトリル-水(1:9)1ml に溶解し試験液とした（Fig.1）．

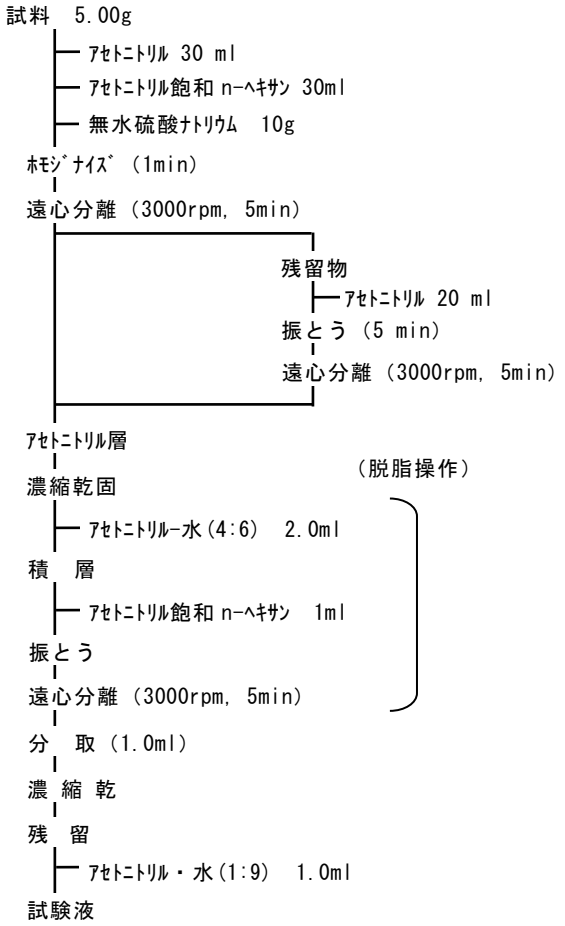


Fig.1.　「検討法」フローシート

2 妥当性評価

妥当性評価実施結果を Table 3 に示した．

2.1　各食品における「検討法」の効果

カラム①において「検討法」における妥当性評価の結果を一斉法Ⅰによる結果と比較した場合，一斉法Ⅰにおいては，ガイドラインに不適合であった動物薬が各食品では異なるものの，食鳥肉で 4 成分，他の 3 食品では 2 成分ずつあったのに対し，「検討法」ではすべての食品，動物薬でガイドラインに適合する結果が得られた．

2.2　カラムの比較

また，「検討法」による試験液を各々のカラムで測定した結果を比較すると，表面多孔性充填剤であるカラム①は，今回対象としたすべての動物薬がガイドラ

インに適合するという結果だった.

一方,全多孔性充填剤であるカラム②においては不適合となった動物薬成分が,鶏卵,生乳及び食鳥肉においてそれぞれ 2, 5 及び 1 成分あり,パラメータとしては真度や併行及び室内精度が適合していなかった.

カラム①及び②における充填剤の粒子径はそれぞれ 2.7μm及び 5μmであり,カラム①の方が小さいため,カラムの分離等の指標となる理論段数はカラム①の方が大きくなり,カラムの分離がよくなる.

また,表面多孔性充填剤(カラム①)はその構造から目的成分の拡散距離が短くなるため,理論段数は全多孔性充填剤(カラム②)の 1.5 倍になるといわれている.

以上のことから,カラム①の性能(ピークの分離等)が良くなり,イオン化の影響を受けにくくなるため,ガイドラインに適合する結果が得られたと考えられる.

Table 3. カラム①及び②により測定を実施した妥当性評価の結果((a);「検討法」,(b);一斉法Ⅰ)

動物薬成分	鶏卵 残留基準値(ppm)	鶏卵 試験法 (a) ①	鶏卵 試験法 (a) ②	鶏卵 試験法 (b) ①	養殖魚 試験法 (a) ①	養殖魚 試験法 (a) ②	養殖魚 試験法 (b) ①	生乳 残留基準値(ppm)	生乳 試験法 (a) ①	生乳 試験法 (a) ②	生乳 試験法 (b) ①	食鳥肉(鶏肉) 残留基準値(ppm)	食鳥肉(鶏肉) 試験法 (a) ①	食鳥肉(鶏肉) 試験法 (a) ②	食鳥肉(鶏肉) 試験法 (b) ①
TBZ	和として	○	○	○	○	○		和として	○	○	○	和として	○	○	×
5-OH-TBZ	0.1	○	×	×	○	○		0.10	○	○	×	0.05	○	○	○
PYR	含有せず	○	×	×	○	○		含有せず	○	○		0.05	○	○	×
SDZ	0.02	○	○	○	○	○	○	0.07	○	×	×	0.1	○	○	○
SMXZ	含有せず	○	○	○	○	○		含有せず	○	○	○	0.02	○	○	○
OXA	含有せず	○	○	○	○	○	○	含有せず	○	○	○	0.03	○	○	×
SMR	含有せず	○	○	○	○	○	×	含有せず	○	×	○	含有せず	○	○	○
OMP	含有せず	○	○	○	○	○	○	含有せず	○	○	○	0.1	○	○	○
SDD	0.01	○	○	○	○	○	×	0.025	○	○	○	0.10	○	○	○
SMMX	含有せず	○	○	○	○	○	○	含有せず	○	×	○	0.1	○	○	○
SCPD	含有せず	○	○	○	○	○		含有せず	○	×		含有せず	○	○	○
TMP	0.02	○	○	○	○	○	○	0.05	○	○	○	0.05	○	○	○
SQX	0.01	○	○	○	○	○	○	0.01	○	×	○	0.05	○	○	○
SDMX	1	○	○	○	○	○	○	0.02	○	○	○	0.05	○	○	○
FBZ	0.40	○	○	○	○	○		0.01	○	○	○	0.20	○	×	×

○;ガイドラインに適合成分, ×;ガイドラインに不適合成分, 斜線;妥当性評価未実施成分

Ⅳ まとめ

一斉法Ⅰに検討を加えた「検討法」により,4 食品,動物薬 14 項目(15 成分)について妥当性評価を実施した.「検討法」は n-ヘキサンによる脱脂効果を上げ,試験液を 2 倍に希釈することにより,夾雑成分の影響を減らすことを目的とした試験法である.この方法を用いることによって,LC-MS/MS 測定におけるイオン化の影響を抑えることができ,特に表面多孔性充填剤(コアシェル型)カラム①を用いた場合,4 食品,15 成分すべてにおいて妥当性評価に適合する結果が得られた.

今後は,脂質成分の多い食品やその部位についても「検討法」による妥当性評価を実施し,必要に応じて検討法に改良を加えながら,検査対象食品としていきたい.

