

Ⅱ 調 査 研 究 報 告

資 料

富山県における新生児マススクリーニングの成果について (2022年度)

九曜 雅子 湊山 亜未 高岡 美紗 新保 孝治
板鼻 広美¹

Neonatal Mass Screening Results in Toyama Prefecture
(Apr. 2022–Mar. 2023)

Masako KUYO, Ami MINATOYAMA, Misuzu TAKAOKA, Koji SHINBO,
and Hiromi ITAHANA

目的: 先天性代謝異常マススクリーニング（新生児マススクリーニング：以下「スクリーニング」と表記）は、1977年4月に厚生省母子保健事業の一環として導入された。実施主体は都道府県および政令市で、代謝異常症等の早期発見、早期治療により心身障害の発生を防止・軽減することを目的としている。

富山県では、1977年10月より富山県先天性代謝異常等検査事業実施要綱に基づき、検査料公費負担で、フェニルケトン尿症等を対象に検査を実施してきた。厚生労働省の通知[1]を受けて、本県では2014年3月からタンデムマス法を導入し、スクリーニングの対象疾患は19疾患となった。さらに、2018年4月から1疾患追加[2]されて、現在は、20疾患（表1）が検査の対象となっている。

本県では、タンデムマス法の導入に伴い、新たに、富山県先天性代謝異常等検査事業マニュアル[3]を作成した。また、富山県先天性代謝異常等検査事業部会が設置され、検査やフォローアップ体制、普及啓発、保健指導等について検討し、事業全体の評価を行っている。

本報では、2022年度のスクリーニング結果について報告する。

実施方法：

1. 対象疾患

アミノ酸代謝異常症5疾患、有機酸代謝異常症7疾患、脂肪酸代謝異常症5疾患、ガラクトース血症、先天性甲状腺機能低下症および先天性副腎過形成症の計20疾患（表1）を対象とした。

2. 対象者

県内で出生した新生児（里帰り児含む）のうち、

保護者が「先天性代謝異常等検査申込書兼同意書」を提出した者を対象とした。

なお、「先天性代謝異常等検査申込書兼同意書」には、検査終了後の血液ろ紙を検査法の改良等を使用することに対する同意の有無を記入する欄を設けた。また、随時、同意の撤回もできるような様式とした[4]。

3. 検査期間

2022年4月から2023年3月までの1年間の検査実施状況をまとめた。

4. スクリーニング方法

(1) 検査検体

県内の各医療機関において採血されたろ紙血液を用いた。

(2) 検査方法

1) アミノ酸代謝異常症(5疾患)、有機酸代謝異常症(7疾患)、脂肪酸代謝異常症(5疾患)

タンデムマス法（質量分析装置：Sciex 社製 TQ4500, LC 装置：SHIMADZU 社製 Prominence-20 シリーズ、試薬：シーメンスヘルスケア・ダイアグノスティクス社製キット「MS2 スクリーニング Neo II」、非誘導体化法[5]）により、ろ紙血液中のアミノ酸およびアシルカルニチン（表1）を測定した。データの解析は、Sciex 社製 ChemoView を使用した。

2) ガラクトース血症

マイクロプレート・酵素法（シーメンスヘルスケア・ダイアグノスティクス社製キット「エンザプレート GAL」使用）により、ろ紙血液中のガラクトースを測定した。ガラクトースの抽出には、トランスファープレートを使用する改良法[6]を用いた。

1. 富山県厚生部こども家庭室子育て支援課

また、全検体について、自家調製試薬 [7] によるボイトラー法で、Galactose-1-phosphate uridyl transferase (UT) 活性の有無を検査した。なお、判定用のろ紙は、短時間でも判定可能である Whatman DE81[8] を使用した。

3) 先天性甲状腺機能低下症

ELISA (栄研化学社製キット「クレチン TSH ELISA II ‘栄研’」使用) による TSH (Thyroid stimulating hormone) 値の測定を行った。

4) 先天性副腎過形成症

ELISA (シーメンスヘルスケア・ダイアグノスティクス社製キット「エンザプレート Neo-17 α -OHP」使用) による 17-OHP (17-hydroxy progesterone) 値の測定を行った。

(3) 検体のサンプリング

バーコードを利用した自動サンプリング [9] を行った。

(4) 判定基準

表 1 に示した判定基準に従い、疑陽性と判定した検体は再採血を依頼し、再検査を行った。再検査でも疑陽性となった場合には、精密検査実施医療機関を受診するよう主治医に報告した。緊急に精密検査を要する場合は、初回検査でも、直ちに主治医に連絡し、小児科受診を勧奨した。

タンデムマス法での判定基準値については、定期的に判定基準の見直しを行っているが、今年度では変更がなかった。

(5) 結果報告

毎週金曜日に、その前週の月～金曜日に受付したすべての検体の結果個票を各医療機関に郵送した。保護者には、各医療機関から、結果個票の受診者用の部分が手渡されることになっている [4]。

(6) データ処理

システムケイ社製『新生児マススクリーニングシステム』により、検査検体の受付事務処理、検

表 1. 対象疾患および判定基準

	疾患名	検査法	指標	再採血カットオフ値		即精密検査カットオフ値	
				($\mu\text{mol/L}$)	アミノ酸(mg/dl)	($\mu\text{mol/L}$)	アミノ酸(mg/dl)
アミノ酸代謝異常症	フェニルケトン尿症(PKU)	タンデムマス法	Phe	120	2.0	500	8.3
	メーブルシロップ尿症(MSUD)		Leu + Ile & Val	340	4.4	600	7.9
	ホモシスチン尿症(HCU)		Met	67	1.0	340	5.0
	シトルリン血症1型(CTLN1)		Cit	100		250	
	アルギニノコハク酸尿症(ASA)						
有機酸代謝異常症	メチルマロン酸血症(MMA)		C3	3.9		8.0	
	プロピオン酸血症(PA)		& C3/C2	0.24		0.24	
	イソ吉草酸血症(IVA)		C5	1.0		5.0	
	メチルクロトニルグリシン尿症(MCCD)		C5-OH	1.00		2.00	
	ヒドロキシメチルグルタル酸血症(HMGA)						
	複合カルボキシラゼ欠損症(MCD)		C5-DC	0.35			
脂肪酸代謝異常症	グルタル酸血症1型(GA1)						
	中鎖アシルCoA脱水素酵素欠損症(MCAD)		C8 & C8/C10	0.28 1.2		0.28 1.2	
	極長鎖アシルCoA脱水素酵素欠損症(VLCAD)		C14:1 & C14:1/C2	0.3 0.013		0.3 0.013	
	三頭酵素欠損症/長鎖3-ヒドロキシアシルCoA脱水素酵素欠損症(TFP/LCHAD)		C16-OH & C18:1-OH	0.100 0.100		0.100 0.100	
	カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ1欠損症(CPT-1)		C0/ (C16+C18)	75		75	
	カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ2欠損症(CPT-2)		(C16+C18:1)/C2 C14/C3	0.37 0.42		0.37 0.42	

	疾患名	検査法	測定物質	再採血カットオフ値	即精密検査カットオフ値
糖代謝異常症	ガラクトース血症	マイクロプレート・酵素法	Gal Gal-1-P	3mg/dL または 15mg/dL	Galが3mg/dL以上かつ ボイトラー法で蛍光無
		ボイトラー法	Gal-1-P Uridyltransferase	蛍光が微弱または無	
内分泌異常症	先天性甲状腺機能低下症	エンザイムイムノアッセイ法(ELISA)	TSH	8 $\mu\text{U/mL}$	30 $\mu\text{U/mL}$
	先天性副腎過形成症	エンザイムイムノアッセイ法(ELISA)	17-OHP	直接法10ng/mL 抽出法 4ng/mL	直接法10ng/mL以上で有症状 または 抽出法10ng/mL以上

