

## (2) 調査・事例

---

- 1) 大分県南部海域における麻痺性貝毒モニタリング調査について (2003~2007) ..... 25
- 2) 3施設へ拡大した腸管出血性大腸菌O111による集団発生事例..... 30
- 3) 大分県における浴用水中の*Legionella*属菌の分離状況 ..... 35
- 4) 健康食品からのヒドロキシノンデナフィル検出事例について ..... 43

# 大分県南部海域における麻痺性貝毒モニタリング調査について (2003~2007)

森崎澄江, 溝腰利男, 山下秀門

## Paralytic Shellfish Poisons in Bivalves collected at the coast of Kamae (2003-2007)

Sumie Morisaki, Toshio Mizokoshi, Hideto Yamashita

Key words : 麻痺性貝毒 PSP, ヒオウギガイ *Chlamys nobilis*,  
カテナータム *G.catenatum*,  
カテナラ *A.catenella*

### はじめに

麻痺性貝毒を生産する鞭毛藻は日本各地で数種の発生が確認されており, これらを摂取するホタテガイ, ムラサキイガイ, アサリ, アカザラ, ヒオウギガイなど二枚貝の主として中腸腺に麻痺性貝毒が蓄積される。本県でも, 二枚貝のヒオウギガイが養殖されている県南部の沿岸部において, 1980年代から原因プランクトンの*A.catenella*や*G.catenatum*発生が認められており貝毒モニタリング調査を行ってきた。

近年はヒオウギガイの毒化頻度が高くなる傾向を示し, たびたび出荷自主規制が行われ, 養殖業への影響がみられるようになった。このため, 大分県では2001年10月に「大分県貝毒被害防止対策マニュアル」を策定し, 年間をとおして計画的に海水状況, プランクトン発生状況及び貝毒のモニタリング調査を実施し, 毒化の回避に努めるとともに, 出荷等の管理を行い食品の安全確保に努めている。当センターは1984年度からこの事業において毒力検査を担当しており概要を報告<sup>1), 2), 3)</sup>してきたが, 本報では2003年度から2007年度までの5年間の概要を報告する。

### 試料及び検査方法

#### 1 試料

モニタリング計画に基づいて, 大分県農林水産研究センター水産試験場が大分県佐伯市蒲江養殖場で

採取したヒオウギガイ及び沿岸で採取したアサリを処理し, 冷凍後, 搬入したもの。

#### 2 検査方法

「貝毒の検査方法」(昭和55年7月1日付け厚生労働省通知)に準じた大分県検査実施標準作業書に基づき行った。

#### 3 調査期間

2003年度から2007年度を調査期間とした。

### 結果及び考察

#### 1 ヒオウギガイ及びアサリの毒化について

2003年度から2007年度の麻痺性貝毒のモニタリング調査地点を図1に, 毒化した事例について表1に示した。

「大分県貝毒被害防止対策マニュアル」では, モニタリングでヒオウギガイ中腸腺の毒力が20MU/g以上になった場合, 警戒体制強化として中腸腺検査を翌週も行き, 40MU/g以上の場合は出荷自粛, さらに次週にヒオウギガイの可食部及び湾内のアサリの検査を行うとされているが, 周辺のプランクトンの状況をみながら必要な毒力検査を行い, 食品の安全への対応を行っている。

この5年間でヒオウギガイ中腸腺は20MU/g以上になった時期が12回あった。さらに, 40MU/gを超過したのは2005年度に4回, 2006年度に1回, 2007年度に5回で, 可食部が食品衛生法の基準

表1 貝毒モニタリング調査における毒化の概要

2003年度～2007年度

	調査項目	ヒオウギガイ毒力							アサリ毒力	プランクトン数		備考	
		小蒲江		避難漁場A		避難漁場B	避難漁場C			森崎	小蒲江		猪串湾奥
		部位等	中腸腺	可食部	中腸腺	可食部	可食部	中腸腺		可食部	可食部		平均値 <sup>1)</sup>
事例1	2004/ 1/ 6										107,000	catenatum	
	2004/ 1/13	35.6							9.8*		150	catenatum	
	2004/ 1/19	31.7							3.3	8	190	catenatum	
	2004/ 1/26	23.4							1.9*		280	catenatum	
	2004/ 2/ 2	19.7							N.D*	8	250	catenatum	
	2004/ 2/16	13.1							N.D*		1,000	catenatum	
	2004/ 3/ 1	9.9									400	catenatum	
	2004/ 3/ 8	12.7							N.D	114	2,120	catenatum	
事例2	2004/ 5/10	37.4											
	2004/ 5/17				16.0								
	2004/ 5/24	20.7			11.3								
事例3	2005/12/ 6	64.7											
	2005/12/13			2.3							4	catenatum	
	2005/12/20			2.6									
	2006/ 1/10			2.6							4	catenatum	
事例4	2006/ 1/23	43.3											
	2006/ 1/30			3.4							250	catenatum	
事例5	2006/ 2/ 6	45.5	3.1						N.D		510	catenatum	
	2006/ 2/13		2.0								1,230	catenatum	
	2006/ 2/20		1.9										
	2006/ 3/ 6		2.2							190	2,540	catenatum	
	2006/ 3/13		2.4							140	1,400	catenatum	
事例6	2006/ 3/20	439				3					10,880	10,880	catenatum
	2006/ 3/27		4								392		catenatum
	2006/ 4/ 4				5.8						1,212	56,160	catenatum 避難漁場も発生
	2006/ 4/11		6.7		4.1						308	6,305	catenatum
	2006/ 4/17		8.4		4.4	5.0			10.8*				catenatum
	2006/ 4/24				5.5	8.9			8.4	1,712	189,600		catenatum
	2006/ 5/ 1					15.9			11.9	798	48,400		catenatum
	2006/ 5/ 8					24.9			8.5	692	830		catenatum
	2006/ 5/ 9		40.1										
	2006/ 5/15		29.0				12.6		2.5	1,088	60 1,500		catenatum catenella
	2006/ 5/22		29.4				14.6				8		catenella
	2006/ 5/29		19.1				13.8		1.5				
	2006/ 6/ 5		16.1				10.2						
	2006/ 6/12		16.1				10.7						
	2006/ 6/19		10.7				9.0						
	2006/ 6/27		7.7				10.3						
2006/ 7/ 3		N.D				9.7							
2006/ 7/10		N.D				12.1							
2006/ 7/18		N.D				7.0							
2006/ 7/20		N.D											
事例7	2006/11/ 7	28.7											
	2006/11/13	40.4									40 80		catenatum catenella
	2006/11/20				3.1						40 300		catenatum catenella
	2006/11/27				2.8					0	0		
	2006/12/11				34.2					0	0		

	調査項目	ヒオウギガイ毒力							アサリ毒力	プランクトン数		備考	
		小蒲江		避難漁場A		避難漁場B	避難漁場C			森崎	小蒲江		猪串湾奥
		部位等	中腸腺	可食部	中腸腺	可食部	可食部	中腸腺		可食部	可食部		平均値 <sup>*1</sup>
事例7	2006/12/18				36.3						4	0	
	2006/12/25				26.4						6	80 50	catenatum catenella
	2007/ 1/ 9				23.4								
	2007/ 1/15				22.1							40	catenatum
	2007/ 1/22				16.3						6		catenatum
	2007/ 2/ 5				19.8						4	520	catenatum
	2007/ 2/19				18.1						0	100	catenatum
事例8	2007/ 3/ 7				21.8						84 8	2,210	catenatum catenella
	2007/ 3/12				24.4					11.9		2,500	catenatum
	2007/ 3/19				30.7					51.3	18	6,920	catenatum
	2007/ 3/26				54.3					28.7	2,936	154,250	catenatum
	2007/ 4/ 2								7.9	28.3	4,026	20,200	catenatum 避難漁場C1180
	2007/ 4/ 9								9.3	8.7	140	60	catenatum
	2007/ 4/16								6.4	4.6	38	2,940	catenatum
	2007/ 4/23								5.9	2.9	34	160	catenatum
	2007/ 5/ 1								4.7	1.9	0	230	catenatum
	2007/ 5/ 7								3.6	2.3	12	270	catenatum
	2007/ 5/14								2.5				
	2007/ 5/21								4.3				
	2007/ 5/24								4.8				
	2007/ 5/28								2.3				
2007/ 6/ 4								2.0					
2007/ 6/11								1.8					
事例9	2007/ 7/17	52.1											赤潮発生
	2007/ 7/23						12.1						
事例10	2007/ 8/21	92.6											
	2007/ 8/27		3.9										
	2007/ 9/ 3		3.6										
事例11	2007/10/ 1	42.0									11		Alexandrium Sp.
	2007/10/ 9		1.9								6		catenatum
	2007/10/29	22.0											
	2007/11/12	25.7									8		catenatum
	2007/11/26	24.7									1	54,000	catenella
	2007/12/10	20.7											
	2007/12/25	23.3											
	2008/ 1/ 8	22.0									10	2,667	catenella
	2008/ 1/21	23.9											
	2008/ 2/ 4	19.6									16		catenella
2008/ 2/18	17.7									8	18,000	catenatum	
2008/ 3/ 3	17.6									8	2,360	catenatum	
事例12	2008/ 3/24						27.3		11.6	342	34,000		catenatum
	2008/ 3/31						62.3		22.4	3,000	12,000		catenatum
	2008/ 4/ 7				2.5				11.3	100	56,000		catenatum
	2008/ 4/14				2.7				12.9	8,867	16,000		catenatum 湾口で赤潮状態

可食部N.D : 1.75未満

\* : 採取日が1日前後している

\*1 : 測定点5層の平均cells/l

\*2 : 測定点6層のうち最も多く出現した層のcells/l

4MU/gを超えたのが2006年3月27日から7月18日(最高毒力40.1MU/g)と、2007年4月2日から5月24日(最高毒力9.3MU/g)の2回あった。

これを、当所でモニタリングをはじめた1984年度から2002年度までの約20年間で、可食部が4MU/gを超えたのが1988年12月から6月(最高推定毒力36MU/g, 原因プランクトンA.catenella), 1996年5月から7月(最高毒力6.6MU/g 原因プランクトンG.catenatum)の2回であったことと比較して、この5年間の毒化頻度は増加傾向にあると考えられた。

アサリでは食品衛生法の基準4MU/gを超えたのが2004年1月12日(最高毒力9.8MU/g), 2006年4月18日から5月8日(最高毒力11.9MU/g), 2007年3月12日から4月16日(最高毒力51.3MU/g), 2008年3月24日から4月にかけて(最高毒力22.4MU/g)の4回あった。