Ⅴ 参考文献

1)「食品に残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法について」(平成 17 年 1 月 24 日付け食安発第 0124001 号厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知)

2)「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドライン」(平成 19 年 11 月 15 日付け食安発第 1115001 号厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知)

抄　録

１）他誌掲載論文

接触者健康診断における高齢者に対するインターフェロン-γ遊離試験の有用性の検討

瀬戸 順次，阿彦 忠之

結核 89:503-508,2014

〔目的〕接触者健診における高齢者に対するQFT-3G 検査の有用性を検討すること．〔方法〕2010 年9月～2013 年5 月，山形県での結核患者の濃厚接触者等2,420 人に対して実施したQFT-3G 検査成績を分析し，QFT-3G 陽性者のLTBI 届出の有無および結核発病状況を調査した．〔結果〕QFT-3G陽性率は7.3%（95% CI 6.2 ～ 8.3%）であり，年齢階級の上昇とともに陽性率が高くなる傾向が確認された（P＜0.001）．〔考察〕QFT-3G陽性率は高齢者（60 歳以上）で高い傾向を認めたものの，結核推定既感染率に対して大きく下回っており，過去の古い結核感染歴があっても必ずしもQFT-3G 陽性にはならないと考えられた．さらに，QFT-3G 陽性者の分析から，60 歳代の2 分の1 ，70 歳代の3 分の1 ，80 歳以上の4 分の1 程度は最近の結核感染と推定された．結論として，高齢者のQFT-3G 検査結果の解釈は結核患者との接触状況等を踏まえ慎重に行う必要があるものの，結核患者との濃厚接触歴のある高齢者に対してQFT-3G 検査を実施することは，潜在性結核感染症のスクリーニングとしては意義があると考えられた．

Epidemiological information regarding the periodic epidemics of influenza C virus in Japan (1996-2013) and the seroprevalence of antibodies to different antigenic groups.

Matsuzaki Y., Sugawara K., Abiko C, Ikeda T., Aoki Y., Mizuta K., Katsushima N., Katsushima F., Katsushima Y., Itagaki T., Shimotai Y., Hongo S., Muraki Y. and Nishimura H.

J.Clin.Virol. 61(1):87-93,2014.

BACKGROUND:
Although influenza C virus is widely distributed throughout the world, epidemiological information, based on long-term surveillance, has not yet been acquired.

OBJECTIVES:
To clarify the epidemiological features of influenza C virus infection, and to examine whether the prevalence of the antibodies against the influenza C virus is associated with the epidemics.

STUDY DESIGN:

Between 1996 and 2013, 36,973 respiratory specimens were collected from two pediatric outpatient clinics in Yamagata, Japan. The specimens were examined for the presence of influenza C virus using cell culture methods. Isolated viruses were antigenically analyzed. The differences in seropositivity, with respect to the different antigenic groups, were examined using serum samples collected in 2001 and 2011 by a hemagglutination inhibition assay.

RESULTS:
Influenza C viruses were isolated from 190 specimens during an 18-year period. Most influenza C viruses were isolated from winter to early summer in even-numbered years, and the frequency of virus isolation per year ranged from 0.43% to 1.73%. An antigenic analysis revealed that the dominant antigenic groups were the C/Yamagata/26/81 from 1996 to 2000, the C/Kanagawa/1/76 in 2002 and 2004, and the C/Sao Paulo/378/82 from 2006 to 2012. When compared to the other antigenic groups, the seroprevalence of the C/Sao Paulo/378/82 group was lower in 2001 for individuals older than 5 years and was higher in 2011 in individuals younger than 40 years.

CONCLUSIONS:
The results from our study suggest that epidemics of influenza C virus infection periodically occur and the replacement of the dominant antigenic group may be caused by immune selection within older children and/or adults in the community.

Molecular epidemiology of enterovirus 71 strains isolated from children in Yamagata, Japan between 1990 and 2013.

Mizuta K., Aoki Y., Matoba Y., Yahagi K, Itagaki T., Katsushima F., Katsushima Y., Ito S., Hongo S., and Matsuzaki Y.

J.Med.Microbiol. 63:1356-1362,2014.

Enterovirus 71 infections have become a major public issue in the Asia-Pacific region due to the large number of fatal cases. To clarify the longitudinal molecular epidemiology of enterovirus 71 (EV71) in a community, we isolated 240 strains from children, mainly with hand-foot-and-mouth diseases, between 1990 and 2013 in Yamagata, Japan. We carried out a sequence analysis of the VP1 region (891 bp) using 223 isolates and identified six subgenogroups (B2, B4, B5, C1, C2 and C4) during the study period. Subgenogroups C1 and B2 were found only between 1990 and 1993 and have not reappeared since. In contrast, strains in subgenogroups C2, C4 and B5 appeared repeatedly with genomic variations. Recent reports from several local communities in Japan have suggested that identical predominant subgenogroup strains, which have also been found in the Asia-Pacific region, have been circulating in a wide area in Japan. However, it is likely that there is a discrepancy between the major subgenogroups circulating in the Asia-Pacific region and those in Europe. It is necessary to continue the analysis of the longitudinal epidemiology of EV71 in local communities, as well as on regional and global levels, to develop strategies against severe EV71 infections.

Detection of the human coronavirus 229E, HKU1, NL63 and OC43 between 2010 and 2013 in Yamagata, Japan.

Matoba Y., Abiko C., Ikeda T., Aoki Y., Suzuki Y., Yahagi K., Matsuzaki Y., Itagaki T., Katsushima F., Katsushima Y., and Mizuta K.

Jpn.J.Infect.Dis. 68:138-141,2015.

The available literature on human coronaviruses (HCoVs) in Japan is limited to epidemiological studies conducted over a maximum of 1 year. We conducted a 4-year study of HCoVs by analyzing 4,342 respiratory specimens obtained in Yamagata, Japan, between January 2010 and December 2013. A pan-coronavirus reverse transcription-PCR screening assay was performed, and all HCoV-positive specimens were subsequently confirmed by sequencing of the PCR products. We detected in 332 (7.6%) HCoV strains during the study period, comprising 133 (3.1%) HCoV-NL63, 83 (1.9%) HCoV-HKU1, 78 (1.8%) HCoV-OC43, and 38 (0.9%) HCoV-229E strains. HCoV detection per year ranged from 3.5% to 9.7%. HCoVs were detected mainly in winter, with January (28.5%) and February (25.3%) 2011 and December 2012 (14.6%) being the only months in which HCoV-NL63 detection per month exceeded 10.0%. HCoV-HKU1 displayed clear biennial peaks in January (18.3%) and February (10.7%) 2010 and in February (18.8%) and March (14.7%) 2012. The peak detection of HCoV-OC43 was 13.6% in November 2010, while that of HCoV-229E was 10.8% in March 2013. Our results indicated that there may be annual variations in the circulation of individual HCoV strains. Further long-term surveillance is necessary to clarify HCoV prevalence and circulation patterns in Japan.

Picornavirus-like cytopathic effects on RD-18S cell lines were induced by human coronavirus 229E not picornaviruses,

Matoba Y., Aoki Y., Tanaka S., Yahagi K., Itagaki T., Matsuzaki Y., and Mizuta K..

Jpn.J.Infect.Dis. 68:78-79,2015.

抄録なし

Analysis of the population genetics of clades of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7/H- isolated in three areas in Japan.

Hirai S, Yokoyama E, Etoh Y, Seto J, Ichihara S, Suzuki Y, Maeda E, Sera N, Horikawa K, and Yamamoto T.

J Appl Microbiol. 117:1191-7,2014

AIMS:
The genetic differences of enterohaemorrhagic Escherichia coli O157 (O157) strains isolated from humans in three widely-separated areas in Japan were analysed to provide information on possible geographic aspects of O157 pathogenicity.