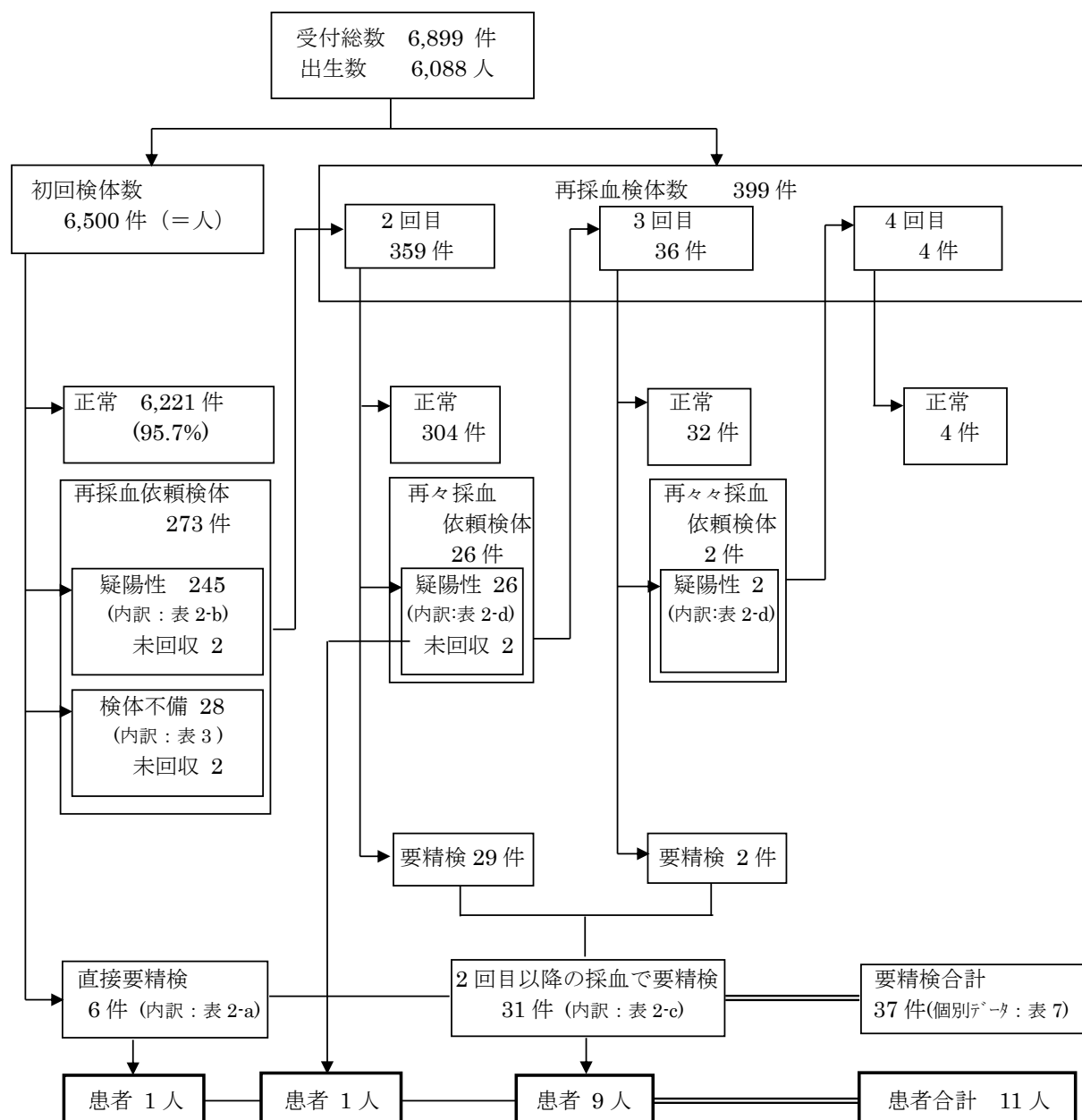


図 1. 検査の流れおよび検査数の概要

査結果の判定，結果報告，月報集計，年度集計を行った。

結果：

1. 検査実施状況

(1) 検査件数と検査結果の概要

今年度の受付総数は，6,899 件で，県内 26 か所の医療機関（おもに産婦人科）から送付されてきたものである。

図 1 に検査の流れと検査件数の概要を示した。今年度の出生数は 6,088 人 [11] であり，初回検体数 6,500 件（人）から計算すると受検率は 106.8%

となった。100%を超えているのは，県外在住者がいわゆる『里帰り出産』のため県内で出産するケースを含んでいるためと考えられる。また，県内在住者が他県で受検するケースもあることから，正確な受検率は算定できないが，県内で出生した新生児はほぼ全員この検査を受けているものと推定される。

初回検体のうち 6,221 件（人）（95.7%）は正常と判定されたが，245 件（人）（3.8%）は疑陽性のため，28 件（人）（0.4%）は血液量の不足等の検体不備の理由で，再採血を依頼した。また，6 件（人）（0.1%）は初回検査で直ちに精密検査が必要

(直接要精検)と判定された。

再採血検体として受付した399件のうちでは、31件(人)(7.8%)が要精密検査と判定された。今年度の要精密検査数は、直接要精検の6件(人)と合わせて37件(人)となった。

(2) 疑陽性による再採血

表2に疾患別の疑陽性による再採血依頼数を示した。タンデムマス法によるアミノ酸代謝異常症、有機酸代謝異常症、脂肪酸代謝異常症の計17疾患の再採血率は0.35%であった。ガラクトース血症も合わせた代謝異常症の再採血率は0.90%となった。先天性甲状腺機能低下症は1.71%、先天性副腎過形成症は1.49%となり、すべての対象疾患の合計は4.10%であった。再採血率の目安は、タンデムマス法17疾患では0.1～0.6%[12]、先天性甲状腺機能低下症は0.5～1.0%、先天性副腎過形成症は0.3～0.5%[13]とされている。タンデムマス法の再採血率は適正であったが、先天性甲状腺機能低下症と先天性副腎過形成症の再採血率は高かった。

先天性甲状腺機能低下症については、再採血依頼数(118件)のうち58件(49.2%)は初回検体のTSH値が判定基準値(カットオフ値)をわずかに超える程度(8～9 μU/ml)の検体であった。このような例の中には、再採血時にTSH値が上昇し、患者と診断された例もある。通常、再採血率が高い場合には、カットオフ値を高く設定し直す等の検討が必要となるが、その際には、このよ

うなTSHが比較的低値の患者例についても考慮する必要があると考えられる。

先天性副腎過形成症では、再採血依頼数の約半数が低体重児(出生体重2,000g未満の児)であった。低体重児は副腎機能が未熟であり、さらにストレス状態にあるために17-OHP値が高くなりやすく、このような例が多かったことが、再採血率が高かった要因のひとつと考えられた。再採血率を低減するためには、出生体重別のカットオフ値の設定やLC-MSMS法による副腎ホルモンプロファイルの確認等が必要であると考えられた。

また、2疾患が疑陽性となった例が9件、疑陽性となった疾患とは別の疾患で要精検となった例が1件あり、計10件が重複した疾患で異常となった。これらの内訳を表2の注記に示した。表2、表4、表5では、疑陽性数欄のそれぞれの項目に計上した。

疑陽性のため再採血を依頼した検体数は273件(人)で、そのうち、2023年5月31日現在269件(人)の再採血検体を回収した。再採血を依頼しても1か月以上検体が届かない場合は再依頼しているが、回収率は98.5%であった。

回収できなかった4件については、再採血検体を当所に送付せずに医療機関(小児科)において検査が行われていた例が2件あり、患者と診断された例が1件、正常が1件であった。患者と診断された例の詳細については後述する。その他の2件は、NICUでフォローされている例が1件、ス

表2. 要精検数および疑陽性による再採血依頼数の内訳

[]:患者数

2022年4月～2023年3月	初回検体 6,500件			再採血検体 399件		総受付検体 6,899件		
	直接要精検数	疑陽性による再採血依頼数	再採血率	要精検数	疑陽性による再採血依頼数	要精検数合計	疑陽性による再採血依頼合計	再採血率
疾患名	a	b		c	d	a+c	b+d	
アミノ酸代謝異常症	0	8	0.12%	2	0	2	8	0.12%
有機酸代謝異常症	0	4	0.06%	0	0	0	4	0.06%
脂肪酸代謝異常症	2	11	0.17%	1	1	3	12	0.17%
ガラクトース血症	0	34	0.52%	1 [1]	4	1 [1]	38	0.55%
先天性甲状腺機能低下症	1 [1]	110	1.69%	20 [8]	8 [1]	21 [9]	118 [1]	1.71%
先天性副腎過形成症 (内 出生体重2000g未満児の数)	3 (2)	85 (35)	1.31%	7 (1)	18 (15)	10 (3)	103 (50)	1.49%
2022年度総計 (内 疑陽性が重複している疾患数)	6 [1]	252 《7》*1)	3.88%	31 [9]	31 [1] 《3》*2)	37 [10]	283 [1] 《10》	4.10%

*《重複している疑陽性の内訳》

1)

・メーブルシロップ尿症+先天性副腎過形成症 2件

・全身性カルニチン欠乏症+先天性副腎過形成症 1件

・先天性甲状腺機能低下症+先天性副腎過形成症 4件

2)

・全身性カルニチン欠乏症+先天性副腎過形成症 1件

・ガラクトース血症+先天性甲状腺機能低下症(要精検) 1件

・先天性甲状腺機能低下症+先天性副腎過形成症 1件

表 3. 疑陽性以外の理由による再採血依頼数

依頼理由		件数
不備検体		28
内 訳	血液量不足	5
	血液が古い	3
	生後 3 日以内の採血	2
	濾紙汚染	2
	哺乳不良	16
低体重		121

クリーニング対象疾患以外の理由で死亡した例が 1 件であった。

(3) 疑陽性以外の理由による再採血

表 3 に疑陽性以外の理由による再採血依頼数を示した。

ろ紙の裏まで血液が十分にしみ込んでいない等の血液量不足の検体は 5 件であった。医療機関で採血後検体受付までに 7 日間以上経過していたため、血液が古いと判断した検体は 3 件であった。生後 3 日以内に採血された 2 件は、日齢 3 で採血された検体であった。また、ろ紙が汚染していた例は 2 件であり、いずれもろ紙の血液部分すべてに血餅が付着していたものであった。測定値に影響が出るため、再採血を依頼した。採血医療機関に対しては、あらためて、採血方法、採血後のろ紙の取り扱いについての注意喚起を行った。

このような検体不備のために再採血を依頼した検体は 28 件で、このうち再検査できたのは 26 件で、回収率は 92.9% であった。なお、回収できなかった 2 件は、いずれも NICU からの検体であり、そのうち 1 例はスクリーニング対象疾患以外の理

由で死亡した例であった。

また、2,000g 未満の低体重児については、①生後 1 か月時②体重が 2,500 g に達した時期③医療施設を退院する時期のうち、いずれか早い時期に再採血を依頼している[14]。2022 年度の初回検体 6,500 件（人）のうち、低体重児は 121 人（1.9%）であった。このうち、38 人は疑陽性として再採血を依頼した。また、2 人は要精密検査となった。したがって、低体重児であることのみを理由として再採血を依頼したのは 81 人であった。