これに対し、モニタリングをはじめた1984年度から2002年度までの間に基準4MU/gを超えたのは1996年度4月から5月(最高毒力27.7MU/g)と2003年3月から4月(最高毒力11.6MU/g)の2回で、近年は頻度、毒力ともに増加傾向にあると考えられた。

## 2 毒化原因プランクトンの発生状況

小蒲江湾で麻痺性貝毒20MU/g以上の毒化があった13回のうち、主に冬季から春季に毒化した6回はG.catenatumが観測されたのに対し、A.catenellaが観測されたのは3回で、残りの4回はどちらのプランクトンもほとんど観測されていなかった。

プランクトン数をみると、水深0, 2, 3, 10, 底1mの平均細胞数の最高値はG.catenatum が10,880 cells/lに対し、A.catenellaは最高値746cells/lと少なく、そのときには毒化もなかった。

さらに、小蒲江湾でヒオウギガイが毒化した時期には、隣の猪串湾のいずれかの水深層でG.catenatumが小蒲江湾以上に高濃度で発生していた。そのため、湾奥のアサリ漁場ではアサリが毒化する結果となった。

このことは、大分県農林水産研究センターの宮村が報告<sup>4)</sup>している、「G.catenatumは猪串湾では周年栄養細胞の状態で生存し、増殖することが可能であり、小蒲江湾で出現するG.catenatumは降水

量、季節風の強さ、水温の影響を受ける海水循環により、猪串湾の高濃度プランクトンが小蒲江湾へ流出しているものである。」ことを裏付けるものと言える。

## 3 毒力の減衰について

海洋水産研究センターの宮村も報告しているが、これまでの事例ではヒオウギガイは一旦毒化すると、毒力が低下するのに時間がかかることがわかっている。

G.catenatumが原因で二枚貝に蓄積された毒の減衰について、ムラサキイガイ、アカガイは細胞密度が低下するにつれ速やかに減衰するものの、イタヤガイは細胞密度が低下しても長期間毒を保持するという報告<sup>5)</sup>もあることから、イタヤガイ科に分類されるヒオウギガイも同様の傾向にあることが推察される。

そこで、本調査において毒化したヒオウギガイとアサリの毒力減衰傾向について、図2に示したグラフを用いて半減期を以下のとおり計算した。

$$\begin{aligned} \text{毒力が } A_0 \text{ のものが、} t \text{ 日経過した際の毒力 } A_t \text{ は} \\ A_t = A_0 \exp(-\lambda t) \quad \dots\dots\dots \text{①} \\ \text{半減期 } t_{1/2} \text{ における } A_t = 1/2 A_0 \text{ を①式に代入すると、} \\ t_{1/2} = 1/\lambda \times (\ln(A_0/A_{0/2})) = \ln 2 / \lambda \\ \approx 0.693 / \lambda \quad \dots\dots\dots \text{②} \end{aligned}$$

式②に図2より得られた各資料のλを代入して算出される半減期は、  
ヒオウギガイ  
2006年度 λ=0.032 t<sub>1/2</sub> = 21.7  
2007年度 λ=0.035 t<sub>1/2</sub> = 19.5  
よって、小蒲江ヒオウギガイの可食部毒力の半減期は2006年度が22日、2007年度が20日、平均して21日となる。  
アサリ  
2007年度 λ=0.083 t<sub>1/2</sub> = 8.5  
よって、アサリ可食部の毒力の半減期は約9日となる。

この結果でも、ヒオウギガイはアサリに比べ減毒に時間を要することから、出荷規制による養殖業者の経済的リスクを少なくするためには、できるだけ毒化させない対策が必要であり、現在取られているプランクトンをこまめにモニタリングして、ヒオウギガイを安全な漁場に移動させる方法は効果的と思われる。

また、今後は、この半減期を用いて出荷規制解除までの日数の推測ができることから、養殖場での出荷管理などに利用し、安全な食品の流通に寄与できるものとする。

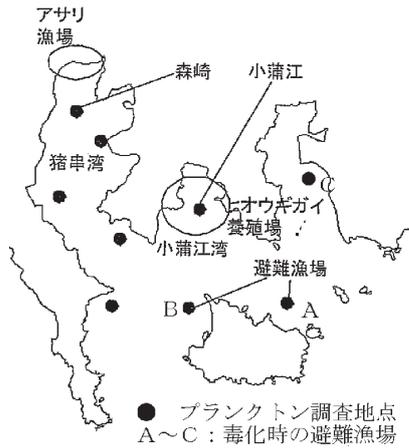


図1 調査地点図

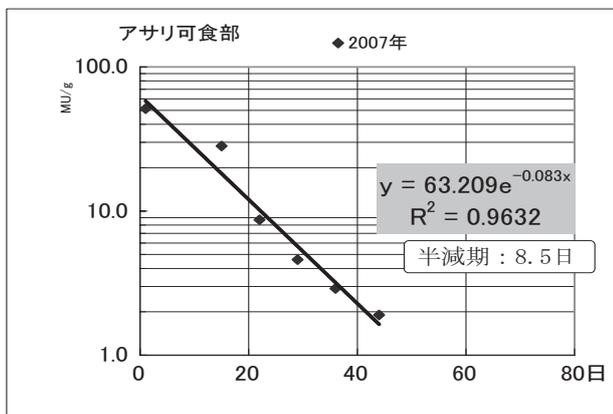
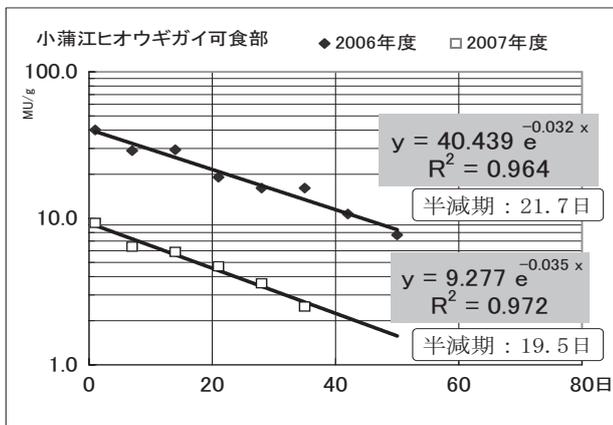


図2 ヒオウギガイ及びアサリの毒力減衰曲線

まとめ

- (1) 可食部が食品衛生法の基準4MU/gを超えたのが2006年3月27日から7月18日(最高毒力40.1MU/g)と、2007年4月2日から5月24日(最高毒力9.3MU/g)の2回あった。
- (2) アサリでは食品衛生法の基準4MU/gを超えたのが2004年1月12日(最高毒力9.8MU/g)

g), 2006年4月18日から5月8日(最高毒力11.9MU/g), 2007年3月12日から4月16日(最高毒力51.3MU/g), 2008年3月24日から4月にかけて(最高毒力22.4MU/g)の4回あった。

- (3) ヒオウギガイ及びアサリの毒化頻度は増加したことから、養殖漁場周辺においてヒオウギガイやアサリが毒化しやすい環境になっていると考えられた。
- (4) 小蒲江湾では、G.catenatumのほうがA.catenellaより発生頻度、平均細胞数ともに多く、毒化原因は主にG.catenatumと考えられる。
- (5) 小蒲江湾ヒオウギガイが毒化した時期には隣の猪串湾で、いずれかの水深層でG.catenatumが小蒲江湾以上に高濃度で発生していた。また、それが原因でアサリが毒化した。
- (7) 毒化したヒオウギガイとアサリの毒力減衰について半減期を計算したところ、ヒオウギガイでは約21日、アサリでは約9日であった。この半減期を用いて出荷規制解除までの日数の推測ができることから、養殖場での出荷管理などに利用し、安全な食品の流通に寄与できるものとする。

文献

- 1) 局伸男 他: 貝毒モニタリング結果について, 大分県衛生環境研究センター年報, 第20号(1992)
- 2) 後藤成一 他: 蒲江町沿岸海域における二枚貝の麻痺性貝毒について, 大分県衛生環境研究センター年報, 第24号(1996)
- 3) 森崎澄江 他: 蒲江町沿岸における二枚貝の麻痺性貝毒について, 大分県衛生環境研究センター年報, 第30号(2002)
- 4) 宮村和良: 猪串湾における有毒渦鞭毛藻Gymnodinium catenatumの出現特性及びヒオウギガイ毒化の解明に関する研究, 大分県農林水産研究センター調査研究報告No1(2007)
- 5) 池田武彦 他: 貝毒に関する第3報, 山口県内海水試報, (1988) 116, 59-68

## 3施設へ拡大した腸管出血性大腸菌O111による集団発生事例

緒方喜久代, 若松正人, 成松浩志, 渕 祐一\*<sup>1</sup>

### An Outbreak of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O111:HNM infection at a nursery school, a kindergarten and a primary school

Ogata Kikuyo, Wakamatsu Masato, Narimatsu Hiroshi and Fuchi Yuichi\*<sup>1</sup>

Key words : 腸管出血性大腸菌 O111 Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O111, 集団感染事例 outbreak, パルスフィールド電気泳動 Pulsed-field gel electrophoresis(PFGE)

#### 要旨

2007年5月に大分県内の幼稚園でEHEC O111:HNM(VT1&2)による集団感染事例が発生した。接触者検便の結果、幼稚園児の複数家族から同型菌が検出された。菌陽性者には保育園児と小学生が含まれていたため、小学校の全員検便を含め835名の検便を実施した。最終的には、3施設の園児・学童23名とその家族等8名の合計31名から当該菌が検出された。分離菌株について、制限酵素Xba Iを用いたPFGE法を実施したところ、いずれもよく似たPFGEパターンを示し、同一菌株由来の集団発生であることが示唆された。感染源は特定できなかったが、幼稚園で園児同士の直接的な接触を通じて感染が拡がり、感染園児から各家庭へ、感染家庭から保育園、小学校へと感染拡大したものと推察された。

#### はじめに

腸管出血性大腸菌(Enterohemorrhagic *Escherichia coli* 以下, EHEC)O157による集団発生は、1982年、米国でハンバーガーを原因食品とする事例<sup>1) 2)</sup>を始めとし、カナダなど世界各地からの報告がある。わが国では、1990年埼玉県浦和市の幼稚園で患者数319人、死者2人を出した集団発生<sup>3)</sup>に始まり、1996年には岡山市邑久町、大阪府堺市において大規模な集団発生<sup>4)</sup>が起こり、全国で約17,000人を超える患者が発生した。その後、これらの事件を契機に、食品の衛生管理の徹底や給食施設の改善などの様々な安全対策が取られた結果、大規模な集団発生は見られていない。しかし、O157以外O26やO111などの検出数が増加し<sup>5)</sup>、年間4,000人前後のEHECによる感染症が発生している。