METHODS AND RESULTS:
Epidemiologically unlinked O157 strains were isolated in Chiba (300 strains), Fukuoka (260 strains) and Yamagata (81 strains) prefectures. These strains were classified in clades by single nucleotide polymorphism in seven loci and lineage-specific polymorphism assay-6, and differences between the strains in each clade were compared by population genetic analyses using the IS-printing system. Analysis of the clades from the three areas showed linkage disequilibrium of the strains in each clade. Comparison of the genetic differences of strains from the three areas in each clade, from calculated ΦPT values, indicated that the strains in each clade were the same population in all three areas, except possibly the clade 12 strains.

CONCLUSIONS:
Population genetics analyses confirmed that the distribution of O157 strains in the clades isolated in three areas in Japan were similar and stable.

SIGNIFICANCE AND IMPACT OF THE STUDY:
The pathogenicity of O157 strains infecting humans was comparable due to the similar, stable geographic distribution of O157 clades.

Epitope mapping of the hemagglutinin molecule of A/(H1N1)pdm09 influenza virus by using monoclonal antibody escape mutnats.

Matsuzaki Y., Sugawara K., Nakauchi M., Takahashi Y., Onodera T., Tsunetsugau-Yokota Y., Matsumura T., Ato M., Kobayashi K., Shimotai Y., Mizuta K., Hongo S., Tashiro M., and Nobusawa E.

J.Virol.88:12364-12373,2014.

Abstract
We determined the antigenic structure of pandemic influenza A(H1N1)pdm09 virus hemagglutinin (HA) using 599 escape mutants that were selected using 16 anti-HA monoclonal antibodies (MAbs) against A/Narita/1/2009. The sequencing of mutant HA genes revealed 43 amino acid substitutions at 24 positions in three antigenic sites, Sa, Sb, and Ca2, which were previously mapped onto A/Puerto Rico/8/34 (A/PR/8/34) HA (A. J. Caton, G. G. Brownlee, J. W. Yewdell, and W. Gerhard, Cell 31:417-427, 1982), and an undesignated site, i.e., amino acid residues 141, 142, 143, 171, 172, 174, 177, and 180 in the Sa site, residues 170, 173, 202, 206, 210, 211, and 212 in the Sb site, residues 151, 154, 156, 157, 158, 159, 200, and 238 in the Ca2 site, and residue 147 in the undesignated site (numbering

begins at the first methionine). Sixteen MAbs were classified into four groups based on their cross-reactivity with the panel of escape mutants in the hemagglutination inhibition test. Among them, six MAbs targeting the Sa and Sb sites recognized both residues at positions 172 and 173. MAb n2 lost reactivity when mutations were introduced at positions 147, 159 (site Ca2), 170 (site Sb), and 172 (site Sa). We designated the site consisting of these residues as site Pa. From 2009 to 2013, no antigenic drift was detected for the A(H1N1)pdm09 viruses. However, if a novel variant carrying a mutation at a position involved in the epitopes of several MAbs, such as 172, appeared, such a virus would have the advantage of becoming a drift strain.

IMPORTANCE:
The first influenza pandemic of the 21st century occurred in 2009 with the emergence of a novel virus originating with swine influenza, A(H1N1)pdm09. Although HA of A(H1N1)pdm09 has a common origin (1918 H1N1) with seasonal H1N1, the antigenic divergence of HA between the seasonal H1N1 and A(H1N1)pdm09 viruses gave rise to the influenza pandemic in 2009. To take precautions against the antigenic drift of the A(H1N1)pdm09 virus in the near future, it is important to identify its precise antigenic structure. To obtain various mutants that are not neutralized by MAbs, it is important to neutralize several plaque-cloned parent viruses rather than only a single parent virus. We characterized 599 escape mutants that were obtained by neutralizing four parent viruses of A(H1N1)pdm09 in the presence of 16 MAbs. Consequently, we were able to determine the details of the antigenic structure of HA, including a novel epitope.

The dominant antigenic group of influenza C infections changed from C/SaoPaulo/378/82-lineage to C/Kanagawa/1/76-lineage in Yamagata, Japan in 2014.

Tanaka S., Aoki Y., Matoba Y., Yahagi K., Mizuta K., Itagaki T., Katsushima F., Katsushima Y., and Matsuzaki Y.

Jpn.J.Infect.Dis. 68:166-168,2015.

抄録なし

山形県における飼い猫のジフテリア毒素原性 *Corynebacterium ulcerans* 感染状況調査

瀬戸 順次，安孫子 千恵子，小宮 貴子，山本 明彦

日獣会誌 67：613-616, 2014

人におけるジフテリア毒素原性*Corynebacterium ulcerans*（*C. ulcerans*$^{tox+}$）感染の可能性の有無を把握することを目的として，2012 年5～7 月に山形県全域の飼い猫を対象に*C. ulcerans*$^{tox+}$感染状況調査を実

施した．血清ジフテリア抗毒素価測定の結果，猫187 匹中2 匹（1.1%）から抗毒素を検出した（0.651IU/m*l* 及び0.230IU/m*l*）．結論として，山形県内の一般家庭に飼育されている猫の中にジフテリア抗毒素が検出される猫が存在することが明らかとなり，われわれに身近な「飼い猫」から人への*C. ulcerans*$^{tox+}$感染の可能性が示唆された．

山形県で 2004 年から 2013 年の 10 年間に分離した *Mycoplasma pneumoniae* のマクロライド耐性遺伝子変異および *p1* 遺伝子型解析

鈴木 裕，瀬戸 順次，板垣 勉，青木 敏也，安孫子 千恵子，松嵜 葉子

感染症学雑誌 89:16-22, 2015.

山形県で 2004 年から 2013 年の 10 年間に分離された *M. pneumoniae* 358 株を対象として，マクロライド系抗菌薬（以下，マクロライド）耐性遺伝子変異および *p1* 遺伝子型解析を実施した．その結果，*M. pneumoniae* にマクロライド耐性をもたらす 23S リボゾーマル RNA（以下，rRNA）ドメインⅤの点変異を 6 種類検出した（A2063G 変異 81 株，A2063T 変異 43 株，A2063C 変異 1 株，A2064C 変異 1 株，C2617G 変異 4 株および C2617A 変異 1 株）．変異株は 2009 年以前には 2 株のみであったが，2009 年は A2063T 変異を多く検出し，2010 年以降は A2063G 変異が増加した．2009 年以降の年間の変異検出率は 20.4%（2011 年）から 76.4%（2009 年）の間で推移した．

また，本県で分離された *M. pneumoniae* の *p1* 遺伝子型は，1 型（278 株）および 3 種類の 2 型亜種（2a 型〈10 株〉，2b 型〈5 株〉および 2c 型〈65 株〉）に分けられた．2012 年以前は 1 型菌が多く，年間の 1 型菌の割合は 85.2%（2004 年）から 100%（2008 年，2009 年）で推移したが，2012 年以降 2 型菌亜種の割合が増加し，（2012 年；26.5%，2013 年；66.1%），本県において流行の主流を成す *M. pneumoniae* の *p1* 遺伝子型が 1 型から 2 型亜種に置き換わっている可能性が示された．

さらに，2012 年以降に本県で分離された *M. pneumoniae* のうち，*p1* 遺伝子 1 型菌は高率にマクロライド耐性遺伝子変異を保有していた（2012 年；65.1%，2013 年；95.2%）のに対して， 2 型菌亜種からは遺伝子変異が検出されず，本県では 2 型菌亜種のマクロライド耐性遺伝子変異の獲得が進んでいないことが示唆された．

A case of pneumonia caused by *Legionella pneumophila* serogroup 12 and treated successfully with imipenem.