(4) 月および年度別推移並びに全国結果との比較
検査実施状況の月別比較、年度推移並びに全国集計[15]との比較をそれぞれ表 4、表 5 および表 6 に示した。

なお、2021 年度に要精検となった例で、先天性甲状腺機能低下症 1 例と非古典型先天性副腎過形成症 1 例の患者が新たに判明したことから、表 5 の 2021 年度の患者数を修正した。

富山県における現在までの患者発見率については、ガラクトース血症を含めた代謝異常症の患者数は 15 人（ヒスチジン血症除く）であり、発見率は 1/31,000 となった。先天性甲状腺機能低下症は 1/1,900、先天性副腎過形成症は 1/16,000 となった（表 6）。先天性甲状腺機能低下症の患者発見率は、全国と同様に高い。

2. 要精密検査者の検査結果

2022 年度の疑陽性数は、代謝異常症（アミノ酸代謝異常症、有機酸代謝異常症、脂肪酸代謝異常症、ガラクトース血症）が 62 件、先天性甲状腺機能低下症が 118 件、先天性副腎過形成症が 103 件であった。このうち、精密検査の必要が認められたのは、代謝異常症 6 人、先天性甲状腺機能低下症 21 人、先天性副腎過形成症 10 人で

表 4. 月別検査実施状況

年		2022年									2023年			計	
月		4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3		
受付検体総数（件）		534	673	573	531	675	612	600	627	560	539	456	519	6,899	
内 訳	初回検査数（件）	498	632	550	490	643	576	560	605	519	504	435	488	6,500	
	再採血総数（件）	36	41	23	41	32	36	40	22	41	35	21	31	399	
	採 血 回 数	2回目	31	40	18	37	26	33	36	21	37	32	21	27	359
		3回目	5	1	4	4	6	2	3	1	3	3	0	4	36
		4回目以上	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	4
疑 陽 性 数 （ カ ッ コ 内 は 要 精 検 査 ）	アミノ酸代謝異常症	1（1）	2	1	1	0	2	1（1）	0	0	0	0	0	8（2）	
	有機酸代謝異常症	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	4	
	脂肪酸代謝異常症	2	2	0（1）	2	1	0	2（1）	0	2	0（1）	0	1	12（3）	
	ガラクトース血症	1	6	0	6	1（1）	2	1	5	3	5	2	6	38（1）	
	先天性甲状腺機能低下症	17（3）	13（2）	6	10（1）	6（1）	12	9（3）	9（1）	9（3）	9（4）	7（1）	11（2）	118（21）	
	先天性副腎過形成症	11	10	9	8	10（1）	9（1）	6	5	10（5）	10（2）	6（1）	9	103（10）	
計		32（4）	34（2）	16（1）	28（1）	19（3）	25（1）	19（5）	19（1）	24（8）	25（7）	15（2）	27（2）	283（37）	

表 5. 先天性代謝異常等検査実施状況

区分 期間	受付総数 (件)	検査実人員数 (人)	出生数 (人)	受検率	疑陽性数			要精検数 () : 患者数		
					代謝異常症*1)	甲状腺機能低下症	副腎過形成症	代謝異常症*1)	甲状腺機能低下症	副腎過形成症
1977年度～1979年度	29,229	28,450	39,688	71.7%	262	—	—	6 (4)	—	—
1980年度～1988年度	122,841	115,435	116,956	98.7%	1,811	841	—	75 (27)	130 (25)	—
1989年度～2012年度	261,186	245,739	230,021	106.8%	2,620	3,369	2,616	196 (9)	586 (131)	367 (14)
2013年度～2019年度	58,906	55,953	51,272	109.1%	514	665	932	54 (2)	88 (38)	61 (5)
2020年度	7,152	6,763	6,299	107.4%	78	101	119	10 (2)	26 (15)	5 (0)
2021年度	7,071	6,683	6,215	107.5%	58	126	92	8 (3)	23 (11)	3 (1)
2022年度	6,899	6,500	6,088	106.8%	62	118	103	6 (1)	21 (10)	10 (0)
計	493,284	465,523	456,539	—	5,405 *2)	5,220	3,862	355 *2) (48*3)	874 (230)	446 (20)

*1) 1977年度～1993年度：アミノ酸代謝異常症4疾患+ガラクトース血症の計5疾患
1994年度～2012年度：アミノ酸代謝異常症3疾患+ガラクトース血症の計4疾患
2013年度～2017年度：アミノ酸代謝異常症5疾患+有機酸代謝異常症7疾患+脂肪酸代謝異常症4疾患+ガラクトース血症の計17疾患
2018年度～：アミノ酸代謝異常症5疾患+有機酸代謝異常症7疾患+脂肪酸代謝異常症5疾患+ガラクトース血症の計18疾患の合計件数
*2) 1977年度～1993年度に検査実施のヒスチジン血症の数（疑陽性137人、要精検39人、患者33人）を含む
*3) この他に対象疾患以外の患者25人あり（高フェニルアラニン血症19人、チロジン血症2人、G6PD異常症2人、シトリン欠乏症2人）

表 6. マスクリーニングによる富山県および全国の患者発見状況

区 分 期 間	富 山 県				全 国			
	2022年度		1977年度～2022年度		2021年度		1977年度～2021年度	
受検者数	6,500人		465,523人		839,496人		52,761,923人	
患者数、発見率	患者数 (人)	発見率	患者数 (人)	発見率	患者数 (人)	発見率	患者数 (人)	発見率
疾患名								
アミノ酸代謝異常症	0	—	6 ²⁾	1/ 77,600	29	1/ 28,900	1,122	1/ 47,000
アミノ酸代謝異常症 (2疾患) ¹⁾	0	—	1 ³⁾	1/ 68,000 ⁶⁾	10	1/ 83,900	49	1/ 190,300 ⁹⁾
有機酸代謝異常症	0	—	2 ⁴⁾	1/ 34,000 ⁶⁾	35	1/ 24,000	363	1/ 25,700 ⁹⁾
脂肪酸代謝異常症	0	—	3 ⁵⁾	1/ 22,700 ⁶⁾	26	1/ 32,300	237	1/ 39,300 ⁹⁾
ガラクトース血症	1	1/ 6,500	3	1/ 155,200	33	1/ 25,400	1,416	1/ 37,300
先天性甲状腺機能低下症	10	1/ 700	230	1/ 1,900 ⁷⁾	619	1/ 1,400	19,467	1/ 2,500 ¹⁰⁾
先天性副腎過形成症	0	—	20	1/ 16,000 ⁸⁾	55	1/ 15,300	2,231	1/ 16,400 ¹¹⁾

1) シトルリン血症 I 型, アルギノコハク酸尿症
2) 患者内訳：フェニルケトン尿症 5人, メープルシロップ尿症 1人
3) 患者内訳：シトルリン血症 I 型 1人
4) 患者内訳：プロピオン酸血症 2人
5) 患者内訳：極長鎖アシルCoA脱水素酵素欠損症 3人
6) 2013年度 (2014年3月) ～2022年度 タンデムマス法受検者数 68,035人
7) 1980年度～2022年度 受検者数 437,073人
8) 1989年度～2022年度 受検者数 321,638人

9) 2011年度～2021年度 タンデムマス法受検者数 9,323,574人
10) 1979年度～2021年度 受検者数 49,418,982人
11) 1988年度～2021年度 受検者数 36,677,382人

あった (表 5)。このうち患者と診断されたのは、ガラクトース血症Ⅳ型 1 人、先天性甲状腺機能低下症 9 人であった。さらに、検査対象疾患の関連疾患として 1 人が軽症高フェニルアラニン血症と診断された。

表 7 に要精密検査者の個別の検査状況と結果をまとめた。

精密検査が必要となった場合には、富山県先天性代謝異常等検査事業マニュアルに従い、採血医療機関への精密検査依頼時に精密検査実施医療機関（小児科）および主治医名を把握し、さらに主治医からの精密検査結果報告書により、精密検査結果、診断名等を把握した。なお、精密検査結果

報告書は、診断や治療方針がつき次第、また経過を診ている場合は概ね半年くらいを目途に精密検査実施医療機関から当所に送付することになっている。

精密検査結果報告書の回収率は、94.6% (35 例 / 37 例) であった。

なお、2022 年度に当所に届いたフォローアップ検体 [16] は、42 人 延べ 72 件であった。また、2022 年度に要精密検査となった 37 人のうちでは、19 人 延べ 35 検体についてフォローアップ検査を行った。

表 7 の診断名等の欄には、精密検査結果報告書に記載されていた診断名を記した。

表 7. 要精密検査者の検査状況と結果(1)