今回、EHEC O111:HNM(VT1&2)による患者発生に伴い、感染源を特定するため疫学調査や接触者検便、拭き取り検査等を行うとともに、3施設およびその家族の糞便から分離株について、生化学的性状テストや毒素型、異同を調べるためPFGE解析を

行ない検討を行ったので報告する。

#### 対象および方法

##### 1. 事件の概要

2007年5月26日にEHEC O111(この時点ではVT陽性のみで型別は不明)が下痢症患者から検出された旨、大分県O市保健所に管内の医療機関から届出があった。患児が居住する管轄保健所の調査で、患児はY市内の幼稚園に通園していることが判明したため、Y市教育委員会等と協議のうえ、翌日から幼稚園への健康調査と衛生指導を開始した。31日には当該幼稚園児5名より同型菌が検出され、集団発生が明らかとなったため、県は保健所緊急支援チームの派遣を行った。接触者検便で幼稚園児の複数家族から同型菌が検出され、菌陽性者にはY保育園児とY小学生がいることも判明した。6月5日に県庁内に感染症対策本部が設置され、Y小学校関係者500名以上の全員検便を決定、実施した(表1)。

6月10日以後、新たな感染者は認められなかったが、検出者の陰性確認や陰性確認後の再発排菌等に

より(図1), 終息発表は7月6日となった。

## 結 果

### 2. 分離および同定

医療機関から提供を受けた初発患者から分離された菌株を精査した結果, CT-ソルボースMaC寒天培地で非分解のコロニー, クロモアガーO157培地で藤色のコロニーを形成した。LIM培地でリシン(-)・インドール(+ )・運動(-), XMブロスでGAL(+ )・MUG(-)・インドール(+ )の生化学的性状を示し, 病原大腸菌免疫血清「生研」(デンカ生研)を用いた生菌からの凝集反応でO111免疫血清に凝集を認め, PCR法でVT遺伝子, VT1&2遺伝子を確認した。

初発患者由来株から得られた性状の特徴を利用し, 糞便検査の直接分離培養には, CT-ソルボースMaC寒天培地, クロモアガーO157培地, DHL寒天培地の3種類を使用し, TSB培地による増菌培養も併用した。スクリーニング検査として, DHL寒天培地からのSweep法, またはTSB増菌液からPCR法によりVT遺伝子の検索を行った。ふき取り検体はTSB増菌培養後, PCR法でVT遺伝子を検索するとともに, EHEC O111免疫磁気ビーズで集菌し, さらにTSB増菌培養後PCR法でVT遺伝子の検索を行った。

PCR法でVT遺伝子陽性となった検体の分離平板上の疑わしい集落についてLIM培地, XMブロス, 普通寒天平板を用いて精査した。LIM培地でリシン(-)・インドール(+ )・運動(-), XMブロスでGAL(+ )・MUG(-)・インドール(+ )の生化学的性状と普通寒天からの血清凝集反応で判別を行った。EHEC O111が疑われる分離株について, PCR法でVT遺伝子およびVT型別を実施した。

### 3. パルスフィールド電気泳動法(以下, PFGE法)

2004年度に示された国立感染症研究所新プロトコールを基本に, 供試菌株を制限酵素Xba Iで37°C16時間消化後, CHEF DRⅢ (Bio-Rad)を使用し, 電圧6V/cm, スイッチタイム22.2-54.2秒, 12°Cで20時間電気泳動を行った。サイズマーカーは*Salmonella Braenderup* H9812 PulsNet Standard Strainを供試菌株と同様に処理をして用いた。

得られたPFGE泳動像の解析は解析ソフトFinger Printing II (Bio-Rad)を用いて行った。

表1に施設別の菌検出者と有症者の状況を示す。835名の検便を実施した結果, 幼稚園児13名, 保育園児3名, 小学生7名, 幼稚園児等の5家族8名, 合計31名からEHEC O111:HNM(VT1&2)が検出された。菌検出者の割合は幼稚園17.6%, 保育園2.8%, 小学校1.5%に低くなっていた。一般的には, EHEC感染症の主な症状は下痢, 腹痛, 血便とされているが, 今回の事例では, 症状も軽く無症状者も多く見られた。

なお, 当該幼稚園, 小学校等の拭き取り検査を実施したが, 同型菌は検出されなかった。

これらの分離菌株のPFGE結果を図2, 3に示す。PFGE解析により, 本事例で分離されたO111 31株のうち2株は主要な泳動パターン(パターン1)とは異なる泳動パターン(パターン2, パターン3)を示した。しかし, これらの株はPFGEで異なるパターンを示したものの, 生化学的性状, 毒素タイプはすべて同一であった。Finger Printing IIによるデンドログラム解析による類似度は, パターン1とパターン2では99%以上であった。パターン1, 2とパターン3の類似度92.5%で, 2バンドの脱落が見られたものの, それ以外はよく一致していた。

## 考 察

初発患者を含め, 患者が多発した幼稚園では給食等を供しておらず, 拭き取り検査などからも感染源は特定できなかったが, 分離菌株について実施したPFGE法では, いずれもよく似たPFGEパターンを示し, 同一菌株由来の集団発生であることが示唆された。まず幼稚園で園児同士の直接的な接触を通じて感染が拡がり, 感染園児から各家庭へ, 感染家庭から保育園, 小学校へ感染拡大したものと推察された。小学校等の感染者は, 同一クラスや交流が頻繁な学童間に限定されており, 学校や園のトイレ等を介した感染ではなく, 幼稚園同様に感染者との直接的な接触を通して二次感染したものと考えられた。このように家族への二次感染が複数確認されたことから, 家庭内における二次感染の予防策の啓発も重要と考えられた。

集団発生探知後, 管轄保健所は速やかに教育委員会などの関係機関との連携を図り, 幼稚園, 保育園,

小学校関係者および保護者に対する説明会と検便を実施し、感染者の把握と感染の拡大防止に努めた。また、施設に対しては手洗い消毒設備の整備や手洗い消毒の徹底などについて指導し、感染者宅にも訪問指導・サポートを行った。

近年、全国的にEHECによる大規模な集団感染事例の報告は減少しているが、保育園、老人施設等における集団感染事例は散見される<sup>6), 7), 8), 9)</sup>。要因として、飲食品を媒介した感染以外でヒト→ヒト感染が大きく寄与していることが考えられる。今回の事例においては感染源の究明はできなかったが、施設や家庭内における衛生知識の普及や感染予防対策の強化の必要性を痛感した。

### 参 考

1) Riley LW, Remis RS, Helgerson SD, McGee HB, Wells JG, Davis BR, *et al.* : Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N Engl J Med* 1983 ; 308 : 681-5  
2) Wells JG, Davis BR, Wachsmuth IK, Riley LW, Remis RS, Sokolow R, *et al.* : Laboratory investigation of hemorrhagic colitis outbreaks associated with a rare *Escherichia coli* serotype.

*J Clin Microbiol* 1983 ; 18 : 512-20  
3) Hamano S, Nakanishi Y, Nara T, Seki T, Ohtani T, Oishi T, *et al.* : Neurological manifestation of hemorrhagic colitis in the outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection in Japan. *Acta Paediatr* 1993 ; 82 : 454-8  
4) Michino H, Araki K, Minami S, Takaya S, Sakai N, Miyazaki M, *et al.* : Massive outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection in schoolchildren in Sakai City, Japan. associated with consumption of white radish sprouts. *Am J Epidemiol* 1999 ; 150 : 787-96  
5) 国立感染症研究所 厚生労働省健康局結核感染症課 : <特集> 腸管出血性大腸菌感染症 2008年4月現在 ; 29 : 117-118  
6) 国立感染症研究所 厚生労働省健康局結核感染症課 : 病原微生物検出情報 ; 29 : 123-128  
7) 国立感染症研究所 厚生労働省健康局結核感染症課 : 病原微生物検出情報 ; 28 : 14-15  
8) 国立感染症研究所 厚生労働省健康局結核感染症課 : 病原微生物検出情報 ; 28 : 118-121  
9) 国立感染症研究所 厚生労働省健康局結核感染症課 : 病原微生物検出情報 ; 28 : 139-142