Nishizuka M, Suzuki H, Ara T, Watanabe M, Morita M, Sato C, Tsuchida F, Seto J, Amemura-Maekawa J, Kura F, Takeda H.

J Infect Chemother. 20:390-3, 2014

The patient was an 83-year-old man hospitalized for Haemophilus influenzae pneumonia, who developed recurrent pneumonia after improvement of the initial episode. Legionella pneumophila serogroup 12 was isolated from the sputum, accompanied by increased serum antibody titers to L.

pneumophila serogroup 12. Therefore, the patient was diagnosed as having Legionella pneumonia caused by L. pneumophila serogroup 12. Case reports of pneumonia caused by L. pneumophila serogroup 12 are rare, and the case described herein is the first report of clinical isolation of this organism in Japan. When the genotype was determined by the protocol of The European Working Group for Legionella Infections (Sequence-Based Typing [SBT] for epidemiological typing of L. pneumophila, Version 3.1), the sequence type was ST68. Imipenem/cilastatin therapy was found to be effective for the treatment of Legionella pneumonia in this patient.

Clonality and Micro-Diversity of a Nationwide Spreading Genotype of Mycobacterium tuberculosis in Japan.

Wada T., Iwamoto T., Tamaru A., Seto J. Ahiko T., Yamamoto K., Hase A., Maeda S. and Yamamo T.

PLoS One. 10: e0118495. 2015

Mycobacterium tuberculosis transmission routes can be estimated from genotypic analysis of clinical isolates from patients. In Japan, still a middle-incidence country of TB, a unique genotype strain designated as 'M-strain' has been isolated nationwide recently. To ascertain the history of the wide spread of the strain, 10 clinical isolates from different areas were subjected to genome-wide analysis based on deep sequencers. Results show that all isolates possessed common mutations to those of referential strains. The greatest number of accumulated single nucleotide variants (SNVs) from the oldest coalescence was 13 nucleotides, indicating high clonality of these isolates. When an SNV common to the isolates was used as a surrogate marker of the clone, authentic clonal isolates with variation in a reliable subset of variable number of tandem repeat (VNTR) genotyping method can be selected successfully from clinical isolates populations of M. tuberculosis. When the authentic clones can also be assigned to sub-clonal groups by SNVs derived from the genomic comparison, they are classifiable into three sub-clonal groups with a bias of geographical origins. Feedback from genomic analysis of clinical isolates of M. tuberculosis to genotypic markers will be an efficient strategy for the big data in various settings for public health actions against TB.

２）学会発表

山形におけるエンテロウイルス 71 型の分子疫学（1990～2013 年）

水田 克巳，松嵜 葉子，本郷 誠治

第 55 回臨床ウイルス学会，2014 年 6 月 14-15 日，於札幌

【目的】

エンテロウイルス７１型（EV７１)は，小児の夏かぜ，手足口病の病原体であり，予後の良い疾患であった．しかし，２０世紀終盤から，主にアジア地域で，脳炎などの合併症による多数の死者がでるなど，公衆衛生上重要な課題の１つとなっている． 我々は，EV７１山形分離株を多数保有しているため，これらを用いた疫学研究を実施することで，EV71 感染症対策に貢献することを目指している． 本学会では，１９９０～２０１３年の分離株解析結果について発表する．

【材料と方法】

手足口病等の検体からマイクロプレート法により，１９９０～２０１３年に２２５株のＥＶ７１を分離した．うち１４７株について，既報告の方法によりＶＰ１の配列（８９１ｂｐｓ）を解析，遺伝子型を決定した．

【結果と考察】

調査期間にＢ２，Ｂ５，Ｂ５，Ｃ１，Ｃ２，Ｃ４の６つの遺伝子型を確認した．山形という１つのコミュニティで経時的変化をみると，１つまたは２つの遺伝子型が入れ替わりながら変遷していた．Ｃ２，Ｃ４，Ｂ５は進化しながら，繰り返し出現した．

２００９～２０１０年に山形で観察したＣ２の配列は，大阪市や横浜市で検出した株や２００８年のシンガポール株に近く，ＥＶ７１が広く国内・アジア地域で広がっていることを示唆していると考えられる．その一方，２１世紀のアジア地域で主体となっている遺伝子型の１つにＣ４があるが，ヨーロッパ地域ではＣ１またはＣ２の報告がほとんどであり，またＢ５はアジア地域のみから報告されるなど，両者で主流となっている遺伝子型に違いがあることが明らかになりつつある．

なお，本研究は，東北乳酸菌研究会から補助を受けて実施した．

[非会員研究協力者：板垣勉（山辺こどもクリニック），勝島史夫・勝島由利子（勝島小児科医院），青木洋子・的場洋平・矢作一枝・阿彦忠之（山形衛研）]

宿主プロテアーゼ TMPRSS2 は，急性呼吸器感染症ウイルスの生体内活性化酵素である

竹田 誠，中島 典子，水田 克巳

第 55 回臨床ウイルス学会，2014 年 6 月 14-15 日，於札幌

多くの呼吸器ウイルスは，プロテアーゼによってウイルス膜タンパクが開裂することによって，はじ

めて感染力を持つ．呼吸器上皮に発現している II 型膜貫通型セリンプロテアーゼ TMPRSS2 の遺伝子をノックアウトしたマウス（TMPRSS2 KO マウス）の肺内ではインフルエンザウイルスの増殖性は非常に低く，病原性がほとんど無くなっていた．中国で発生している H7N9 インフルエンザウイルスも，TMPRSS2 KO マウスの肺内では，増殖性が極端に低下していた．このことは，TMPRSS2 がインフルエンザウイルスの病原性発現に必須の宿主因子であることを示している．インフルエンザウイルスの膜タンパク（HA タンパク）の他に，パラインフルエンザウイルスの F タンパク，ヒトメタニューモウイルスの F タンパク，コロナウイルスの S タンパクなどが，TMPRSS2 で開裂を受け，活性化することをわれわれは明らかにした．中東呼吸器症候群（MERS）コロナウイルスも，TMPRSS2 で活性化することが示されている．これらの結果は，急性呼吸器感染症ウイルスの多くのものが，増殖のために TMPRSS2 を利用していることを示しており，TMPRSS2 の活性阻害剤が，新興呼吸器感染症ウイルスを含む広範囲の呼吸器ウイルスに効く抗ウイルス剤になる可能性を示している．

IS-printing を用いた腸管出血性大腸菌 0157 の clade 推定法の確立

平井 晋一郎，横山 栄二，江藤 良樹，瀬戸 順次，市原 祥子，鈴木 裕，前田 詠里子，堀川 和美

第 35 回日本食品微生物学会，2014 年 9 月 18-19 日，於大阪

【目的】腸管出血性大腸菌 0157（O157）は，食中毒の原因菌として，感染者数及び症状の重篤性から重要な地位を占めている．O157 は進化系統群の clade に型別され，clade 間では病原性の強さに差があると考えられている．従って，特定の地域における clade の分布状況を把握することは，食中毒対策に有効だと思われる．しかしながら，clade の型別には，ゲノム上の 32 領域での一塩基多型の解析が必要であり，容易に行えない．一方，我々は，clade と Insertion Sequence（IS）*629* 保有パターンに関連性があることを報告した．そこで，本研究では，その関連性を利用して，O157 菌株の IS*629* 保有パターンから clade を推定する方法の確立を目指す．