疑病名	症 例	患 者	性 別	日 齢	検 査 成 績				診断名
アミノ酸、有機酸、 脂肪酸代謝異常症	1		男	4	Phe	125.3nmol/ml			軽症高フェニルアラニン 血症疑い
				10	Phe	143.5nmol/ml			
	2		女	5	C14:1	0.23nmol/ml	C14:1/C2	0.0170	異常なし
	3	*	女	4	Phe	136.7nmol/ml			軽症高フェニルアラニン 血症
				9	Phe	125.8nmol/ml			
	4		女	5	C8	0.43nmol/ml	C10	0.78nmol/ml	異常なし
					C12	0.69nmol/ml			
				16	C8	0.53nmol/ml	C10	0.91nmol/ml	
					C12	0.47nmol/ml			
	5		女	4	C14:1	0.52nmol/ml	C14:1/C2	0.0240	異常なし
ガラクトース血症	1	*	男	4	Gal	11.48mg/dl	Gal-1-P ボイトラー法	7.20mg/dl 正常	ガラクトース血症Ⅳ型
				9	Gal	15.34mg/dl	Gal-1-P ボイトラー法	6.36mg/dl 正常	
先天性甲状腺機能低 下症	1		女	4	TSH	8.27 μU/ml			一過性甲状腺機能低下症 疑い
				8	TSH	9.46 μU/ml			
	2	*	女	4	TSH	8.19 μU/ml			先天性甲状腺機能低下症
				14	TSH	14.04 μU/ml			
	3	*	女	4	TSH	11.86 μU/ml			先天性甲状腺機能低下症
				9	TSH	10.73 μU/ml			
	4		男	5	TSH	9.06 μU/ml			先天性甲状腺機能低下症 疑い
				14	TSH	8.54 μU/ml			
	5	*	男	4	TSH	9.27 μU/ml			先天性甲状腺機能低下症
				8	TSH	22.05 μU/ml			

表 7. 要精密検査者の検査状況と結果(2)

疑病名	症 例	患 者	性 別	日 齢	検 査 成 績	診断名
先天性甲状腺機能低下症	6		男	4	TSH 13.20 μ U/ml	異常なし
				13	TSH 13.25 μ U/ml	
	7		女	4	TSH 8.25 μ U/ml	異常なし
				10	TSH 8.72 μ U/ml	
	8		男	4	TSH 8.78 μ U/ml	甲状腺機能低下症（先天性または一過性）
				12	TSH 13.94 μ U/ml	
	9	*	男	6	TSH 21.57 μ U/ml	先天性甲状腺機能低下症
				37	TSH 294.20 μ U/ml	
	10		女	9	TSH 2.72 μ U/ml	異常なし
				24	TSH 9.05 μ U/ml	
				26	TSH 8.25 μ U/ml	
	11	*	女	5	TSH 19.34 μ U/ml	先天性甲状腺機能低下症
				11	TSH 39.45 μ U/ml	
	12		男	5	TSH 9.91 μ U/ml	先天性甲状腺機能低下症 疑い
				11	TSH 9.39 μ U/ml	
	13		男	4	TSH 2.73 μ U/ml	一過性甲状腺機能低下症
				30	TSH 77.74 μ U/ml	
	14	*	男	4	TSH 18.32 μ U/ml	先天性甲状腺機能低下症
				10	TSH 16.96 μ U/ml	
	15	*	男	4	TSH 21.59 μ U/ml	先天性甲状腺機能低下症
				10	TSH 49.66 μ U/ml	
	16		男	4	TSH 8.75 μ U/ml	異常なし

表 7. 要精密検査者の検査状況と結果(3)

疑病名	症例	患者	性別	年齢	検 査 成 績				診断名
先天性甲状腺機能低下症	16		男	13	TSH	13.79 μ U/ml			異常なし
	17		男	6	TSH	8.03 μ U/ml			先天性甲状腺機能低下症 疑い
				15	TSH	9.59 μ U/ml			
	18	*	女	4	TSH	9.10 μ U/ml			先天性甲状腺機能低下症
				11	TSH	17.43 μ U/ml			
	19		女	5	TSH	9.82 μ U/ml			
				8	TSH	8.56 μ U/ml			
	20	*	男	5	TSH	68.29 μ U/ml			先天性甲状腺機能低下症
	21		女	4	TSH	28.93 μ U/ml			異常なし
				11	TSH	19.56 μ U/ml			
先天性副腎過形成症	1		男	5	170HP直接法	4.95 ng/ml	170HP抽出法	4.40 ng/ml	異常なし 出生体重 2,635g
				16	170HP直接法	9.05 ng/ml	170HP抽出法	4.49 ng/ml	
	2		男	4	170HP直接法	4.81 ng/ml	170HP抽出法	4.52 ng/ml	異常なし 出生体重 2,606g
				11	170HP直接法	8.29 ng/ml	170HP抽出法	5.87 ng/ml	
	3		男	5	170HP直接法	13.47 ng/ml	170HP抽出法	6.95 ng/ml	異常なし 出生体重 2,372g
				14	170HP直接法	10.34 ng/ml	170HP抽出法	5.78 ng/ml	
	4		男	4	170HP直接法	23.01 ng/ml	170HP抽出法	15.38 ng/ml	異常なし 出生体重 1,832g
	5		女	5	170HP直接法	3.56 ng/ml	170HP抽出法	4.01 ng/ml	出生体重 2,876g
				9	170HP直接法	5.71 ng/ml	170HP抽出法	4.74 ng/ml	
	6		男	4	170HP直接法	8.25 ng/ml	170HP抽出法	6.12 ng/ml	異常なし 出生体重 2,032g
				14	170HP直接法	7.02 ng/ml	170HP抽出法	4.27 ng/ml	
				21	170HP直接法	7.44 ng/ml	170HP抽出法	5.28 ng/ml	

表 7. 要精密検査者の検査状況と結果(4)

疑病名	症例	患者	性別	年齢	検 査 成 績				診断名
先天性副腎過形成症	7		男	4	170HP直接法	5.93 ng/ml	170HP抽出法	4.55 ng/ml	異常なし 出生体重 1,894g
				14	170HP直接法	8.00 ng/ml	170HP抽出法	5.02 ng/ml	
	8		女	4	170HP直接法	29.06 ng/ml	170HP抽出法	18.99 ng/ml	異常なし 出生体重 1,790g
	9		女	4	170HP直接法	15.47 ng/ml	170HP抽出法	3.85 ng/ml	異常なし 出生体重 2,362g
				14	170HP直接法	10.28 ng/ml	170HP抽出法	5.23 ng/ml	
	10		男	4	170HP直接法	24.69 ng/ml	170HP抽出法	10.70 ng/ml	異常なし 出生体重 2,108g

要精密検査者の主な症例について経過を報告する。

(1) 代謝異常症

アミノ酸代謝異常症の疑いで2人、有機酸代謝異常症の疑いで1人、脂肪酸代謝異常症の疑いで2人、ガラクトース血症の疑いで1人の計6人が要精密検査となった。

表7に示したアミノ酸、有機酸、脂肪酸代謝異常症欄の症例1および症例3は、フェニルケトン尿症疑いの例であり、Phe 値軽度上昇が持続していたため要精密検査となった。いずれも治療なしで経過観察されており、症例3は軽症高フェニルアラニン血症と診断された。

症例2および症例5は、極長鎖アシル CoA 脱水素酵素 (VLCAD) 欠損症疑いで要精密検査となった例である。症例2は、採血時の体重減少率は8%程度であり、判定補助指標として設定しているC14:1/C10, C14:1/C12, C14:1/C12:1, C14:1/C14の値も高値であった。精密検査の結果、血清アシルカルニチン分析では、C14:1 0.06 $\mu\text{mol/L}$, C14:1/C2 0.01 であり、正常と診断された。症例5は、検査指標がカットオフ値前後でばらつきがあったが、血清アシルカルニチン分析では、C14:1 0.06 $\mu\text{mol/L}$, C14:1/C2 0.01 であり、正常と診断された。

症例4は、新生児マススクリーニングの2次対象疾患であるグルタル酸血症Ⅱ型疑いの例である。日齢16での再採血検体でもさらに検査指標が高くなっており、要精密検査としたが、血清カルニチン分析、遺伝子解析の結果、正常と診断された。

ガラクトース血症疑いの症例1は、ガラクトース高値で要精密検査となった。フォローアップ検

体による検査の結果では、Gal 値が4～10 mg/dLの範囲で変動しており、酵素活性測定、遺伝子解析の結果、複合ヘテロ型のガラクトース血症Ⅳ型 (GALM 欠損症) と診断された。

(2) 先天性甲状腺機能低下症

要精密検査となった21人のうち、患者と診断されたのは症例2, 3, 5, 9, 11, 14, 15, 18, 20の9人であった。なお、症例9は双胎児第1子で、第2子は同時期の採血ではTSHは高値ではなかった。

初回検体でTSH値が異常高値となり直ちに要精密検査となった例（直接要精検例）は症例20で、患者と診断された。また、初回検体がTSH 8～9 $\mu\text{U/mL}$ で比較的低値またはカットオフ値 (8 $\mu\text{U/mL}$) 前後でばらついたが、再採血検体で高値となり要精密検査となった例が10例あり、これらのうち3例（症例2, 症例5, 症例18）が患者と診断され、4例は患者疑いでフォローされている。一方、初回検体では正常であったが、再採血以降でTSH値がカットオフ値以上となり要精密検査となった2例（症例10, 13）は、精密検査の結果、異常なし、一過性とのことであった。

このほかに、疑陽性として再採血を依頼したが回収できなかった例の中で、医療機関（小児科）で実施された検査の結果、患者と診断された例があった（図1, 表8）。この症例は、初回検体（日齢4採血）ではTSH値が正常であったが、低体重児のため要再採血を依頼した。再採血検体（日齢30採血）では、TSH値が14.69 $\mu\text{U/mL}$ であり、疑陽性として再々採血を依頼した。この児は、初回採血時からNICUで管理されており、再々採血を依頼した後すぐに医療機関で検査が行われた結

表 8. 疑陽性で再採血を依頼したが再採血検体が届かなかった 未回収例のうち、医療機関での再検査により患者と診断された症例

日 齢	結果および経過
4	初回採血
5	検体受付 新生児マススクリーニング結果 TSH 2.31 μ U/ml (全血値) 低体重児 (出生時 1,774g) のため再採血依頼
30	再採血
31	検体受付 新生児マススクリーニング結果 TSH 14.69 μ U/ml (全血値)
33	先天性甲状腺機能低下症の疑い (TSH 高値) で再々採血依頼
(38 担当医より連絡あり)	
医療機関で検査した結果、先天性甲状腺機能低下症患者として日齢 34 より治療開始	