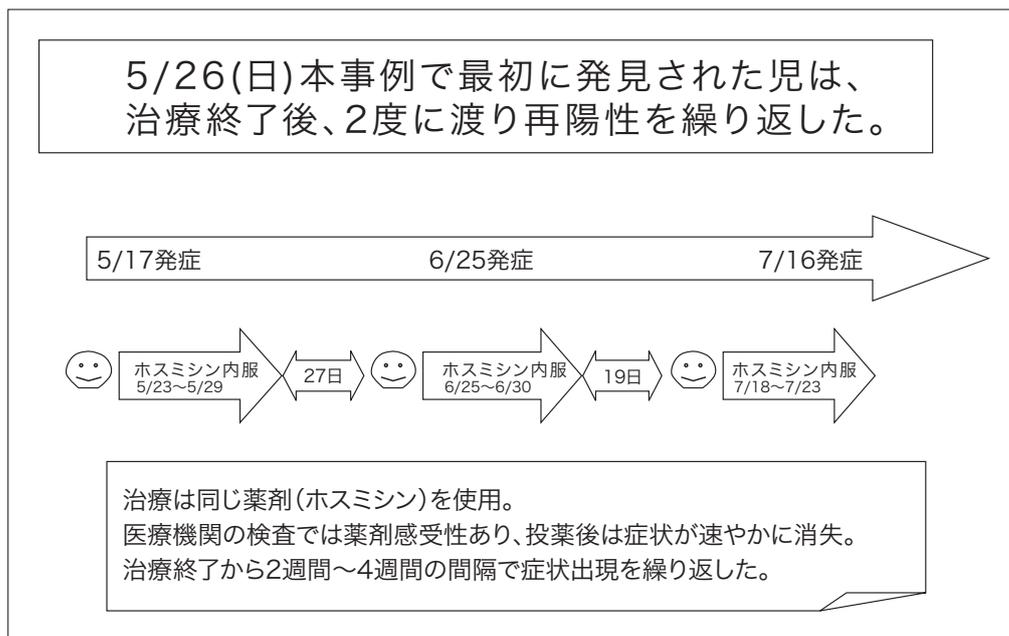


図1 再排菌を繰り返した事例

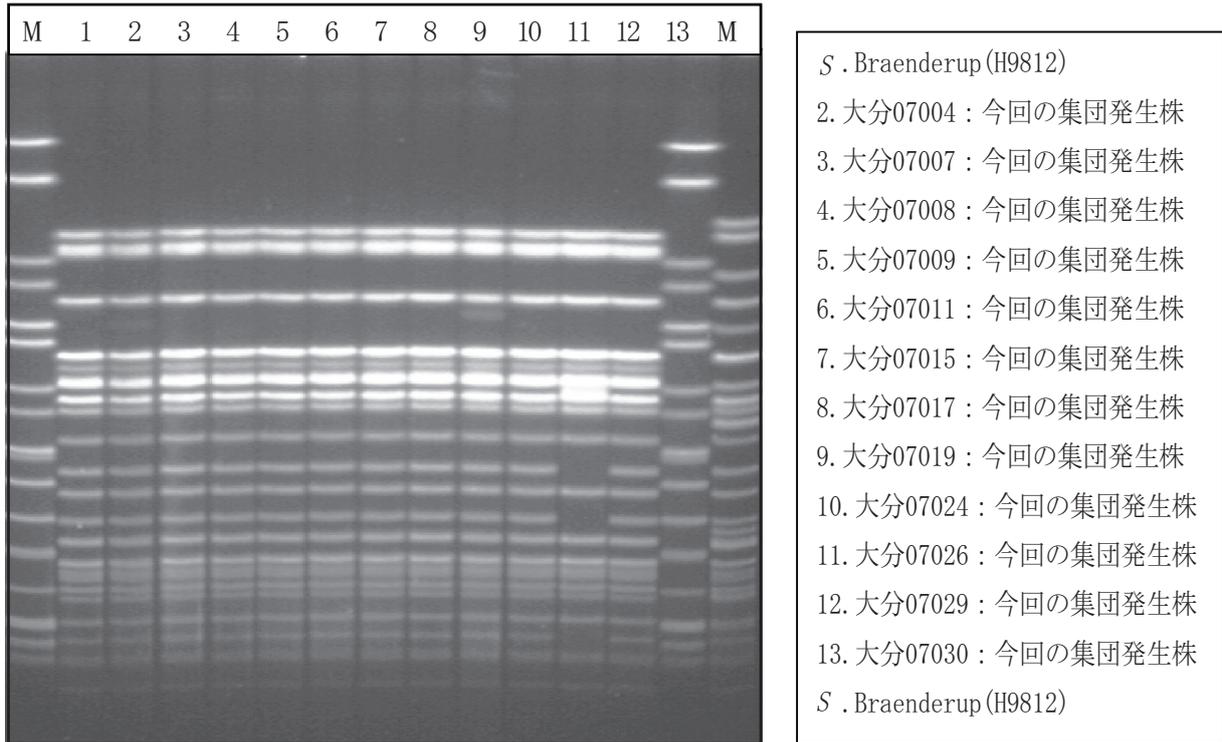


図2 分離菌株O111のPFGE

表1 施設別のO111検出者と有症者の状況

		検査人数	検出者数 (%)	有症者数 (%)
幼稚園	園児	74	13 ( 17.6)	8 ( 61.5)
	職員等	7	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)
保育園	園児	109	3 ( 2.8)	3 ( 100.0)
	職員等	21	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)
小学校	生徒	466	7 ( 1.5)	4 ( 57.1)
	職員等	43	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)
家族等接触者		80	8 ( 10.0)	3 ( 37.5)
合計		800	31 ( 3.9)	18 ( 58.1)

Dice (Opt:1.00%) (Tol: 1.0%~1.0%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%~100.0%]  
O111-VT1+2

O111-VT1+2

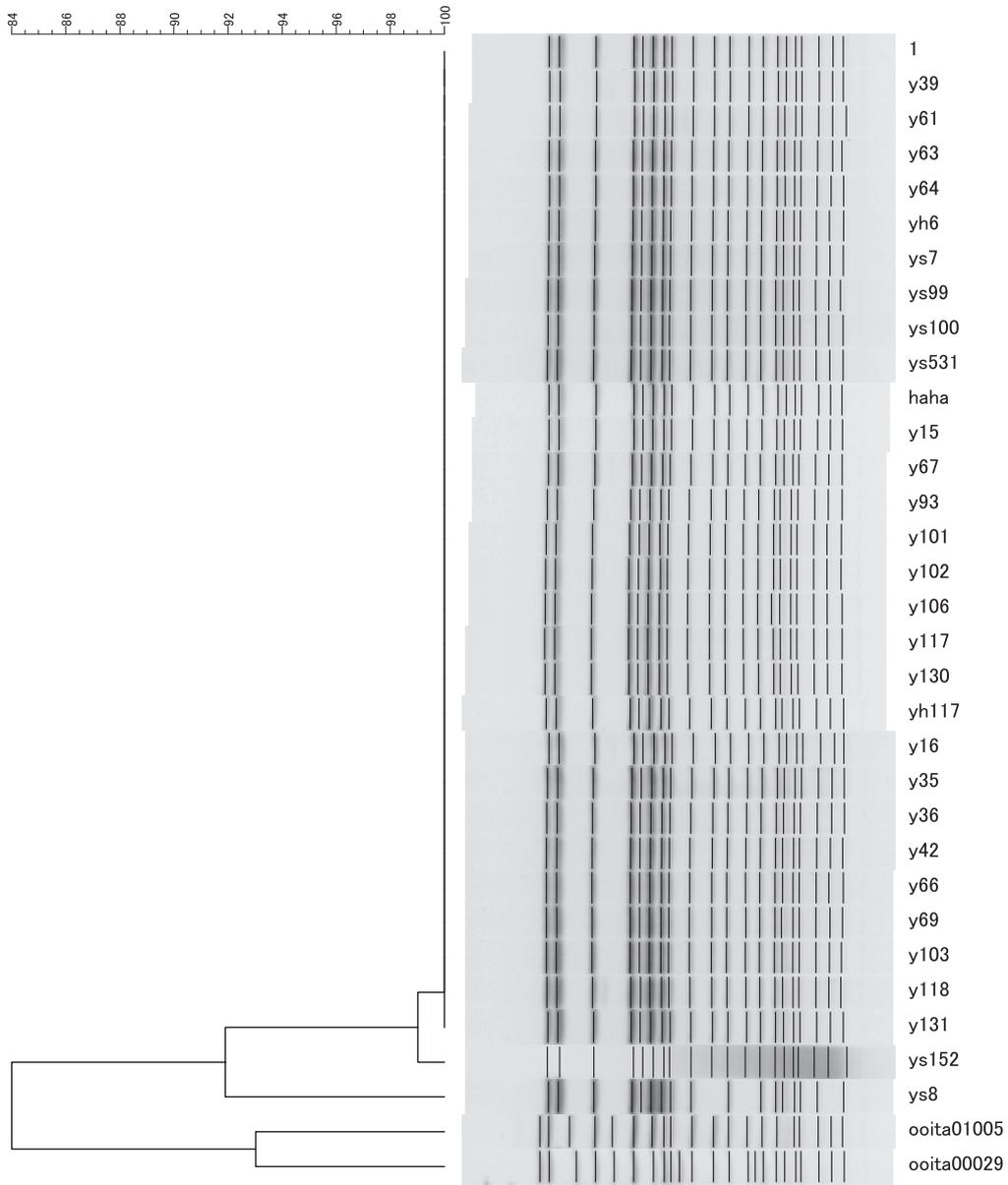


図3 分離株のXba I 切断パターンのクラスター分類

## 大分県における浴用水中の*Legionella*属菌の分離状況

緒方喜久代, 若松正人, 成松浩志, 長谷川昭生<sup>\*1</sup>, 瀧 祐一<sup>\*2</sup>

### Isolation of *Legionella* Species from Public Bath Water in Oita Prefecture, 2004-2006

Ogata Kikuyo, Wakamatsu Masato, Narimatsu Hiroshi  
Hasegawa Akio<sup>\*1</sup> and Fuchi Yuichi<sup>\*2</sup>

Key words : レジオネラ属菌 *Legionella* sp. 浴用水 Public Bath Water

#### 要旨

2004年度から2006年度の3年間、県下152施設の公衆浴場浴槽水等216検体を対象に*Legionella*属菌による汚染状況等について調査した。得られた結果は以下のとおりであった。

1. 浴槽水について、調査した152施設のうち66施設(43.4%)から*Legionella*属菌が検出され、うち59施設(38.8%)が基準値(10cfu/100ml未満)違反であった。
2. 浴槽の種類別では、掛け流し浴槽95施設のうち48施設(50.5%)から、循環式浴槽57施設のうち18施設(31.6%)から*Legionella*属菌が検出された。
3. 分離された*Legionella*属菌の血清型は、*L.pneumophila* SG1, SG3, SG6, SG型別不能などであった。
4. 浴槽水等190検体について培養法と迅速検査法(LAMP法)を比較検討した結果、迅速検査法(-)培養法(+)  
の不一致が24検体(12.6%)であった。

#### はじめに

元来、*Legionella*属菌は湖沼などの淡水や湿った土壤中、温泉水などに存在する自然環境中の常在菌の一種としても知られている。近年では、空調システムの冷却塔や加湿器、循環式浴槽(24時間風呂、ジャグジー、温泉利用施設等)などの人工環境水にも広く生息し、しばしばこれらの水を利用する際に発生する微小な水滴(エアロゾル)を介してヒトに感染する。本菌によって引き起こされるレジオネラ症は、肺炎を起こして命にかかわることもある重症なタイプのレジオネラ肺炎(肺炎型)と発熱するだけの比較的軽症なタイプのポンティアック熱(非肺炎型)がある。1976年の米国フィラデルフィアで発生したレジオネラ症の集団感染事例以来注目されるようになった。一方、日本においても、2002年7月、宮崎県において循環式入浴施設において発生したレジオネラ症集団感染事例<sup>1),2)</sup>をはじめ、数多くの事例が報告されている<sup>3)~6)</sup>。

宮崎県の集団感染事例を契機に、2003年4月1日、大分県公衆浴場法施行条例及旅館業法施行条例を改正し、*Legionella*属菌の自費による検査(以下、自主検査)を含む、入浴施設管理者の自主衛生管理の強化を図ってきた。しかし、2004年に県が実施した抜き打ち検査において、自主検査では*Legionella*属菌が検出されなかった施設についても、基準を上回る*Legionella*属菌が検出された。そこで、入浴施設管理者の自主管理体制の効果を高め、衛生管理のより一層の徹底を図るため、県による行政検査として県保健所が採取した大分県下の公衆浴場浴槽水等について、*Legionella*属菌による汚染状況を調査したので報告する。