【方法】1996 ～2013 年に，千葉県で分離された感染者由来 O157 菌株の内，疫学的関連性が確認されなかった 1064 株を用いて，IS-printing（IS 法）及び clade 型別を行い，各 clade の IS*629* 保有パターンのデータベースを作成する．このデータベースを基に相対的相似度（*J. Gen. Microbiol.* 1973. 77. 317-330）の算出式を得る．次に，1996～2012 年に福岡県で，2002～2007 年に山形県で発生した O157 感染症の内，疫学的関連性がない O157 菌株について，IS 法を行う．IS*629* 保有パターンから相対的相似度を算出して clade を推定する．この推定の結果と clade 型別の結果の一致率から推定精度を求める．

【結果】千葉県，福岡県及び山形県の全ての地域で，clade 2，3，6，7，8 及び 12 が優勢に分布しており，これらの合計は全体の 90%以上であった．相対的相似度の算出式を利用し，福岡県及び山形県で分離された O157 菌株の clade を推定すると，どちらの地域においても，clade 3，6 及び 8 の推定精度は，ほぼ 100%であり，clade 7 の推定精度は，88%であった．一方で，clade 2 及び 12 の O157 菌株に対する推定精度は，福岡県では 95%程度であったのに対して，山形県では 80%程度と低かった．しかし，推定を誤った山形県の O157 菌株は，clade 2 が 17 株中 3 株であり，clade 12 が 5 株中 1 株と少なかった．これら菌株の IS*629* 保有パターンは，clade 特有の保有パターンとは異なっていた．

【考察】IS*629* の保有パターンによる clad 推定法は，確率的な手法であるため，clade 特有の保有パ

ターンを持たない 0157 菌株に対しては，推定は誤る可能性がある．しかしながら，この様な菌株の全体に占める割合は小かった．従って，本研究により IS 法による clade 推定法の有効性が示された．

地方衛生研究所では 0157 による散発的集団食集毒の早期探知のために，IS 法が広く用いられている．IS 法を利用した clade の推定法を，他自治体の地方衛生研究所でも実施することで，日本各地の clade の分布状況の把握が可能になり，0157 の食中毒対策に活用できると思われる．

新興病原体 Escherichia albertii のゲノムおよび疫学解析

大岡 唯祐，勢戸 和子，小野 英俊，河野 喜美子，小林 秀樹，吉野 修司，瀬戸 順次，
山口 敬治，古川 真斗，徳岡 英亮，井口 純，薗牟田 直子，原田 誠也，西順 一郎，
桂 啓介，小椋 義俊，林 哲也

第 35 回日本食品微生物学会，2014 年 9 月 18-19 日，於大阪

【目的】*Escherichia albertii* (*E.albertii*)は，近年同定された大腸菌近縁の腸管感染症起因菌である．我々は，国内外で発生した食中毒の検査において非典型的な大腸菌として分離された株の中に本菌が数多く存在し，本菌がヒトでも重要な下痢症起因菌であることを示した．また，本菌に”志賀毒素産生菌”が含まれ，食品衛生法だけでなく，感染症法でも注意すべき菌種であることを示した（1，2）．本菌の病原因子については， LEE 領域にコードされる 3 型分泌系 (T3SS)が唯一同定されているが，その病原機構は未だ不明な点が多 い．また本菌は，分離例が少なく，基本的な性状が未確定であるため，大腸菌と識別できる確実な診断疫学マーカーも確立されていない．その上，感染源や自然宿主に関する研究もほとんど進んでいない．本研究では，下痢患者及び動物から分離した *E.albertii* 29 株のゲノム解析を行い，本菌のゲノムの特徴を明らかにするとともに，診断疫学マーカーを作製して，家畜等の保菌状況を調査した．

【方法】ゲノム解析及びゲノム比較解析：*E.albertii* 29 株について，次世代シーケンサを用いて概要配列を取得した．そのうちの3株は，全ゲノム配列を取得し，本菌種内及び大腸菌属の各菌種間の比較解析を行った．*E.albertii* 種特異的プライマーの作製：*E.albertii* 29 株のゲノム情報を基に，種特異的なprimer pair を設計した．家畜及び野鳥での *E.albertii*の保菌調査：食鳥及び食肉処理場に持ち込まれた家畜の糞便，さらに野鳥の糞便について PCR 法によるスクリーニングを実施した．陽性検体から菌を分離し，系統や病原因子を調べた．

【結果と考察】*E. albertii* 29 株の平均ゲノムサイズは約 4.7Mb であり，病原性大腸菌と比べて小さいこと，かつゲノム全体での相同性からも他の大腸菌属と明らかに別菌種であることを示した．また，本菌のゲノムの特徴として，T3SS の他に線毛や Cdt 毒素などの病原因子や代謝系など，多くの診断疫学マーカー候補を同定した．また，大腸菌 O 血清との凝集反応及び大腸菌 O 抗原コード領域との比較から，O 抗原についても赤痢菌などと同様，独自の進化を遂げてことが推測され，各種*E.albertii*株に対する O 抗原血清を作製することで，検査にも応用できる可能性が示唆された．保菌状況に関しては，ウシでは 105 検体(21 農場各1~10 検体)中1 検体のみ，ブタでは100 検体(10 農場各 10 検体)中 12 検体(5 農場)が陽性となり，特にブタでの保菌率が高かった．また，ニワトリは，ブロイラー 200 検体(20 農場各10 検体)，地鶏80 検体(4 農場各20 検体)の検査を行い，ブロイラーでは

1 検体，地鶏では 26 検体(4 農場)が陽性となり，屋外飼育での汚染の可能性が示唆された．さらに，汚染源の可能性として，現在までに，野鳥糞便約 70 検体を検査したが，陽性検体は得られていない．今後は，野鳥・野生動物など解析対象を増やし，自然宿主や感染源の解明を行う．

【参考文献】1.T.Ooka et al. Emerg.Infect.Dis.,18(3):488-492,2012.2. T. Ooka et al. Emerg.Infect.Dis.,19(1):144-146,2013.