果、患者として日齢 34 より治療が開始された。

なお、症例 19 については、2023 年 5 月 31 日時点で精密検査実施医療機関からの回答はまだ届いていない。

(3) 先天性副腎過形成症

要精密検査となった 10 人のうち、出生時体重が 2,000 g 未満の低出生体重児は 3 例であった。

2022 年度は患者は発見されなかった。

症例 5 は、2023 年 5 月 31 日時点で精密検査実施医療機関からの回答はまだ届いていないが、日齢 17 で採血されたフォローアップ検体での検査結果は正常であった。

(4) 検査対象外疾患及び関連疾患

要精密検査となった例の中には、診断の結果、検査対象外疾患や関連疾患の患者が発見される場合がある。2022 年度は、前述した軽症高フェニルアラニン血症が 1 人発見されており、これまでに発見された対象外及び関連疾患の患者は、高フェニルアラニン血症 19 人、チロジン血症 2 人、グルコース - 6 - リン酸脱水素酵素 (G6PD) 異常症 2 人、シトリン欠損症 2 人となった。

3. 精度管理

外部精度管理は、スクリーニング検査の実施主体である各自治体が NPO 法人タンデムマススクリーニング普及協会に委託して全国的に実施されている。

2014 年度より、精度試験 (Quality Control : QC) 用検体と技能試験 (Proficiency Test : PT) 用検体の 2 種類による精度管理 [17] が行われており、これらによる評価は、タンデムマス法の導入に伴い制定された「タンデムマス・スクリーニングの検査施設基準および検査実施基準」[18] に準拠しているかどうかを判断するための一手段とな

る。

2022 年度は、PT 検体による精度管理が 3 回 (5 月, 7 月, 1 月), QC 検体による精度管理が 1 回 (10 月) 実施された。外部精度管理の結果については、検査精度は適正であり、正常・異常の判定も適切で、記入の誤りもなかったとの評価であった。また、QC 検体の測定精度にも問題はないと判定された。

考察：2022 年度は、本県での先天性甲状腺機能低下症の発見率は 1/700 であり、ここ数年間は高く推移している。測定指標である TSH がカットオフ値付近の比較的低値で患者と診断された例や初回検査は正常であったが低体重児のための再採血検体で TSH が遅発性に高値となり患者と診断される例が散見される。さらに、疾患疑いとして経過を診ている例もあり、患者数がさらに増える可能性がある。「先天性甲状腺機能低下症マススクリーニングガイドライン (2021 年改訂版)」[19] では、新生児期に全く症状がないサブクリニカル先天性甲状腺機能低下症が定義され、このような例では乳児期以降に甲状腺機能低下が顕在化することもあり、3 か月程度は慎重に経過を診ることとされている。一方、甲状腺機能の再評価や病型診断は 3 歳以降で行うことが推奨されており、これまでに患者と診断された例については、真の患者であったかどうかを確認するための追跡調査が必要と考えられた。また、多胎児では、単胎児に比べ先天性甲状腺機能低下症の発症リスクが 3 倍高いこと、1 絨毛膜双胎では胎盤の血管を介して血液が相互に行き来するため患者の TSH が希釈されることでマススクリーニングでは陽性にならないことから、先天性甲状腺機能低下症マススク

リーニングガイドラインに「多胎児のマススクリーニングの取り扱いについて」[20, 21] が追記された。これを受けて、富山県先天性代謝異常等検査事業マニュアル[3]にも、多胎児で性別一致の場合は、日齢14日までに2回目の採血を行うことを考慮すること、先天性甲状腺機能低下症マススクリーニングの結果が不一致の時は、スクリーニング陰性の児の甲状腺機能検査を行うことを考慮するよう当所から精密検査医療機関に依頼文書を送付することを追記した。

新生児マススクリーニングの目的は、異常を早期に発見し、その後の治療・生活指導等につなげるにより生涯にわたって障害などの発生を予防すること[22]である。異常を早期に発見し、早期診断、早期治療開始に繋げるためには、より精度の高い二次検査を導入し、疾患特異的なデータの情報を得たうえで、早期に確実に異常と判定することも必要である。当所では、そのような対象疾患についての二次検査法の検討を進めている。

新生児マススクリーニングはこのような実施体制の充実とともに、生涯にわたる障害などの発生予防事業として、母子保健対策に貢献していくものとする。

文 献

1. 雇児母発0331第1号 厚生労働省雇用均等・児童家庭局母子保健課長通知（平成23年3月31日）
2. 雇児母発0707第2号 厚生労働省雇用均等・児童家庭局母子保健課長通知（平成29年7月7日）
3. 富山県先天性代謝異常等検査事業マニュアル（第5版）<https://www.pref.toyama.jp/120101/kurashi/kenkou/kenkou/sententaisya/kj00018894.html>（2023年5月31日時点アクセス可能）
4. 九曜雅子，米田 豊，高森亮輔，他．（2014）．富山衛研年報，37，25-37
5. 重松陽介，畑 郁江，稲岡一考．（2011）．日本マス・スクリーニング学会誌，21（3），13-18
6. 藤本昭栄，大浦敏明，長谷 豊．（1991）．日本マス・スクリーニング学会誌，1（1），211-212
7. 九曜雅子，米田 豊，加藤丈士，他．（2005）．富山衛研年報，28，23-32
8. 美澄博雄，高坂睦年，和田 洋，他．（1980）．代謝異常スクリーニング研究会会報，5，46-47
9. 九曜雅子，米田 豊，前多隆志，他．（2010）．富山衛研年報，33，27-39
10. 花井潤師，福士 勝，石毛信之，他．（2017）．日本マス・スクリーニング学会誌，27（2），41
11. とやま統計ワールド「富山県の人口と世帯」，https://www.pref.toyama.jp/sections/1015/lib/jinko/_news/jinko230401/jinko230401.pdf（2023年5月31日時点アクセス可能）
12. 山口清次（2012）．新しい新生児マススクリーニング タンデムマスQ&A 2012，厚生労働科学研究（成育疾患克服等次世代育成基盤研究事業）p14
13. 市原 侃，鈴木 健，青木菊麿．（1998）．日本マス・スクリーニング学会誌，8（Supplement 2），73-81
14. 猪股弘明，楠田 聡，大関武彦，他．（2006）．日本マス・スクリーニング学会誌，16（3），6-7
15. 先天性代謝異常検査等検査状況（令和2年度） 厚生労働省子ども家庭局母子保健課．特殊ミルク情報，57，62-65
16. 九曜雅子，米田 豊，五十嵐 登，他．（2009）．日本マス・スクリーニング学会誌，19（3），53-62
17. 九曜雅子，米田 豊，西永真理，他．（2015）．富山衛研年報，38，25-36
18. 日本マス・スクリーニング学会精度保証システム委員会，日本マス・スクリーニング学会技術部会（2013）．日本マス・スクリーニング学会誌，23（3），85-95
19. 先天性甲状腺機能低下症マススクリーニングガイドライン（2021年改訂版）https://www.jsms.gr.jp/download/CH_Guideline_2021_revised_%2010-27.pdf（2023年5月31日時点アクセス可能）
20. 先天性甲状腺機能低下症マススクリーニングガイドライン（2021年改訂版）—多胎児のマススクリーニングの取り扱いについて—https://www.jsms.gr.jp/download/CH_Guideline_ver2_20221224.pdf（2023年5月31日時点アクセス可能）
21. 多胎児における新生児スクリーニング検査への対応フローチャート

https://www.jsms.gr.jp/download/multiples-FlowChart_20221224.pdf
(2023年5月31日時点アクセス可能)

22. 子母発 0330 第2号 厚生労働省子ども家庭局母子保健課長通知 (平成30年3月30日)

流産胎児の染色体分析結果(2022年度)

高岡 美紗 湊山 亜未 新保 孝治

Chromosome Analysis of Abortus Cells (Apr. 2022–Mar. 2023)

Misuzu TAKAOKA, Ami MINATOYAMA, and Koji SHINBO

目的：一般に自然流産胎児の約半数に、あるいはそれ以上の頻度で染色体異常が認められるとされているが、これまでの当所での経験からも同様の結果を得ている[1]。流産胎児の染色体異常の有無を検索することは、当該流産のみならず、習慣性流産、反復流産、不育症といった用語で括られる産科領域の疾患の治療および克服に、少なからず情報をもたらし、次の妊娠およびその継続、さらには出産に向けた指針となりうる。富山県では、総合母子保健対策の一環として1973年度から染色体検査事業に取り組んでおり、血液および羊水に続いて、1975年度からは、自然流産胎児の染色体検査を実施している。2021年1月以降は自然流産胎児の染色体検査のみ取り扱っている。2022年度の流産胎児の検査状況および結果を報告する。

材料と方法：主に県内の医療機関から染色体検査依頼のあった流産胎児検体として、胎盤・絨毛組織の酵素処理法や貼り付け法により、10日間程度培養し、染色体標本を作製した。また、染色法は通常のG分染法を使用した。核型分析は可能な限り中期分裂像を5個以上、数の分析は20個以上について行った。Fluorescent in situ hybridization (FISH)法はモザイクおよび微細な異常が疑われた場合に併用した。詳細な方法等は既報[2]に従った。