また、現行法では検査結果が出るまでに2週間程度を要するが、搬入から数日で結果が得られる手法として、遺伝子増幅を利用した*Legionella*属菌の迅速検査法(LAMP法)についても検討したので、併せて報告する。

※1 西部保健所 ※2 薬務室

## 材料及び方法

### 1. 対象と材料

調査対象は、原則、公衆浴場業又は旅館業の許可を受けている営業施設内にある入浴施設とし、2004年から2006年の間、152施設から採取した浴槽水等216検体を試料とした。採水には高圧滅菌処理をしたポリプロピレン製ボトル(2L)を用い、約2000mlを採取した。また、採取時に残留塩素が認められた検体についてはハイポ処理を直ちに施し、採水当日あるいは翌日に当所へ搬入され、検査に供するまでは冷蔵保存とした。なお、*Legionella*属菌が基準値以上検出された場合、2004年は対策を講じた後に再検査を実施し、2005年からは*Legionella*属菌汚染源の推定に役立てるため湯口水を浴槽水と同時に採水し、検査に供した。

### 2. *Legionella*属菌の検出

*Legionella*属菌の検査法は新版レジオネラ症防止指針に準じて実施した<sup>7),8),9)</sup>。すなわち、検水1000mlをメンブランフィルター(直径47mm, 0.2 $\mu$ m, ADVANTEC社CELLULOSE ACETATE)で吸引ろ過し、このメンブランフィルターを滅菌蒸留水が10ml入った100ml滅菌コニカルチューブに移し、ボルテックスミキサーにて5分間激しく振とうした。次いで、50℃ 20分間の熱処理後、急冷し、この試料を濃縮試料とした。

得られた濃縮試料を原液とし、10倍希釈液、100倍希釈液、1000倍希釈液の各100 $\mu$ lを、各希釈に対して2枚のWYO $\alpha$ 寒天平板(栄研化学)、GVPC寒天平板(自家製)、MWY寒天平板(自家製)に接種した。これらの培地を乾燥しないようにビニール袋に入れ、輪ゴム止めをした後、36℃で7~10日間培養した。2006年からは未処理の検水(以下、非濃縮検体)についても同様の菌数測定を行った。分離平板上に出現した灰白色のレジオネラ様コロニーについて、BCYE $\alpha$ 寒天培地(栄研化学)及びL-システイン不含BCYE培地(自家製)に接種し、36℃、3~5日間培養観察した。L-システイン不含BCYE培地に発育せず、BCYE $\alpha$ 寒天培地のみに発育した菌についてグラム染色、PCR法<sup>9)</sup>で確認検査を行い、*Legionella*属菌と同定した。その同定されたコロニー数をもって検水100mlあたりの*Legionella*属菌数に換算した。ただし、発育したコロニー数が極めて多い場合は20コロニー程度を同定し、その*Legionella*

属菌の割合で全*Legionella*属菌数を計算した。分離培地上に*Legionella*属菌の発育を認めない場合、*Legionella*属菌数は10cfu/100ml未満とした。

分離した菌株は、*Legionella* Latex Test Kit(OXOID)及びレジオネラ免疫血清(デンカ生研)を用いたスライド凝集反応により血清群型別を行った。

### 3. 遺伝子迅速検査法

遺伝子検査法として汎用されているLAMP法について、培養法との比較を行った。*Legionella* Detection Kit E(栄研化学)を用い、Loopampリアルタイム濁度測定装置LA320-Cで測定した。

## 結 果

### 1. *Legionella*属菌の検出状況

浴槽水からの*Legionella*属菌の検出状況を表1に示した。循環式浴槽施設57施設、非循環式浴槽施設95施設の計152施設について調査を行った結果、循環式浴槽施設の18施設(31.6%)、非循環式浴槽施設の48施設(50.0%)、合計66施設(43.4%)から*Legionella*属菌が検出された。これらのうち、当県の条例で定められている「濃縮法で10cfu/100mL未満」という基準値と比較すると、前者では44施設(46.3%)、後者では15施設(26.3%)が基準値を超えていた。

次に、湯口水からの*Legionella*属菌の検出状況を表2に示した。循環式浴槽施設12施設、非循環式浴槽施設28施設の計40施設について調査を行った結果、循環式浴槽施設の5施設(41.6%)、非循環式浴槽施設の9施設(32.1%)、合計14施設(35.0%)から*Legionella*属菌が検出された。

同一施設における浴槽水と湯口水からの*Legionella*属菌の検出状況を比較すると、循環式浴槽施設では、浴槽水から*Legionella*属菌が検出された6施設中4施設(66.7%)の湯口水から、非循環式浴槽施設では、浴槽水から*Legionella*属菌が検出された18施設中8施設(44.4%)の湯口水から*Legionella*属菌が検出された(表3)。

循環式浴槽施設や非循環式浴槽施設の浴槽水から検出される*Legionella*属菌の菌数は、10~100cfu/100mlの範囲が36.6%、100~1000 cfu/100mlの範囲が43.9%であり、全体の約80%を占めていた(表5)。

表4に非濃縮検体と濃縮検体からの*Legionella*属菌の検出状況の比較を示した。濃縮検体からは検出されず、非濃縮検体から検出された事例が、126検体のうち5検体(約4%)で見られた。非濃縮検体からの検出率が29.4%であるのに対し、濃縮検体からの検出率は38.9%であった。

## 2. 遊離残留塩素と*Legionella*属菌

浴槽水の遊離残留塩素濃度(以下、塩素濃度)をみると、循環式浴槽施設の35施設(61.4%)が塩素濃度0.2mg/L以上で管理されていたが、非循環式浴槽施設では3施設(3.2%)しか塩素濃度0.2mg/L以上で管理されていなかった。浴槽水の塩素濃度と*Legionella*属菌の検出状況の関係を表5に示した。塩素濃度が1 mg/L以上だった12施設では*Legionella*属菌は検出されなかった。1 mg/L以下で0.2mg/L以上保っていた27施設では、8施設(29.6%)から検出された。一方、0.2mg/L未満だった107施設では、53施設(49.5%)から*Legionella*属菌が検出され、1000cfu/100ml以上検出された施設が6施設(3.9%)あった。

## 3. *Legionella*属菌の血清型別

検査に供した152施設の浴槽水および湯口水から分離された150株(代表抽出)の*Legionella*属菌の血清型別結果を表6, 7に示した。検体によって分離数が異なり、血清型別に供した菌株は1検体あたり1~70株であった。同一検体から分離された同一血清型を有する株は複数株検出されても、1株としてカウントした。150株のうち142株(94.7%)は*L.pneumophila*であった。型別されたうち、血清型の多い順にSG3(17.4%), SG6(16.0%), SG1(10.7%)であった。また、1施設から4種類以上の血清型が検出される場合もあった(表8)。

次に、同一施設の浴槽水と湯口水から検出された*Legionella*属菌の血清型別結果を表7に示した。おおむねの検体において、浴槽水と湯口水から検出される*Legionella*属菌の血清型は一致していた。

## 4. 遺伝子迅速検査法(LAMP法)と培養法の比較

検査に供した190検体のLAMP法と培養法の検査結果を表9に示した。LAMP(+)/培養(+), LAMP(-)/培養(-)の両検査結果一致したものが136検体(71.6%)であった。LAMP(+)/培養(-)の不一致が30検体(15.8%), LAMP(-)/培養(+))の不一致が24検体(12.6%)であった。

## 考 察

本調査の結果、*Legionella*属菌の検出率は43.4%で他の調査結果<sup>10), 11), 12), 13)</sup>と同様の結果となった。

入浴施設を介したレジオネラ症集団感染事例が続発したことを受け、平成15年2月に公衆浴場における衛生管理要領等が改正され、*Legionella*属菌にかかる規制や浴槽水の消毒方法が明記され、これにより循環式浴槽施設においては塩素消毒の徹底が図られ、*Legionella*属菌の汚染率は減少してきた。一方、安全だと思われていた循環系を持たない、非循環式浴槽水の50.5%から*Legionella*属菌が検出されたことから循環式浴槽施設と同様にレジオネラ対策が必要であろう。しかし、今回調査に供した非循環式浴槽施設のほとんどは、いわゆる掛け流し式温泉で、その泉質が様でないことや常時給湯しオーバーフローしている掛け流しという特性から塩素消毒を行わないところが多く<sup>14)</sup>、ほとんどの施設で塩素による消毒は行われていなかった。現在までの厚生労働省からの通知では、塩素消毒を用いた管理手法が中心となっているが、塩素管理下では*L.pneumophila* SG1が浴槽水中で優性化しているとの報告<sup>15)</sup>もあることから、塩素消毒に頼らない管理手法の早期確立が望まれる。従前より、環境水から検出される*L.pneumophila*の血清群には特徴があり、冷却塔からはSG1、浴槽水からはSG4~6が主に分離される<sup>11)</sup>とされてきたが、本調査の結果、SG1, SG3, SG6で約40%を占めており、その傾向は遠藤ら<sup>15)</sup>の報告と一致している。今回、結果としては示さなかったが、分離された*L.pneumophila* SG1の代表株についてPFGE法で遺伝子解析を行った結果、同時期の同一施設由来でも異なるPFGEパターンを示したことから、同一施設の同じ血清群であっても複数の遺伝子型が存在することが示唆された<sup>16)</sup>。また、「新版レジオネラ症防止指針」の<付録>1 環境水のレジオネラ属菌検査方法に【1.3接種の項目に、菌数を予測できないので、濃縮検体と非濃縮検体を同時に検査する】と記載されているため、濃縮検体と非濃縮検体から同時に*Legionella*属菌の検出を試みた。その結果、濃縮検体から*Legionella*属菌が検出されず、非濃縮検体からのみ*Legionella*属菌が検出された場合があり、濃縮法のみでは*Legionella*属

菌を見逃す危険性がある。今後、濃縮したフィルターから効率的に*Legionella*属菌を剥がす方法などを含め、分離培養法の見直し・検討を行う必要がある。

一方、迅速遺伝子検査法としてのLAMP法は民間検査機関においても汎用されているが、今回の調査で190検体中培養法(+)LAMP法(-)の不一致が24検体(12.6%)もあり、現状では培養法の併用が不可欠であろう。しかし、施設ごとに設備構造が異なり、施設に応じた適切な衛生管理を迅速に行うためには、迅速遺伝子検査法としてのLAMP法は有用な手段である。導入に向けて、早期の原因究明・解決が求められる。

さらに、臨床検体からの*Legionella*属菌の分離は困難な場合が多かったが、2003年4月、レジオネラ症の診断に尿中抗原検出キットが保険適用になったことで検査件数そのものが増加し、以前は、原因不明の市中肺炎とされていた一部の肺炎患者がレジオネラ症と診断されるようになり、結果として、レジオネラ症は増加傾向<sup>17)</sup>に繋がっていると考えられる。しかし、感染源を特定し、感染防止対策を講じるうえで、臨床検体からの*Legionella*属菌の分離・同定は不可欠で、医療機関との連携を図り、菌株確保に向けたより一層の努力が必要と考える<sup>5), 6)</sup>。

## 謝 辞

本調査を実施するにあたり、検体採取にご協力いただきました入浴施設および各保健所ならびに食品安全・衛生課の関係各位に深謝します。

## 参 考

- 1) 宮崎県福祉保健部：日向サンパーク温泉「お船出の湯」におけるレジオネラ症集団発生事例報告書，2003.
- 2) 岡田美香，河野喜美子，倉文明，前川純子，渡辺治雄，八木田健司，遠藤卓郎，鈴木泉：循環式入浴施設における本邦最大のレジオネラ症集団感染事例 I. 発症状況と環境調査，感染症学雑誌，79，365-374
- 3) 杉山寛治，西尾智裕，郷田淑明，張 凡非，増田教子，秋山真人，他：生活環境水のレジオネラ汚染およびレジオネラ症患者調査-循環濾過式浴槽

水を感染源とするレジオネラ症集団感染事例と検査-，静岡県環境衛生科学研究所報告，2000；43：1-4.