地域での集団感染事例から学ぶ

山田 敬子，稲毛 稔，平間 紀行，小坂 太祐，中野 寛之，武田 宰，瀬戸 順次，阿彦 忠之

第 90 回日本結核病学会総会，2015 年 3 月 27-28 日，於長崎

はじめに：山形県では平成 21 年度から，原則として菌陽性結核患者全例の結核菌株に対して VNTR(24 領域)分析を実施している．既に阿彦らは当学会にて，その有用性や活用について報告しているが，今回，同分析の結果から，約 2 年前に「肺がん」で死亡したと診断された事例が結核の院内感染源と推定され，地域での感染拡大防止策を実施できたので報告する．

経過：平成 25 年 6 月，A 病院から 90 代女性(bⅡ2，吸引痰 G2) ＜事例１＞の届け出があった．当初から主治医が結核を疑っていたため，事例１と接触した看護師等は N95 マスクを装着して対応していたが，接触者健診を実施したところ 3 名が QFT-3G(以下，QFT)陽性であった．主治医が念のために，同じ病棟で事例 1 に接触していない看護師等にも順次 QFT を実施したところ，新たな陽性者が出たため保健所に一報を入れ，院内感染対策委員会での検討を依頼した．その矢先，平成 26 年 1 月の定期健康診断の胸部 X 線検査で，事例 1 が入院していた病棟に勤務する 2 名の看護助手＜事例 2・3＞に異常影が認められ，紹介先の B 病院で肺結核と診断された．但し，事例 2 は 1Ⅲ1 気管支洗浄液集菌法 1+，事例 3 は rⅢ1 喀痰培養陽性で，ともに咳症状は全くなく，両者の間での感染は考えにくい状況であった．事例 2 は平成 25 年 9 月に実施した QFT が陰性で，平成 26 年 1 月に陽性となったため，保健所では，A 病院に対し，平成 25 年 9 月前後に同病院の当該病棟に入院した患者（死亡例を含む）の中から結核が疑われる事例のリストアップを依頼した．一方，定期健診で異常なしとされた職員を含め，新たな陰影が出現した者が他にいないかを確認するため，全職員の胸部 X 線フイルムの再読影を行った．また，直ちに A 病院の院内感染対策委員会に出席し対策の説明を行うとともに，全職員への講話や QFT 陽性職員 11 名への個別説明を実施した．その後，同年 2 月末に確定した VNTR 分析結果から，事例 1～3 の他に，同地域に居住し平成 25 年 8 月に肺結核(bⅡ2，G2 号)と診断された 60 代女性＜事例 4＞の VNTR 一致が明らかになった．事例 4 は A 病院の通院歴が全くないうえに地域での接点も見いだせなかったが，担当保健師の聞き取りにより，事例 4 の母(80 代女性)＜事例 5＞が平成 24 年に同病院で死亡していた事実が判明したため，事例 4 の了解のもと，A 病院に保管されていた事例 5 の胸部 X 線写真やカルテを過去に遡って確認した．その結果，約 60 年前に結核の治療歴があったこと，および胸部 X 線画像の特徴と経過から，肺結核で死亡したものと推察された．

事例 5(推定感染源)の状況：本例は，平成 22 年 6 月に胸部の結節影が増大したとのことで，A 病院から C 総合病院に紹介され，気管支鏡検査と腫瘍マーカー(シフラ)の上昇から肺がん疑いとの診断を受けていた．約半年間 C 病院で経過観察ののち，高齢のため積極的な治療は行わないという希望から A 病院に定期通院を続けていたが，平成 24 年 8 月，自宅で倒れているところを家人に発見され救急入院となっ

た．入院時の胸部 X 線写真と CT 所見をもとに，放射線科の専門医が「末期の肺がん」と診断したため，当時の主治医がターミナルケアの目的でステロイドを投与したところ，急激に病状が悪化し死亡していた．頻回な吸引が必要であったことや，夏場であったため吸引時のマスク装着が徹底していなかったこと，看護助手は口腔ケアを担当していたこと等が疫学調査から明らかになった．なお，事例 1 は同時期に同病棟に入院していたが，病状が重く部屋を出ておらず，また，病棟内の各部屋が独立換気だったこと，唯一入院期間中に実施した CT 検査室での接点が疑われたが，事例 1 が先に検査を行っており，検査室内での 2 次感染は否定的で感染状況は不明であった．

地域での接触者健診等：既に事例 5 の死亡後 2 年近くが経過していたが，その娘＜事例 4＞の協力を得て，事例 5 の友人・よく通った店の店員等を対象に接触者健診を実施した．その後，LTBI 治療中の看護師 1 名が新たに肺結核と診断され VNTR が一致したが，一般住民への感染拡大は確認されていない．

まとめ：VNTR 分析と保健師の疫学調査の突合に加えて，地域の医療機関と患者家族の協力により，過去の死亡事例からの院内感染対策および地域での感染拡大防止策を実施できた．

低罹患率地域における結核菌臨床分離株の伝播経路追跡

和田 崇之，瀬戸 順次，山本 太郎，阿彦 忠之

第 90 回日本結核病学会総会，2015 年 3 月 27-28 日，於長崎

［目的］結核患者由来菌株の遺伝多型によって伝搬経路を推定する結核分子疫学では，現在 VNTR 型別法が導入され，感染源究明に役立てられている．VNTR 型別は容易に分析可能である反面，偶発的な型別一致・変化による誤判定や，実地疫学調査との齟齬など，個々の事例についてはなお詳細な検証が必要である．本研究では，次世代シーケンサーを活用した菌株ゲノム比較によって高精度な菌株多型情報を獲得し，正確な伝搬経路の解明を目指すと共に，VNTR 型別の精度に関する知見を得ることを目的とした．［方法］2009～2011 年に山形県内で新規登録された菌陽性肺結核患者（266 人）のうち，VNTR 型別解析が可能であった 184 株（69.2%）を対象とした．VNTR 型別は多変領域を含む 24 領域を解析し，23 領域以上の一致株をクラスターと定義した．その結果，クラスターは 17 組（49 株）となり，本研究ではこれらをすべて Illumina HiSeq 2000 によるショートリード解析に供した．H37Rv を対照配列としたマッピング解析を行い，各株の点変異（SNV: Single Nuclear Variation）をゲノムワイドに検出した．解析には CLC Genomics Workbench を用い，SNV 検出領域は遺伝子コード領域（相同遺伝子を除く）に限局して解析した．［結果および考察］SNV 数 5 bp 以下を同一株として解析したところ，17 クラスターのうち 7 クラスターのみが同一株による事例であることが明らかとなった．VNTR 型別実施前に実地疫学調査によって既に関連性が判明していた 6 クラスターは，すべてゲノム比較によっても各々同一株による感染であったことが確認された．VNTR 型別一致後の調査から共通感染源の可能性が示唆された 4 クラスターでは，1 クラスターのみが同一株であった．また，患者間の関連が認められなかった 8 クラスターでは，1 クラスターのみが同一株であった．ゲノム比較によって異なる菌株と判定された VNTR クラスターは，菌株系統的には非北京型，北京型 ST3 群，北京型 ST25/19 群に集中しており，これらの系統株における過去の流行や，VNTR 型別における低分解能に起因する可能性が示唆された．非会員共同研究者：小椋義俊，林哲也（宮崎大）

サフォードカルディオウイルス 2 型の RD-18S 細胞による分離

水田 克巳，青木 洋子，的場 洋平，田中 静佳，矢作 一枝，板垣 勉，松嵜 葉子

第 68 回日本細菌学会東北支部総会，2014 年 8 月 22-23 日，於仙台

【目的】我々は，2009 年の 8-11 月にサフォードカルディオウイルス 2 型（SAFV2）による小児の急性気道感染症の流行を経験し，公表した（Saffold cardiovirus infection in children associated with respiratory disease and its similarity to coxsackievirus infection ,Pediatr.Infect.Dis.J.30: 680-683,2011）．この研究では SAFV2 のスクリーニング検出は，Reverse transcription (RT)-polymerase chain reaction (PCR)法及びシークエンス配列で陽性を確認した．その際，我々が通常使用している細胞での分離も試みたが，失敗に終わった．一方，新潟県保健環境科学研究所の広川らは，RD-18S 細胞により SAFV2（2013 年の 5 株）および SAFV3（2007～2008 年の 4 株）の分離に成功している（第 55 回日本臨床ウイルス学会；2B-12）．我々は，新潟県保健環境科学研究所からこの RD-18S 細胞の分与を受け，2009 年に SAFV2 が陽性であった検体を接種，分離を試みた．