結果：流産胎児検体として、胎盤・絨毛組織、臍帯等を受け入れ、染色体核型分析検査に供している。検体受け入れ件数は、近年60件前後で推移し、2022年度は17件であった。17検体全ての分析を完了した。

受け入れた検体は17件全てが絨毛のみであった。流産確認時の在胎週数が記載されていた16件について、流産確認時の在胎週数を表1に示した。依頼された流産胎児の週数は6週から41週の範囲であった。10週未満と10週以降で分けると、10

週未満が10件(62.5%)、10週以降が6件(37.5%)であった。16件全体の週数の中央値(四分位範囲)は8.5(7-11)週であった。

検査依頼理由別の依頼件数と流産回数内訳、異常件数および染色体異常の核型を表2に示した。

検査完了した検体17件中7件(41.1%)に染色体異常が認められた。参考までに、当所での流産胎児染色体検査受付件数は、1975年以来46年間で1,075件を数えるが、分析を完了できた検体1,023件のうち、異常を確認したのは628件であり、検査完了件数に占める異常検体の確認率は61.4%となっている。

染色体異常7件の内訳は、数値的異常5件、3倍体1件、構造異常+数値的異常1件(47,XX,add(8)(p23),+16)であった。なお、数値的異常が認められた7件の母体年齢の中央値(四分位範囲)は34(32-37)であり、数値的異常が認められなかった10件の母体年齢[30.5(27.25-33.25)]と比較し、有意に高かった($p=0.025$, Mann-WhitneyのU検定)。

考察：染色体異常を認めた検体の割合は4割程度にとどまり、多くの報告[3,4]の記述よりも低い結果であった。これは2022年度に受け入れた検体数が近年と比較して少なかったことが影響していると考えられる。2022年4月より、流産検体を用いた染色体検査は保険適用となっている[5]。これにより、当所に依頼される検体数が減少したと考えられる。

染色体異常のうち、数値的異常のほとんどは卵母細胞が減数分裂する際の染色体不分離が原因である。染色体不分離の発生率は、一般に母体の加齢に伴い上昇することが知られている[6]。2022年度に受け入れた検体において、数値的異常が認められた母体年齢中央値は、数値的異常がないものと比較して3.5歳高かった。加齢による染色体不分離の増加がこれらの異常の原因として考えられる。

表 1. 検査依頼を受けた流産胎児の在胎週数

週数	6	7	8	9	10	11	13	16	41
検体数	3	3	2	2	1	2	1	1	1
計	10				6				

表 2. 検査依頼理由、流産回数と検査結果

依頼理由(主訴)	依頼 件数	合計流産回数						異 常	染色体異常の核型
		1	2	3	4	5	6		
流産原因精査	9	7	2	0	0	0	0	5	47,XX,+20 47,XY,+21[2] 47,XX,+22 47,XX,add(8)(p23),+16
不育症	3	1	0	2	0	0	0	0	
反復流産	3	0	2	1	0	0	0	2	47,XY,+15 69,XXX
習慣性流産	1	0	0	1	0	0	0	0	
胞状奇胎	1	0	0	1	0	0	0	0	
合計	17	8	4	5	0	0	0	7	

[2]: 同一核型が2件であることを示す

従来は染色体標本作製過程において、処理するシャーレは1つとしていたが、2016年度より、シャーレ2つを1組とし、処理する方法に変更している。これにより培養能力に乏しい検体で、十分な培養に達していなくても分析が可能になり、分析不可能な検体を減らし、標本作製にかかる日数を短縮することが可能になった。

富山県では、1973年度から染色体検査事業に取り組んでおり、流産胎児の染色体検査については1975年度から実施してきた。しかし、2022年度から流産検体を用いた染色体検査が保険適用となったことなどから、当所で実施する染色体検査の件数は大きく減少した。これを踏まえ、2023年3月末をもって、当所における染色体検査を終了することとした。

文 献

1. 本田幸子, 品川保弘, 林美貴子 (2007). 富山衛研年報, 30, 47-52
2. 品川保弘, 高森亮輔, 林美貴子 (2012). 富山衛研年報, 35, 38-42
3. 杉浦真弓 (2005). 産婦人科治療 91 (2), 140-143
4. 小澤伸晃 (2010). 不育症治療に関する再評価と新たな治療法の開発に関する研究: 平成 21 年度総括・分担研究報告書 (研究代表者: 齊藤滋), 135-137
5. 厚生労働省. 別表第一 医科診療報酬点数表. 2022. <https://www.mhlw.go.jp/content/12404000/000907834.pdf> (2023 年 5 月 19 日アクセス可能)
6. Yogo Sakakibara, Shu Hashimoto, Yoshiharu Nakaoka et al. (2015). Nat Commun, 6, 7550

富山県における2022年度のウイルスおよびリケッチア検出状況

板持 雅恵 稲崎 倫子 嵩田 嵩久 佐賀由美子
矢澤 俊輔 谷 英樹

Viruses and Rickettsiae Detected from Specimens of Patients in Toyama Prefecture in the Fiscal Year 2022

Masae ITAMOCHI, Noriko INASAKI, Takahisa SHIMADA, Yumiko SAGA,
Shunsuke YAZAWA, and Hideki TANI

目的：富山県衛生研究所ウイルス部では、感染症発生動向調査や行政依頼検査、一般依頼検査など、種々の目的によって検査を行っている。ここでは、2022年度に検出されたウイルスおよびリケッチアの検査の概要を報告する。

材料と方法：検査は、検体の種類や状態に応じて、常法に従い実施した。

2022年4月から2023年3月までに受け付けた被検者は延べ6,947例、検体別では糞便（直腸拭い液を含む）197、鼻咽頭または鼻腔拭い液299、唾液6,588、喀痰2、気管吸引液1、髄液12、尿11、血液（全血、血漿、血清、末梢血単核球、パフィーコートなど）48、痂皮・皮膚6、水疱内容物1、吐物2、胸水1の計14,119件であった。

結果および考察：被検者6,947例中3,800例からウイルスあるいはリケッチアが検出された。以上の成績を臨床診断名別、月別に表1に示し、若干の解説を加えた。

インフルエンザおよびインフルエンザ様疾患・呼吸器疾患：県内の医療機関を受診した患者56例（鼻咽頭または鼻腔拭い液55、唾液1、喀痰1、髄液2、血清4、糞便2、尿1）について検査を行ったところ、12～3月に41症例からAH3型インフルエンザウイルスが検出された。インフルエンザウイルス以外では、2月に1症例からヒトボカウイルスが検出された。また、3月には、6症例からヒトコロナウイルスOC43がそれぞれ検出された。

新型コロナウイルス感染症（COVID-19）：4～9月に計5,247例（咽頭または鼻腔拭い液、唾液）の検査を行ったところ、2,274症例から新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）が検出された。

COVID-19 変異検査：4～5月に県内医療機関や当所におけるSARS-CoV-2検査により陽性となった症例のうち、548例についてins214EPE変異検査を行ったところ、377症例にins214EPEなし（オミクロン株BA.2疑い）がみられた。

COVID-19 ゲノム解析：SARS-CoV-2陽性例のうち、874症例について次世代シーケンサーを用いたゲノム解析を行ったところ、4～5月の34症例がオミクロン株BA.1系統、4～8月の361症例がBA.2系統、6～3月の404症例がBA.5系統と判定され、7症例がBQ.1系統、13症例がBF.7系統であった。その他、2症例がBA.2.12.1系統、6症例がBN.1系統、7症例がBA.4系統、1症例がBA.4.6系統、1症例がXBE系統と判定された。

脳炎・脳症：計9症例（髄液6、血清10、糞便5、鼻咽頭拭い液6、気管吸引液2、尿5）の検査を行ったところ、1症例の血清からヒトヘルペスウイルス6型が、糞便からアデノウイルス41型が同時に検出された。また、1症例の鼻咽頭拭い液からAH3インフルエンザウイルスが検出された。

無菌性髄膜炎：4症例（髄液4、血清2、鼻咽頭拭い液1、糞便2、尿1）の検査を行ったところ、1症例の髄液から水痘・帯状疱疹ウイルスが検出された。

感染性胃腸炎：集団発生事例では、食中毒および有症苦情事例を含む15事例（96名、糞便95、吐物2）について検査を行ったところ、5月、1月および2月の6事例43名からノロウイルスGIIが検出された。月別では、4月に2事例、5月に2事例、6月に3事例、8月に1事例、11月に1事例、1月に3事例、2月に3事例、それぞれ発生した。