- 4) Nakamura H, Yagyu H, Kishi K, Tsuchida F, Ohishi S, Yamaguchi K et al.: A large outbreak of legionnaires disease due to an inadequate circulating and filtration system for bath water epidemiologic manifestations. Intern Med 2003；42：806-11
- 5) 国立感染症研究所 厚生労働省健康局結核感染症課：病原微生物検出情報；28：144-145
- 6) 国立感染症研究所 厚生労働省健康局結核感染症課：病原微生物検出情報；29：193-194
- 7) 厚生省生活衛生局企画課監修：新版レジオネラ症防止指針，財団法人ビル管理教育センター，平成11年.
- 8) 日本水道協会：上水道試験法，1993，日本水道協会，東京
- 9) 国立感染症研究所 厚生省保健医療局・結核感染症課：希少感染症診断技術研修会資料，平成10年度.
- 10) 鈴木敦子，市瀬正之，松江隆之，天野祐次，寺山 武，泉山信司，遠藤卓郎：各種生活環境水からのレジオネラ属菌検出状況-1996年4月から2000年11月まで-，感染症学雑誌，76，703-710
- 11) 笹原武志，菊野理津子，奥田舜治，関口朋子，佐藤義則，高山陽子，青木正人，井上松久：温泉水における*Legionella*属菌汚染と泉質に関する調査・研究，感染症学雑誌，78，545-553
- 12) 楠木くみ子，岩谷美枝，花岡 暉，石上 武，矢野一好：多摩地域における入浴施設水のレジオネラ属菌汚染緊急調査とその対策事例(平成13年度)，東京衛研年報，53，14-19
- 13) 磯部順子，綿引正則，清水美和子，嶋 智子，木全恵子，倉田 毅：富山県における浴用水中の*Legionella*属菌の分離状況，富山衛研年報，30，110-114
- 14) 井上博雄：厚生労働省科学研究費補助金(地域健康危機管理研究事業)掛け流し式温泉における適切な衛生管理手法の開発等に関する研究 平成17年度～平成18年度 総合研究報告書，2007.
- 15) 遠藤卓郎：厚生労働省科学研究費補助金(健康科学総合研究事業)循環式浴槽における浴用水の浄化・消毒方法の最適化に関する研究 平成17年

度 総括・分担研究報告書, 2006.

16) 寺嶋 淳: 厚生労働省科学研究費補助金(新興・再興感染症事業)広域における食品由来感染症を迅速に探知するために必要な情報に関する研究 平成18年度 総括・分担研究報告書, 2007.

17) 国立感染症研究所 感染症情報センター提供.

表1 浴槽水からの*Legionella*属菌の検出状況

	施設数	検 出		基準値以上	
		施設数	検出率(%)	施設数	検出率(%)
非循環式浴槽	95	48	50.5	44	46.3
循環式浴槽	57	18	31.6	15	26.3
計	152	66	43.4	59	38.8

表2 湯口水からの*Legionella*属菌の検出状況

	施設数	検 出		基準値以上	
		施設数	検出率(%)	施設数	検出率(%)
非循環式浴槽	28	9	32.1	9	32.1
循環式浴槽	12	5	41.6	4	33.3
計	40	14	35.0	13	32.5

表3 同一施設における浴槽水と湯口水からの*Legionella*属菌検出状況

	浴槽水		湯口水	
	<i>Legionella</i> 属菌		<i>Legionella</i> 属菌	
非循環式浴槽	検出	18施設	検 出	8施設
			不検出	10施設
循環式浴槽	検出	6施設	検 出	4施設
			不検出	2施設

表4 非濃縮検体と濃縮検体からの*Legionella*属菌の検出比較

		濃 縮 検 体		計
		検 出	検出せず	
非濃縮検体	検出	32	5	37
	検出せず	17	72	89
計		49	77	126

\*10cfu/100mlを基準値として「検出」, 「検出せず」をカウントした。

表 5 遊離残留塩素濃度別*Legionella*属菌検出状況

非循環式浴槽							循環式浴槽							
塩素濃度 (mg/L)	検査 施設数	<i>Legionella</i> 属菌 検出施設数	検出菌数				塩素濃度 (mg/L)	検査 施設数	<i>Legionella</i> 属菌 検出施設数	検出菌数				
			~9	10~99	100~999	1000~				~9	10~99	100~999	1000~	
≥ 2							3							
1.5						1.5	5							
1.2						1.2								
1.0	1					1.0	3							
0.9						0.9	1							
0.8						0.8	3	2	1	1				
0.7						0.7	2							
0.6						0.6	4	1	1					
0.5						0.5	3	1				1		
0.4	1	1		1		0.4	4							
0.3	1					0.3	6	2		2				
0.2						0.2	1	1		1				
0.1	2	1			1	0.1	5	3		1		2		
0.1 <	7	2		1	1	0.1 <	10	3		1		2		
0	77	39	3	12	20	4	0	6	5	1	1	1	1	2
不明	6	5	1	3	1		不明	1						
計	95	48	4	17	23	4	計	57	18	3	7	6	2	
	%	100	8.3	35.5	47.9	8.3		%	100	16.7	38.9	33.3	11.1	

表 6 分離菌株の血清型別

血 清 型	非循環式浴槽		循環式浴槽		計 (%)
	浴槽水 (%)	湯口水 (%)	浴槽水 (%)	湯口水 (%)	
<i>L.pneumophila</i> serogroup 1	10 (10.9)	3 (17.6)	3 (9.1)		16 (10.7)
<i>L.pneumophila</i> serogroup 2	3 (3.3)		2 (6.0)		5 (3.3)
<i>L.pneumophila</i> serogroup 3	17 (18.7)	1 (5.9)	5 (15.2)	3 (33.3)	26 (17.4)
<i>L.pneumophila</i> serogroup 4	6 (6.6)	2 (11.8)	3 (9.1)		11 (7.3)
<i>L.pneumophila</i> serogroup 5	6 (6.6)	1 (5.9)	5 (15.2)		12 (8.0)
<i>L.pneumophila</i> serogroup 6	16 (17.6)	4 (23.5)	4 (12.1)		24 (16.0)
<i>L.pneumophila</i> serogroup UT	27 (29.7)	5 (29.4)	11 (33.3)	5 (55.6)	48 (32.0)
<i>L.dumoffii</i>					
<i>L.micdadei</i>					
<i>L.gormanii</i>	1 (1.1)	1 (5.9)			2 (1.3)
<i>L.bosemanii</i>	1 (1.1)				1 (0.7)
<i>Legionella</i> spp.	4 (4.4)			1 (11.1)	5 (3.3)
計	91 (100)	17 (100)	33 (100)	9 (100)	150 (100)

表7 分離菌株(温泉水由来)の血清型別

血 清 型	非循環式浴槽		循環式浴槽		計 (%)
	浴槽水 (%)	湯口水 (%)	浴槽水 (%)	湯口水 (%)	
<i>L.pneumophila</i> serogroup 1	9 (10.5)	3 (17.6)	1 (25.0)		13 (12.2)
<i>L.pneumophila</i> serogroup 2	3 ( 3.5)				3 ( 2.8)
<i>L.pneumophila</i> serogroup 3	17 (19.8)	1 ( 5.9)			18 (16.8)
<i>L.pneumophila</i> serogroup 4	6 ( 6.9)	2 (11.8)			8 ( 7.5)
<i>L.pneumophila</i> serogroup 5	6 ( 6.9)	1 ( 5.9)			7 ( 6.5)
<i>L.pneumophila</i> serogroup 6	16 (18.6)	4 (23.5)	1 (25.0)		21 (19.6)
<i>L.pneumophila</i> serogroup UT	24 (27.9)	5 (29.4)	2 (50.0)		31 (29.0)
<i>L.dumoffii</i>					
<i>L.micdadei</i>					
<i>L.gormanii</i>	1 ( 1.2)	1 ( 5.9)			2 ( 1.9)
<i>L.bosemanii</i>	1 ( 1.2)				1 ( 0.9)
<i>Legionella</i> spp.	3 ( 3.5)				3 ( 2.8)
計	86 ( 100)	17 ( 100)	4 ( 100)	0 ( 100)	107 ( 100)

表8 同一施設の浴槽水と湯口水から検出された*Legionella*属菌数および血清型別

	浴 槽 水				湯 口 水	
	施設 No.	<i>Legionella</i> 属 菌数	血清型	塩素 濃度	<i>Legionella</i> 属 菌数	血清型
非循環式浴槽	1	500cfu	SG6	0.0	15cfu	SG6
	2	500cfu	SGUT	0.1	750cfu	SG4,SGUT
	3	100cfu	SG5,SGUT	0.0	10cfu	SG1,SG5,SGUT
	4	300cfu	SGUT	0.0	500cfu	SGUT
	5	50cfu	SG3,SG6	不明	100cfu	SG3
	6	5cfu	SG3,SG5	不明	10cfu	SG6,SGUT
	7	300cfu	SG4,SG6,SGUT, <i>L.gormanii</i>	0.0	135cfu	SG1,SG4,SG6,SGUT, <i>L.gormanii</i>
	8	250cfu	SG1,SG3,SGUT	不明	30cfu	SG1
循環式浴槽	1	50cfu	SG3	0.3	40cfu	SG3,SGUT
	2	20000cfu	SG3,SG5,SGUT	0.0	9900cfu	SG3,SGUT
	3	50cfu	SG4,SGUT	0.1	100cfu	SG3,SGUT
	4	15cfu	SG4	0.8	1500cfu	SGUT, <i>L.sp</i>