【方法】54 例の RT-PCR 陽性例のうち 49 例について，検体を新潟県由来の RD-18S 細胞に接種し，4 代目まで継代し，cytopathic effect（CPE）の有無を観察した．CPE があったものについては，virus protein 1 (VP1)について PCR 法で増幅，シークエンスにより SAFV2 であることを確認した．

【結果及び考察】スクリーニング検出で 1stPCR 陽性であった検体 33 例中 18 例で CPE を認め，SAFV2 が分離された．Nested PCR 陽性であった 16 例からは分離できなかった．これらのことから，新潟県から分与を受けた RD-18S 細胞は SAFV2 の感受性に優れていることが確認された．今後は，2010 年以降についても，スクリーニング陽性例について分離を進め，また血清疫学を実施するなど，疫学解析を発展させていきたい．

RD-18S 細胞を分与して下さいました，新潟県保健環境科学研究所ウイルス科，田村務先生，広川智香先生に深謝いたします．

山形県で分離された *Mycoplasma pneumoniae* の *p1* 遺伝子型解析

鈴木 裕，瀬戸 順次，板垣 勉，勝島 由利子，勝島 史夫，青木 敏也，安孫子 千恵子，矢作 一枝，水田 克巳，松嵜 葉子，本郷 誠治

第 68 回日本細菌学会東北支部総会，2014 年 8 月 22-23 日，於仙台

【目的】 *Mycoplasma pneumoniae*（以下，Mp）は，若年者に多く，発熱や長引く咳を主症状とするマイコプラズマ肺炎の起因菌である．Mp のヒト粘膜上皮細胞への接着性を担う中心的な接着分子である P1 蛋白をコードする *p1* 遺伝子は，塩基配列の違いにより 1 型，2 型および 2 型亜種（2a，2b，2c 型）の計 5 種類に分類される．本研究は，山形県で流行する Mp の *p1* 遺伝子型の動向把握を目的として，本県で過去 10 年間に分離された Mp の *p1* 遺伝子型解析を実施した．

【方法】 2004 年から 2013 年の 10 年間に山形県で分離された Mp 358 株を対象とし，PCR-RFLP 法により *p1* 遺伝子型を解析した．Mp ゲノムの *p1* 遺伝子領域を PCR で増幅し，増幅産物を制限酵素 *Hae*III で切断した．得られた PCR-RFLP パターンを先行研究の報告と比較し，1 型，2 型，2a 型および 2b 型を同定し

た．一方，2c 型は PCR-RFLP パターンの報告がないため，既報の 2c 型の塩基配列から予想される PCR-RFLP パターンを示した菌株について，PCR ダイレクトシークエンスにより 2c 型に特有の塩基配列を検出することで同定した．

【結果】 山形県で分離された Mp 358 株は，278 株（77.7%）が *p1* 遺伝子型 1 型，80 株（22.3%）が 2 型亜種（2a 型；10 株，2b 型；5 株，2c 型；65 株）と同定され，2 型菌は検出されなかった．本県では 2012 年以前は 1 型菌が多かったが（85.2%~100%），2012 年以降 2 型菌亜種の割合が増加した（2012 年；26.5%，2013 年；66.1%）．

【考察】 わが国で流行の主流を成す Mp の *p1* 遺伝子型は 8 年から 10 年毎に 1 型菌と 2 型菌で置き換わると推定されている．先行研究によれば，1 型菌が流行の主流となった 2005 年以降現在にいたるまで，*p1* 遺伝子型が置き換わる兆候は報告されていない．しかし本研究において，2 型菌亜種の割合が 2012 年以降増加していることが示された．このことは，少なくとも山形県という国内の一地域においては，流行の主流を成す Mp の *p1* 遺伝子型が 1 型から 2 型亜種に置き換わっている可能性を示している．

山形県で分離された *Mycoplasma pneumoniae* のマクロライド耐性遺伝子変異解析

鈴木 裕，瀬戸 順次， 板垣 勉，安孫子 千恵子，矢作 一枝，水田 克巳，松嵜 葉子

第 35 回山形県医学検査学会 ，平成 26 年 10 月 25 日-26 日，於長井

【はじめに】*Mycoplasma pneumoniae*（以下，Mp）は，若年者に多く，発熱や長引く咳を主症状とするマイコプラズマ肺炎の起因菌である．Mp 感染症の第一選択薬であるマクロライド系抗菌薬（以下，マクロライド）に耐性を示す Mp は 2001 年に初めて報告されて以降増加傾向にあり，問題視されている．Mp のマクロライド耐性機序として，マクロライドの作用標的である 23S リボゾーマル RNA（以下，rRNA）ドメインⅤの 2063 位，2064 位および 2617 位の点変異が示されているが，山形県におけるマクロライド耐性 Mp の動向は明らかではない．そこで今回，本県におけるマクロライド耐性 Mp の動向把握を目的として，山形県衛生研究所で分離した Mp のマクロライド耐性遺伝子変異保有状況を解析した．

【対象及び方法】2004 年から 2013 年（10 年間）に山形県内の診療所を中心とする 6 医療機関で，Mp 感染症が疑われた患者より採取された咽頭拭い検体 1，391 検体から分離した Mp 358 株を対象とした．供試菌株の培養液から DNA を抽出し，23S rRNA 遺伝子ドメインⅤ領域を PCR で増幅した．PCR 産物の塩基配列をダイレクトシークエンスにより決定してマクロライド耐性遺伝子変異の有無を解析した．

【結果】対象とした Mp 358 株中 131 株（36.6%）にマクロライド耐性遺伝子変異を検出した（A2063G；81 株，A2063T；43 株，A2063C；1 株，A2064C；1 株，C2617G；4 株，C2617A；1 株）．年次推移は，2006 年に A2063G 変異株，2007 年に A2064C 変異株を各 1 株ずつ検出した後，2009 年 7 月から 2010 年 1 月にかけて A2063T 変異株を 43 株検出した．以降，A2063G 変異株を中心に A2063C，C2617G および C2617A 変異株の 4 種類を検出した．2009 年以降の変異検出率は 2009 年；76.4%（42/55），2010 年；37.5%（3/8 株），2011 年；20.4%（10/49 株），2012 年；48.2%（54/112 株），2013 年；32.3%（20/62 株）だった．

【考察】わが国のマクロライド耐性遺伝子変異検出率は，諸角らの報告 [1)] では年々増加しており 2006 年に 30.6%，2011 年に 89.5%に達したとされる．また Kawai ら [2)] も，A2063G 変異を中心とする変異株が 2008 年に 50%を，2012 年に 80%を超えたことを報告している．

我々の解析では，2008 年以前に分離された変異株は 2 株のみであり，2009 年は A2063T 変異株を多数検出した（変異検出率；76.4%）ものの，その全てが同一地域の 3 施設（中学校 1 校および小学校 2 校）に

限局した集団発生事例[3]の分離株であった．2010 年以降は A2063G 変異を中心とした変異株が継続的に検出され，変異検出率は 20-50%で推移した．以上のことから，2010 年以降，全国的な Mp のマクロライド耐性化が本県にも波及したこと，変異検出率には地域差や年による変動があり継続的な監視が必要であることが明らかになった．

1) 諸角美由紀ら．臨床とウイルス 2013 ; 41 : 273-9.
2) Kawai et al. Antimicrob Agents Chemother 2013 ; 57 : 4046-9.
3) Suzuki et al. Pediatr Infect Dis 2013 ; 32 : 237-40.