散発例では、小児科医療機関に受診された計89症例（糞便91、血清1）について検査を行い、ノ

表 1. 2022 年度 疾患別, 月別ウイルスおよびリケッチア検出状況

臨床診断名	検出病原体	2022年						2023年									
		4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月	合計			
インフルエンザ・	(被検者数)									1	14	14	27	56			
インフルエンザ様疾患	AH3型インフルエンザ									1	13	10	17	41			
	ヒトボカ											1		1			
	ヒトコロナOC43												6	6			
新型コロナウイルス	(被検者数) ^a	1,049	1,137	234	1,116	1,504	207							5,247			
感染症 (COVID-19)	新型コロナ ^a	246	305	114	588	874	147							2,274			
COVID-19	(被検者数)	258	290											548			
ins214EPE変異検査	ins214EPE変異あり	111	26											137			
	ins214EPE変異なし	128	249											377			
	判定不能	19	15											34			
COVID-19	(被検者数)	91	83	114	190	114	27	30	84	63	47	17	14	874			
ゲノム解析	オミクロン BA.1	32	2											34			
	BA.2	59	80	110	109	3								361			
	BA.2.12.1		1		1									2			
	BN.1									1	3	2		6			
	BA.4				5	2								7			
	BA.4.6									1				1			
	BA.5			3	74	109	27	29	75	48	22	7	10	404			
	BQ.1.1								2	1	4			7			
	BF.7									1	4	5	3	13			
	XBE										1			1			
脳炎・脳症	(被検者数)				1	2	1	1		2	1		1	9			
	ヒトヘルペス6型+アデノ41型									1				1			
	AH3型インフルエンザ										1			1			
無菌性髄膜炎	(被検者数)			1	1							1	1	4			
水痘・帯状疱疹	(被検者数)											1		1			
感染性胃腸炎(集団)	(被検者数)	7	23	13		1			4		36	12		96			
	ノロGII ^b		10								16	8		34			
感染性胃腸炎(散発)	(被検者数)	3	3	3	3	12	10	8	11	8	9	10	9	89			
	ノロGII	1	1								2	5	1	10			
	ノロGII+アデノ2型											2		2			
	ノロGII+アデノ型不明										1			1			
	サボ	1			1	1								3			
	アストロ				1					1				2			
	アデノ31型				1									1			
	アデノ41型				1	1	1	1	6	2			1	13			
	アデノ型不明				1									1			
	CA6					1	1							2			
	パレコ1型						3	2		1	1			7			
	CA6+パレコ1型							1						1			
	EVD68+パレコ1型							1						1			
	パレコ3型							1						1			
	A群ロタ								1	1				2			
麻疹	(被検者数)		1					1						2			
	-													0			
風疹	(被検者数)							1						1			
	-													0			
手足口病	(被検者数)		2		2									4			
	CA6		2		2									4			
急性肝炎	(被検者数)				1		1							2			
	新型コロナ						1							1			
つつが虫病	(被検者数)	1			1			1	2	2				7			
(SFTS*: 日本紅斑熱疑い含む) つつが虫病リケッチア		1						1	1					3			
	SFTS								1					1			
オウム病	(被検者数)								1					1			
	-													0			
その他 ^d	(被検者数)	1	1	2	1			1		1				7			
	HHV-6	1												1			
症例合計	(被検者数)	1,410	1,539	368	1,316	1,633	246	43	102	77	107	54	52	6,947			
	病原体検出者数	599	691	227	782	992	181	36	86	59	68	41	38	3,800			

■, 灰色の影で記した数は, 無症状の施設関係者及び接触者を含む。

a, のべ被検者数 (以前検査した症例の再検査は, 複数症例として計上した)。

b, ノロ GII: ノロウイルス Genogroup II.

c, SFTS: 重症熱性血小板減少症候群

d, その他: 4月の1症例は敗血症, 5月の1症例は敗血症, 6月の2症例はそれぞれ発疹症, ライム病, 7月の1症例は帯状疱疹, 10月の1症例は心筋炎, 12月の1症例は胎児水腫。

月別被検者数は, 検体採取日をもとに集計した。

ロウイルス GII が13 症例から、アデノウイルス 41 型が13 症例からそれぞれ検出された。その他、アデノウイルス 2 型、アデノウイルス 31 型、サポウイルス、アストロウイルス、パレコウイルス 1 型、パレコウイルス 3 型、コクサッキーウイルス A6 型、エンテロウイルス D68 型が検出された。

麻疹：麻疹疑い例として検査依頼を受けた2 症例（咽頭拭い液 2，血漿 2，末梢血単核球 2，尿 1）の検査を行ったが，麻疹ウイルスおよび風疹ウイルスは検出されなかった。

風疹：風疹を疑われた1 症例（咽頭拭い液 1，血清 1，尿 1）の検査を行ったが，風疹ウイルスは検出されなかった。

手足口病：4 症例（咽頭拭い液 4）の検査を行ったところ，すべての症例からコクサッキーウイルス A6 型が検出された。

急性肝炎：2 症例（全血 2，血清 2，鼻咽頭拭い液 2，糞便 1，尿 1）の検査を行ったところ，1 症例の鼻咽頭拭い液から SARS-CoV-2 が検出された。アデノウイルスは検出されなかった。

つつが虫病 [マダニ咬症，重症熱性血小板減少症候群（SFTS），日本紅斑熱疑いを含む]：計 7 症

例 [血液（全血，または血漿，血清）8，痂皮または皮膚 5] の検査を行ったところ，3 症例からつつが虫病リケッチアが検出された。また，1 症例から SFTS ウイルスが検出された。ヒトからの SFTS ウイルスの検出は県内初であった。

オウム病：1 症例（鼻咽頭拭い液 1，喀痰 1）の検査を行ったところ，オウム病クラミジアは検出されなかったが，国立感染症研究所において，血清からオウム病クラミジアに対する IgM 抗体および IgG 抗体が確認された。

その他：4 月に発疹症 1 症例（1 歳児）の検査を行ったところ，血清からヒトヘルペスウイルス 6 型が検出された。

謝 辞

ウイルス検査は結果が判明するまでに時間がかかりますが，感染症の発生動向を知るうえで貴重な資料となります。ご多忙の中でご理解，ご協力をいただいた多くの医療機関および防疫機関の関係各位に深くお礼申し上げます。

ポリオ流行予測調査(2022年度)

板持 雅恵	佐賀由美子	矢澤 俊輔	稲崎 倫子
鳶田 嵩久	関口 健治 ¹	吉浦 祐舞 ²	鍋嶋 郁弥 ³
高田 真衣 ⁴	野崎 駆 ⁵	松田 千穂 ⁶	谷 英樹

Epidemiological Surveillance of Poliovirus in Toyama Prefecture
in the Fiscal Year 2022

Masae ITAMACHI, Yumiko SAGA, Shunsuke YAZAWA, Noriko INASAKI,
Takahisa SHIMADA, Kenji SEKIGUCHI, Yui YOSHIURA, Ikumi NABESHIMA,
Mai TAKATA, Kakeru NOZAKI, Chiho MATSUDA, and Hideki TANI

急性灰白髄炎（ポリオ）は、ポリオウイルスが中枢神経へ侵入することにより弛緩性麻痺を呈する感染症である。ヒトの腸管で増殖したポリオウイルスは糞便中に排泄され、経口感染によってヒトの間を伝播する。1988年に世界保健機関（WHO）によりポリオ根絶計画が提唱されて以来、ポリオウイルス野生株によるポリオ症例数は、当初125か国で35万例と推計されていたが、2022年には3か国（アフガニスタン、パキスタン、モザンビーク）からの30例の報告となり、99%以下まで減少した [1]。アフガニスタンやパキスタンでは1型野生株による麻痺症例が報告されている。2型野生株は1999年以降、3型野生株は2012年11月以降報告されていない。世界ポリオ根絶認定委員会は、2015年9月、2型野生株の根絶を宣言した。

一方、ワクチン株が変異し、地域伝播することにより複数の患者に麻痺を発症させる伝播型ワクチン由来ポリオウイルス（cVDPV）による症例は2022年にはアフリカ地域や中東地域、ヨーロッパ地域、アメリカ地域、東南アジア地域の25か国で報告されている [1]。このような流行地からの野生株やcVDPVの侵入を阻止するためには、ポリオウイルスに対する高い集団免疫と、高感度のサーベイランスを維持していくことが重要であると考えられる。一方、国内では生ワクチン関連麻痺を防ぐために、2012年9月からポリオワクチンは不活化ワクチンに変更された。不活化ワクチンへの移行により集団免疫保有状況がどのように

変化したかを評価することは重要である。

富山県におけるポリオ流行予測調査は、国内のポリオウイルスの動向を監視するために、厚生労働省感染症流行予測事業の一つとして毎年実施されている。2022年度の調査内容は、下水流入水についてポリオウイルスの検索を行う「感染源調査」と、県民のポリオウイルスに対する中和抗体保有状況を調べる「感受性調査」であった。本稿では両調査結果をあわせて報告する。

なお、検体を採取するにあたり、本調査の主旨およびプライバシーの保護に対する適切な予防措置が行われることなどについて説明し、承諾の得られた場合にのみ検査を行った。

感染源調査

材料と方法：2022年4月から2023年3月まで、富山県内の1下水処理場（分流式）において、月1回下水流入水を約2 L採取した。下水流入水は4℃で3,000 rpm、30分間遠心し上清を回収後、「フィルター吸着溶出法」[2, 3]により濃縮した。すなわち、下水流入水遠心上清1 Lに、最終濃度0.05 Mとなるように塩化マグネシウムを添加し、0.5 Nの塩酸を用いてpH 3.5に調整した。この液を陰電荷膜に加圧濾過して吸着させた後、陰電荷膜を細切し、 1.0×10^{-3} N NaOH (pH 10.5) 10 mLを添加してボルテックスミキサーによりウイルスを溶出した。溶出液を回収し、 $100 \times$ TE Buffer (pH 8.0) 100 μ Lと0.1 N 硫酸 50 μ Lを加えた後、

1. 新川厚生センター、2. 中部厚生センター、3. 高岡厚生センター、4. 砺波厚生センター、
5. 富山市保健所、6. 富山県厚生部健康対策室

表 1. 下水流入水からのウイルス分離株数

分離ウイルス	2022年												2023年			計
	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月				
ポリオ	1型															0
	2型															0
	3型															0
アデノ レオ	2型								1	1						2
	2型		2		1		4									7
計		0	2	0	1	0	4	0	1	1	0	0	0			9