表 9. 迅速検査法 (LAMP法) と培養法の比較結果

	浴槽水 (%)		湯口水 (%)		計 (%)	
	LAMP(+)	LAMP(-)	LAMP(+)	LAMP(-)	LAMP(+)	LAMP(-)
培養(+)	40 (26.7)	21 (14.0)	11 (27.5)	3 ( 7.5)	51 (26.8)	24 (12.6)
培養(-)	27 (18.0)	62 (41.3)	3 ( 7.5)	23 (57.5)	30 (15.8)	85 (44.8)

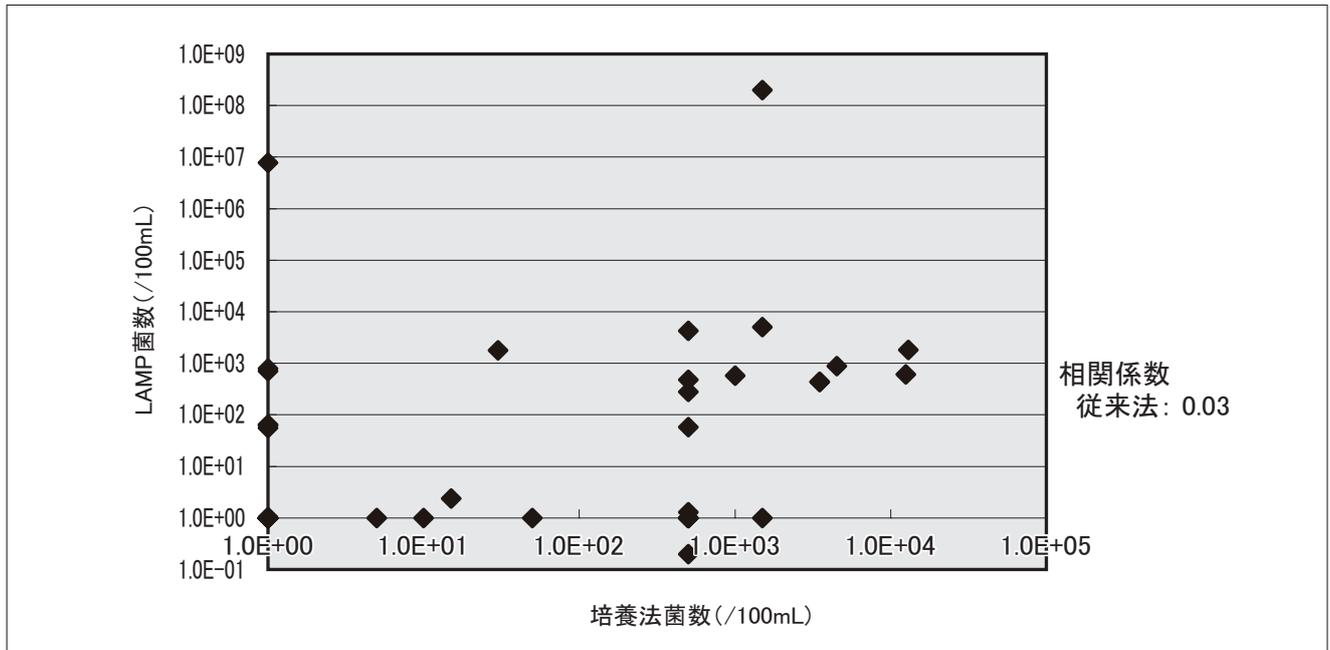


図 1 培養菌数とLAMP法で得られた定量値の相関

## 健康食品からのヒドロキシホンデナフィル検出事例について

曾根聡子, 武田亮, 森崎澄江, 溝腰利男, 後藤成一, 山下秀門

### Detection of Hydroxyhongdenafil in dietary supplements

Satoko Sone, Ryou Takeda, Sumie Morisaki, Toshio Mizokoshi,  
Seiichi Goto, Hideto Yamashita

Key words : シルデナフィル類似成分 analogue of Sildenafil, ヒドロキシホンデナフィル hydroxy hongdenafil, 液体クロマトグラフィー／質量分析計 LC/MS/MS

#### 要旨

大分県内の薬店で販売されていたいわゆる健康食品から、勃起不全治療薬のシルデナフィル類似物質であるヒドロキシホンデナフィルが検出された。

当初、ヒドロキシホンデナフィル標準品を保有していなかったため、液体クロマトグラフィー／質量分析計 (LC/MS/MS) でフラグメントイオンを確認し、成分の推定を行った。

#### はじめに

近年、痩身効果や強壮効果を標榜、暗示するいわゆる健康食品から医薬品成分およびその類似成分が検出される事例が相次いでおり<sup>1)</sup>、大分県でも買上調査を実施している。2007年度に実施した調査で、フォトダイオードアレイ検出器付き高速液体クロマトグラフィー (HPLC-PDA) および液体クロマトグラフィー／質量分析計 (LC/MS) によるスクリーニングの結果、ヒドロキシホンデナフィルと推定されるピークが検出される事例があった。最終的な同定には、国立医薬品食品衛生研究所から供与されたヒドロキシホンデナフィルを標準品として用いたが、標準品がない状況でも液体クロマトグラフィー／質量分析計 (LC/MS/MS) による成分の推定が可能であったことから、その概要について報告する。

#### 試料および方法

##### 1 試料

薬務室が大分県内の薬店で買い上げた、強壮効果を暗示している食品を使用した。

##### 2 標準品

国立医薬品食品衛生研究所から供与されたシルデナフィル、ホンデナフィル、バルデナフィル、タダラフィル、キサントアントラフィルを使用した。スクリーニング試験後、ヒドロキシホンデナフィル、ニトロデナフィル、イミダゾサガトリアジノンも供与を受け、使用した。

##### 3 試験溶液の調製

###### 3.1 スクリーニング試験溶液

カプセル内容物200mgに1%ギ酸水溶液／アセトニトリル (1/4) 2 mlを加えて5分間超音波抽出を行った。これを3,000rpmで5分間遠心分離して上澄1mlをとり、これにアセトニトリル／5mMギ酸アンモニウム緩衝液 (pH3.5) (25/75) 1 mlを加えて膜ろ過したものをスクリーニング試験溶液とした。<sup>2)3)</sup>

###### 3.2 確認試験溶液

カプセル内容物200mgに28%アンモニア水0.5mlを加えて混和後、酢酸エチル 2 mlを加えて10分間振とう抽出し、これを3,000rpmで5分間遠心分離して酢酸エチル層を分取、残さに再度酢酸エチ

ル 2 mlを加えて同様に操作した。分取した酢酸エチル層を合わせ、減圧濃縮及び窒素ガスにより乾固させた後、メタノール10mlで溶解したものを確認試験溶液とした。<sup>4)</sup>

#### 4 測定条件

##### 4.1 スクリーニング試験

装置 : Agilent technologies HP-1100シリーズ (LC, PDA部) にWaters ZQ2000 (MS部) を連結したもの

カラム : (財)化学物質評価研究機構製 L-column HB (2.1×150mm, 5 μm)

移動相 : (A液) アセトニトリル/5mMギ酸アンモニウム緩衝液 (pH3.5) 25/75

(B液) アセトニトリル

グラジエント条件

(A液/B液) 100/0 (0-3min) -70/30 (13-20min) -50/50 (30-50min)

流速 : 0.3ml/min

カラム温度 : 40°C

PDA検出器 : 測定波長 200nm-400nm

MS検出器 : ESIポジティブモード, SCAN(m/z 50-600)

コーン電圧 : 30V

##### 4.2 確認試験

装置 : Agilent technologies HP-1100シリーズ (LC部) にApplied Biosystems API2000 (MS/MS部) を連結したもの

カラム : (財)化学物質評価研究機構製 L-column HB (2.1×150mm, 5 μm)

移動相 : (A液) 0.1%ギ酸溶液

(B液) 0.1%ギ酸含有アセトニトリル溶液

グラジエント条件

(A液/B液) 80/20 (0min) -50/50 (10-50min)

MS/MS測定条件 : ESIポジティブモード, product ion scan

コリジョンエネルギー(CE) : 30,40,50,100V

イオンスプレー電圧 (IS) : 5500V

イオンソース温度 : 500°C

オリフィスプレート電圧 (DP) : 91V

## 結 果

### 1 スクリーニング試験

シルデナフィル等標準品の供与を受けた5成分に該当するピークは検出されなかった。

つぎに、ホモシルデナフィル等の国内で検出事例のあったその他の12成分(表1)について、[M+H]<sup>+</sup>に該当するイオンの有無を確認したところ、m/z 355 (ゲンデナフィル), 483 (ヒドロキシホンデナフィル), 313 (イミダゾサガトリアジノン), 358 (ニトロデナフィル) でピークが検出された。これらのピークのUVスペクトルを通知に示されているスペクトルパターンと比較したところ、m/z 483のピークはヒドロキシホンデナフィルと類似していたが、その他の3ピークは一致しなかった。また、シルデナフィルと同じくUV290nmに吸収をもつピークがあったためUVスペクトルを確認したが、これまでに報告されている成分と類似しているものはなかった。

### 2 確認試験

スクリーニング試験で検出されたm/z 483のピークについて、当所でヒドロキシホンデナフィル標準品を所有していなかったことから、LC/MS/MSのコリジョンエネルギーを変化させてフラグメントイ

表1 シルデナフィル類似成分のLC/MS測定イオン

成 分 名	Exact mass	測定イオン(m/z)
シルデナフィル	474.21	475
ホンデナフィル	466.27	467
バルデナフィル	488.22	489
タダラフィル	389.14	390
キサントアントラフィル	389.16	151
ホモシルデナフィル	488.22	489
ヒドロキシホモシルデナフィル	504.22	505
アミノタダラフィル	390.13	391
プソイドバルデナフィル	459.19	460
ヒドロキシホンデナフィル	482.26	483
ゲンデナフィル	354.17	355
ノルネオシルデナフィル	459.19	460
イミダゾサガトリアジノン	312.16	313
クロロプレタダラフィル	426.1	427
カルボデナフィル	452.25	453
ニトロデナフィル	357.14	358
ウデナフィル	516.25	517

オンを測定し、ホンデナフィルと比較した。その結果、図1のとおり電圧の変化に伴う両成分のパターン変化は類似しており、さらに石原島らの報告<sup>5)</sup>のとおり、サンプルには図2に示すm/z 143のフラグメントイオンが検出されたことから、ヒドロキシホンデナフィルであると推定した。