山形県における気象データを用いたつつが虫病患者数予測モデルの構築

瀬戸 順次

第 21 回リケッチア研究会，2014 年 12 月 20 日，於東京

【はじめに】山形県では春のつつが虫病が多いが，その患者数は年によって大きなばらつきがある．本研究では，越冬性のツツガムシ（夏～秋にかけて産卵・孵化後，幼虫が一部越冬して春にヒトへ吸着する）の数が気象の影響を受けて増減することで，春のつつが虫病患者数のばらつきをもたらしていると考え，気象因子から春のつつが虫病患者数を予測するモデルを構築することを目的とした．

【方法】1984～2014 年（31 年間）の本県における 4～7 月のつつが虫病患者数を応答変数とした．説明変数は，前年 7 月～当年 6 月の月平均気温，前年 12 月～当年 3 月の月降雪量および月最深積雪量，ならびに前年 12 月～当年 3 月の総降雪量（計 21 項目）とした．気象データは，気象庁観測地点のうち，本県でつつが虫病患者が集中している最上川周辺の 4 地点の平均値を用いた．負の二項回帰単変量モデルで有意（$p<0.01$）となった説明変数を抽出後，AIC（赤池情報量基準）を指標に最適な負の二項回帰多変量モデルを選択した．解析には R ver. 3.0.2 を用いた．

【結果】前年 7 月・8 月平均気温，当年 1 月・2 月最深積雪量，および前年 12 月～当年 3 月の総降雪量（5 項目）と春のつつが虫病患者数との間にそれぞれ有意な正の関連性を認めた．これら 5 項目による多変量モデルを検討した結果，以下の患者数予測式を得た；$y_i = e^{-6.48+0.12*x_1+0.23*x_2+0.0008*x_3}$，$x_1$；前年 7 月平均気温，$x_2$；前年 8 月平均気温，$x_3$；前年 12 月～当年 3 月の総降雪量．

【考察】本研究により，前年の夏が暑く，冬の降雪量が多いほど翌春のつつが虫病患者数が増えることが示され，具体的な患者数を予測するモデルの構築に成功した．今後，春の患者数が多くなると予測された年には，事前に県民に警戒情報を流すことで，つつが虫病予防の徹底を促すことが可能になる．

2014 年山形県における C 型インフルエンザウイルスの分離状況

田中 静佳，的場 洋平，青木 洋子，矢作 一枝，水田 克巳，勝島 史夫，勝島 由利子，板垣 勉，松嵜 葉子

第 41 回山形県公衆衛生学会，2015 年 3 月 5 日，於山形

【はじめに】インフルエンザウイルスには,A型,B型,C型がある.C型インフルエンザウイルスは一般的に

小児の上気道炎をおこす原因の1つとされているが,気管支炎や肺炎などの下気道炎を引き起こすことも知られている.我々は, 山形県感染症発生動向調査事業に基づき,急性ウイルス性呼吸器疾患の発生状況を把握することを目的にウイルスの分離を実施している.今回,2014年の調査において,C型インフルエンザの流行が確認された.

【対象と方法】 2014 年 1 月から 12 月までに県内医療機関を受診した患者から採取された鼻咽頭ぬぐい液および鼻汁 1960 検体を対象とし,培養細胞を用いたマイクロプレート法によるウイルスの分離を行った.C 型インフルエンザウイルスの分離は MDCK 細胞における細胞変性効果の確認およびモルモット血球,ニワトリ血球を用いた血球凝集試験により行い,RT-PCR 法による遺伝子の検出で同定した.さらに,分離したウイルスについて C 型インフルエンザの表面抗原であるヘマグルチニンエステラーゼ (HE) に対するモノクローナル抗体を用いた血球凝集抑制試験による抗原解析を実施した.

【結果】2014 年 1 月から 12 月までに 21 検体から C 型インフルエンザウイルスが分離された.分離は全て 4 月～8 月の期間に集中し,分離数が 11 検体と最も多かった 5 月においては,当月の総検体数 145 検体の約 8%に及んだ.分離された患者の 17 例(80%)が 5 歳以下の小児で,38℃以上の発熱が 18 例(85%),咽頭炎,鼻炎等の上気道炎が 18 例(85%)に認められ,下気道炎も 3 例あった.

分離された C 型インフルエンザウイルス 21 株について行った抗原解析では,抗 HE モノクローナル抗体に対する反応パターンが Kanagawa/76 系統と一致する 13 株と,Sao Paulo/82 系統と一致する 8 株に大別され,2 つの系統が同時に流行していることがわかった.

【考察】C 型インフルエンザの流行は 1 年おきの偶数年に発生し,A 型,B 型インフルエンザのシーズンが終息した春に発生する傾向にある.今回の流行も既報の予測どおり 2014 年の春に確認された.また,C 型インフルエンザウイルスは HE の抗原性により 6 つの系統 (Taylor/47,Kanagawa/76,Mississippi/80,Yamagata /81,Aichi/81,Sao Paulo/82) に分類される. 山形県においては 2006 年から 2012 年まで Sao Paulo/82 系統が流行の主流であったが,2014 年は Kanagawa/76 系統の分離が優勢となった.山形県におけるこのような流行株の交代は 2002 年と 2006 年に起こっており,特に 2002 年とそれに続く 2004 年には Kanagawa/76 系統による大きな流行が確認されていることから,今後も調査を継続し発生動向を注視する必要がある.

ツキヨタケの有毒成分 illudin S の含有量および特性

大河原 龍馬, 和田 章伸, 笠原 義正, 水田 克巳 (山形県衛生研究所)

第 41 回山形県公衆衛生学会, 2015 年 3 月 5 日, 於山形

ツキヨタケによる食中毒は平成 12 年～25 年の 14 年間に全国で 281 件発生しており, 山形県はその件数が全国で最多である. これを防止するためには毒キノコを良く知ることが必要であり, その研究は公衆衛生学上きわめて重要である. 今回は野生のツキヨタケ中の illudin S 含有量について, 部位に違いによる差について検討を行ったが, 傘の部分に最も多く含まれていることが分かった. また, 塩蔵による毒抜きを検討したところ, 1 ヶ月間塩蔵した場合でも illudin S は残存することが分かった.

中毒原因となる有毒植物の多成分一斉分析法の開発

笠原 翔悟，和田 章伸，笠原 義正，水田 克巳（山形県衛生研究所）

第 41 回山形県公衆衛生学会，2015 年 3 月 5 日，於山形

植物性自然毒による食中毒が全国で 2 番目に多い山形県において，中毒発生時に迅速にその原因となった植物を特定する方法を開発することは非常に重要である．本研究では，同一の方法で複数の毒成分を同時に分析できる LC-MS/MS による一斉分析法について検討した．ODS とイオン交換の性質を併せ持つマルチモードカラムを用いることにより，極性の異なる 5 種類の植物の 14 毒成分分析可能な条件を確立した．また，試料の抽出，精製などの前処理方法についても検討を行った．