その後、国立医薬品食品衛生研究所から標準品の供与を受けて確認した結果、図3のとおり、溶出時間、UVスペクトル、MSフラグメントパターンが一致したことから、今回検出された成分はヒドロキシホンデナフィルであると確定した。

### 考 察

勃起不全治療薬であるシルデナフィル等の構造の一部を変化させた新たな類似成分が次々と検出され

ており、2008年7月には、国内で検出されたシルデナフィル等類似成分は22成分<sup>1)</sup>にのぼっている。今回は標準品と比較することができたため確認が容易であったが、今後も標準品のない成分が検出されることが予想されるなか、LC/MS/MSによるフラグメントパターンの確認は成分を推定するうえで有効な手段であると考えられる。

### 謝 辞

ヒドロキシホンデナフィルの確認にあたり、標準品を供与していただいた国立医薬品食品衛生研究所生薬部 合田幸広部長に深謝いたします。

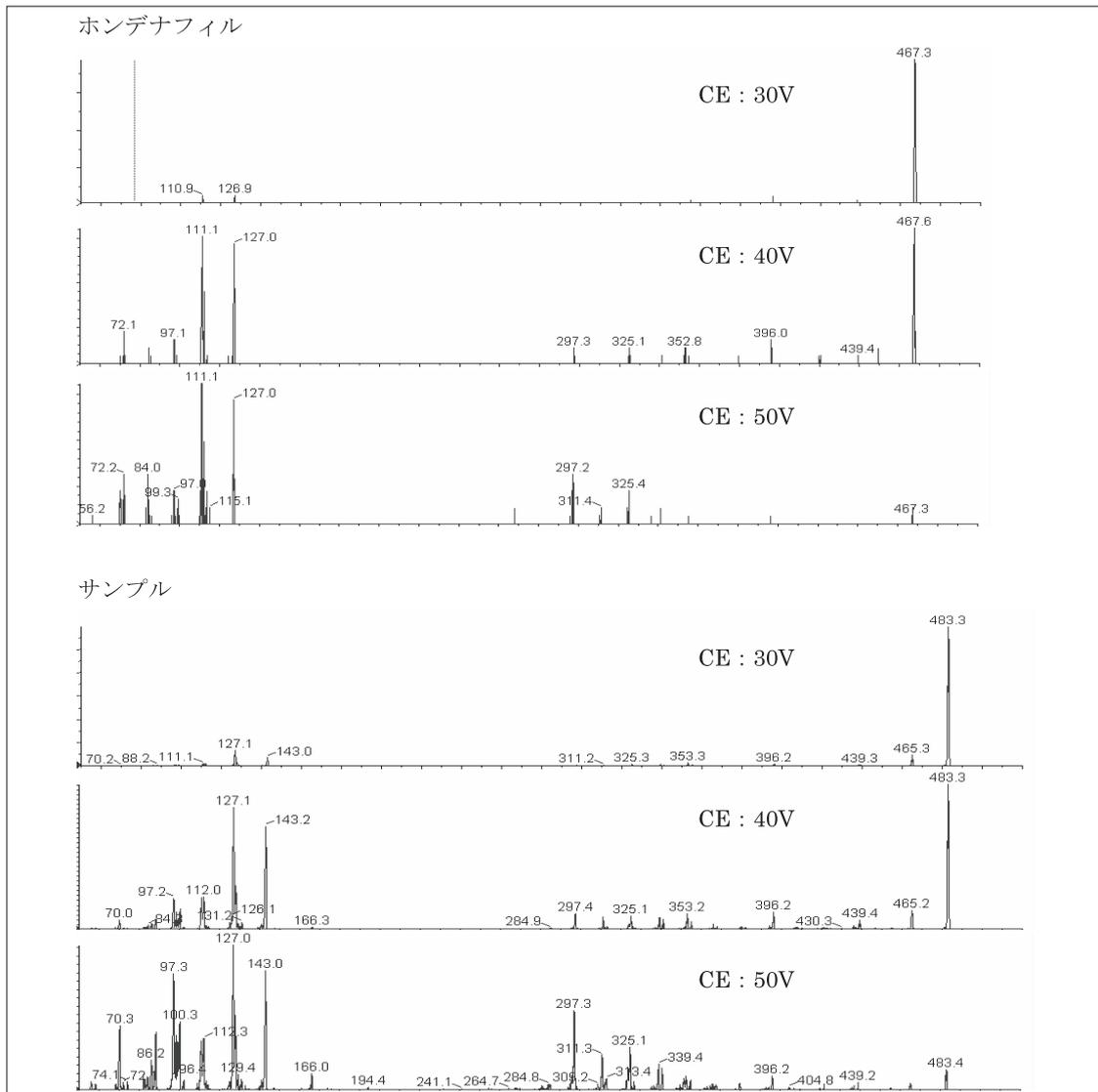


図1 ホンデナフィル標準品およびサンプルのフラグメントイオン

参考文献

- 1) 厚生労働省医薬食品局監視指導・麻薬対策課無承認無許可医薬品情報<http://www.mhlw.go.jp/kinkyu/diet/musyounin.html>
- 2) 厚生労働省医薬食品局監視指導・麻薬対策課長通知 薬食監麻発第0822010号「ウデナフィル分析方法について」平成19年8月22日
- 3) 厚生労働省医薬食品局監視指導・麻薬対策課長通知 薬食監麻発第0822011号「ニトロデナフィル分析方法について」平成19年8月22日
- 4) 厚生労働省医薬食品局監視指導・麻薬対策課長通知 薬食監麻発第0726001号「ホンデナフィル類の定性および定量方法について」平成18年7月26日
- 5) 石原島栄二, 角野文代, 世取山守, 鎌倉浩之, 合田幸広: 「強壮・強精など男性機能回復を暗示する健康食品からの無承認無許可医薬品成分の検

出事例について」, 栃木県保健環境センター年報, 12, 48-52 (2007)

- 6) 守安貴子, 重岡捨身, 蓑輪佳子, 岸本清子, 安田一郎: 「健康食品中に含有されていた新規シルデナフィル類似体について」, 東京健安研七年報, 55, 73 (2004)

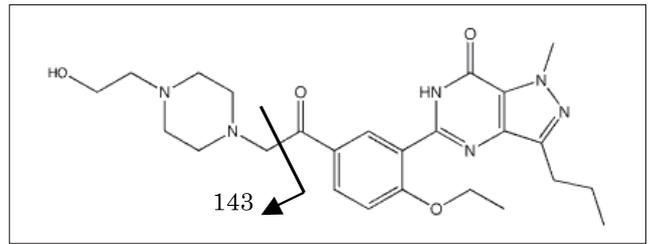


図2 ヒドロキシホンデナフィル (Mw482.26) 構造式

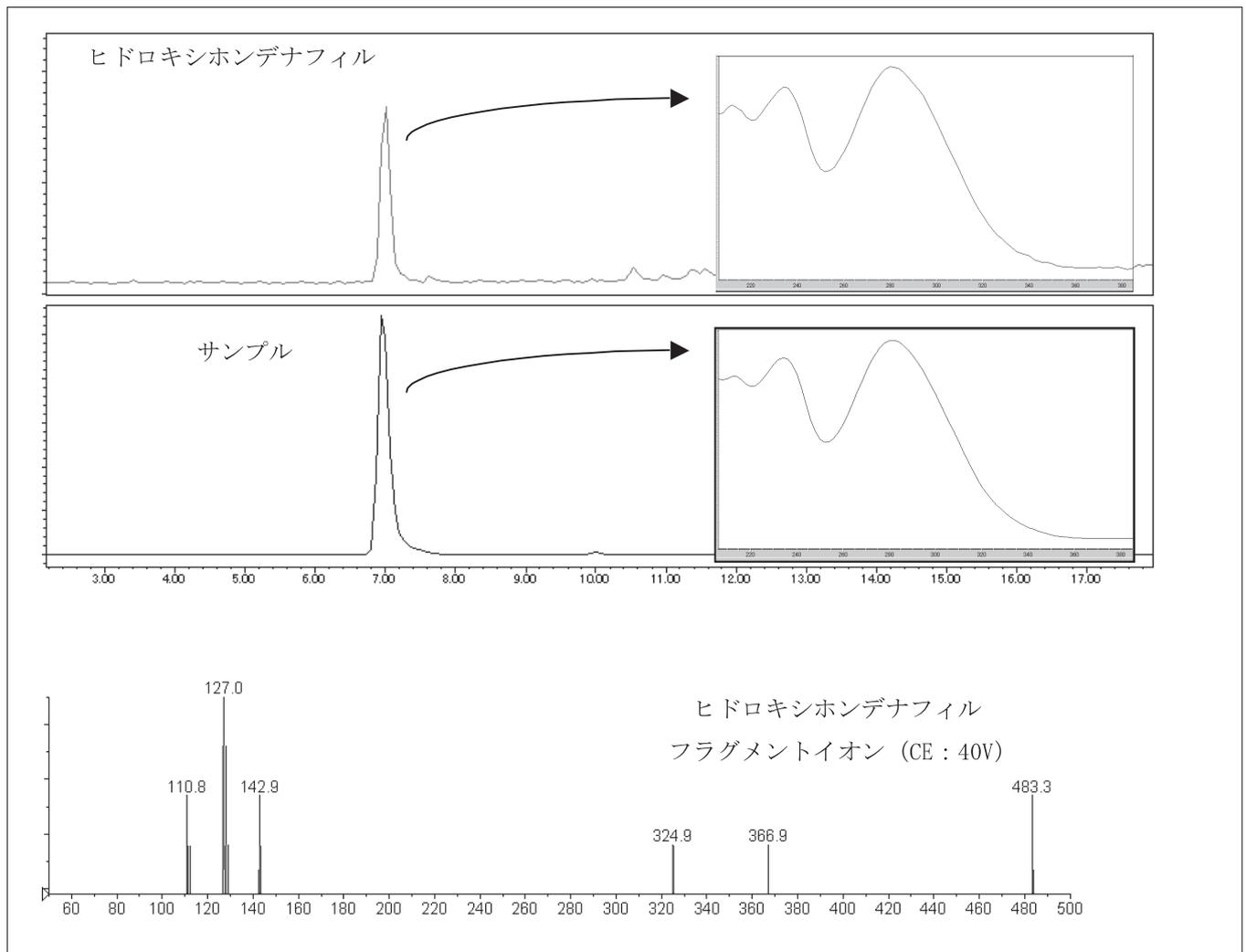


図3 ヒドロキシホンデナフィル標準品とサンプルの比較