表 2. ポリオウイルス（セービン株）に対する各中和抗体価の年齢区分別保有状況

1型		各中和抗体価の保有者数										抗体価4倍以上		
年齢区分	検体数	<4	4	8	16	32	64	128	256	≥512	保有者数	保有率(%)	平均抗体価	
(歳)	(人)													
0～1	15	0	0	0	1	5	0	2	3	4	15	(100)	116.7	
2～3	12	0	1	0	1	1	1	1	5	2	12	(100)	114.0	
4～9	21	0	1	2	2	2	5	5	2	2	21	(100)	61.9	
10～14	20	0	0	0	0	3	4	4	5	4	20	(100)	142.0	
15～19	11	0	0	0	1	0	1	4	3	2	11	(100)	154.6	
20～24	18	0	1	0	0	1	4	3	1	8	18	(100)	161.3	
25～29	25	0	1	2	0	1	4	6	4	7	25	(100)	124.5	
30～39	31	2	0	1	4	0	7	6	6	5	29	(93.5)	108.3	
40～49	26	3	2	1	6	5	3	4	1	1	23	(88.5)	36.1	
50～59	23	2	3	1	3	5	5	2	0	2	21	(91.3)	35.3	
60～	23	2	2	2	2	3	5	4	1	2	21	(91.3)	47.6	
合計	225	9	11	9	20	26	39	41	31	39	216	(96.0)	83.5	
(%)		(4.0)	(4.9)	(4.0)	(8.9)	(11.6)	(17.3)	(18.2)	(13.8)	(17.3)	(96.0)			

2型		各中和抗体価の保有者数										抗体価4倍以上		
年齢区分	検体数	<4	4	8	16	32	64	128	256	≥512	保有者数	保有率(%)	平均抗体価	
(歳)	(人)													
0～1	15	0	0	0	1	0	2	0	2	10	15	(100)	280.8	
2～3	11	0	0	0	0	0	0	1	1	9	11	(100)	423.8	
4～9	21	0	0	0	0	0	3	7	6	5	21	(100)	196.6	
10～14	20	0	0	1	1	4	5	6	3	0	20	(100)	71.0	
15～19	11	0	0	0	5	2	1	3	0	0	11	(100)	36.3	
20～24	18	0	1	0	1	5	3	5	1	2	18	(100)	69.1	
25～29	25	0	0	2	7	2	7	5	0	2	25	(100)	47.2	
30～39	31	1	0	2	4	7	5	7	4	1	30	(96.8)	59.7	
40～49	26	0	1	1	3	5	10	3	2	1	26	(100)	51.7	
50～59	23	1	0	3	3	2	4	5	2	3	22	(95.7)	66.0	
60～	23	0	0	5	4	3	3	4	2	2	23	(100)	44.6	
合計	224	2	2	14	29	30	43	46	23	35	222	(99.1)	76.9	
(%)		(0.9)	(0.9)	(6.3)	(12.9)	(13.4)	(19.2)	(20.5)	(10.3)	(15.6)	(99.1)			

3型		各中和抗体価の保有者数										抗体価4倍以上		
年齢区分	検体数	<4	4	8	16	32	64	128	256	≥512	保有者数	保有率(%)	平均抗体価	
(歳)	(人)													
0～1	15	0	1	0	0	2	3	3	5	1	15	(100)	101.6	
2～3	12	0	0	0	0	1	0	3	1	7	12	(100)	271.2	
4～9	21	0	2	0	2	3	3	4	5	2	21	(100)	75.5	
10～14	20	6	3	3	2	2	1	3	0	0	14	(70.0)	19.5	
15～19	11	6	1	2	0	1	0	1	0	0	5	(45.5)	16.0	
20～24	18	8	2	2	4	2	0	0	0	0	10	(55.6)	12.1	
25～29	25	6	6	4	4	1	3	0	1	0	19	(76.0)	13.3	
30～39	31	6	5	10	4	2	2	1	1	0	25	(80.6)	13.2	
40～49	26	6	3	2	6	6	0	2	1	0	20	(76.9)	21.1	
50～59	23	5	3	5	4	2	1	3	0	0	18	(78.3)	17.3	
60～	23	2	1	2	3	6	2	3	2	2	21	(91.3)	47.6	
合計	225	45	27	30	29	28	15	23	16	12	180	(80.0)	30.4	
(%)		(20.0)	(12.0)	(13.3)	(12.9)	(12.4)	(6.7)	(10.2)	(7.1)	(5.3)	(80.0)			

4℃で10,000 rpm, 30分間遠心した。遠心上清を回収し、ポアサイズ0.45 µmのフィルターに濾過して得られた濾液を100倍濃縮下水検体とした(1番溶出液)。同様の溶出操作を繰り返し、2番溶出液を得た。24穴プレートに培養した細胞(Vero, MA104, RD, HEp-2, L20B)に、1番溶出液は各細胞当たり5穴、2番溶出液は3穴の計8穴(総計40穴)接種し(180 µL/穴)、細胞変性効果を指標にウイルスを分離した。分離株は、エンテロウイルス抗血清(国立感染症研究所より分与、またはデンカ)を用いた中和試験により同定した。

結果および考察：下水流入水からは、ポリオウイルスは分離されなかった(表1)。その他のウイルスでは、アデノウイルス2型、およびレオウイルス2型が分離された。

富山県内の感染症発生病動向調査では、急性弛緩性麻痺患者は報告されなかった[4]。これらのことから、県内におけるポリオウイルスやcVDPVの伝播の可能性は低いと推察された。

県内では、不活化ワクチンが導入された2012年9月以降、ポリオウイルスの検出例はないが、他県では国外で生ワクチンを接種した人や下水流入水からポリオウイルスが検出された例がある[5-7]。検出されたウイルスはすべてワクチン株であり、生ワクチン使用国からの持ち込みによると考えられている。世界で野生株、及びcVDPVの検出例や、生ワクチンの使用がある限り、本調査等によるポリオウイルス伝播の監視を継続する必要があると考えられる。

感受性調査

材料と方法：2022年7月から10月にかけて、県内住民0～85歳の合計225名(ポリオウイルス2型については224名)について、採血と予防接種歴の調査を行った。

中和抗体価の測定は、「感染症流行予測調査事業検査術式」[8]に準じて行った。なお、2017年度からWHOによるポリオウイルス病原体バイオリスク管理の基本方針に基づいた調査実施要領[9]により、2型ポリオウイルスに対する中和抗体価は国立感染症研究所において測定されることとなっている。1型および3型のポリオウイルスに対する中和抗体価はこれまでと同様、当所において測定した。すなわち、被験血清をEagle-MEM

培養液で4倍希釈し、56℃ 30分間非働化した後、その25 µLを96穴マイクロプレート上で2段階希釈した。希釈血清それぞれに、100 TCID₅₀/25 µLとなるように調製した1, 3型のポリオウイルス(弱毒セービンウイルス)25 µLを加えてよく混和し、35℃、3時間の中和反応を行った。中和後、Vero細胞浮遊液(1～2×10⁵細胞/mL)を100 µLずつ加え、35℃、5%二酸化炭素の条件下で培養した。細胞変性効果を1週間観察し、ウイルス増殖を抑制した最大血清希釈倍数を中和抗体価とした。各検体は同時に2穴ずつ測定した。ポリオウイルスは、国立感染症研究所から分与され、当研究所においてVeroE6細胞で1代継代後、さらにVero細胞で1代継代したものを使用した。

結果および考察：表2にポリオウイルスに対する各中和抗体価の年齢区分別保有状況を示した。4倍以上を陽性とした抗体保有率は、全体では2型が99.1% (222/224)で最も高く、次いで1型が96.0% (216/225)、3型が80.0% (180/225)であり、ポリオウイルスに対する集団免疫は1, 2型については高く維持されていると考えられた。年齢区分別の抗体保有率は、1型では40～49歳が88.5%、それ以外の年齢区分は90%以上の抗体保有率であった。2型ではすべての年齢区分で95%以上の抗体保有率であった。一方、3型は15～19歳が45.5%、20～24歳が55.6%と低く、それ以外の年齢区分が70%以上であった。ポリオウイルス生ワクチン接種者において、1型、2型に比し3型の抗体保有率が低いのは、これまでの全国の調査でも同様である[6]。

一方、抗体保有者の幾何平均抗体価は、全体では1型83.5倍、2型76.9倍、3型30.4倍であった。年齢区分別では、1型では50～59歳の35.3倍から20～24歳の161.3倍までを示した。2型では15～19歳の36.3倍から2～3歳の423.8倍までを示した。3型では20～24歳の12.1倍から2～3歳の271.2倍までを示した。

表3にワクチン接種回数別にみた抗体保有状況を示した。4回以上の不活化ワクチン接種者における抗体保有率は、1, 2, 3型すべてで100% (37/37)と高かった。一方、2回の生ワクチン接種では、1型および2型は100% (35/35)と高い抗体保有率を示したが、3型は60.0% (21/35)と低値を示した。

表4に1, 2, 3型ポリオウイルスに対する中和抗体の年齢区分別保有状況を示した。すべての型

表 3. ワクチン接種歴別 抗体保有状況

1型		ワクチン接種歴あり												接種歴不明	
年齢区分 (歳)	検体数 (人)	生2回以上		生1回		生1回不活化3回		不活化4回以上		不活化3回		回数不明		接種歴不明	
		陽性数/検査数	保有率(%)	陽性数/検査数	保有率(%)	陽性数/検査数	保有率(%)	陽性数/検査数	保有率(%)	陽性数/検査数	保有率(%)	陽性数/検査数	保有率(%)		
0～1	15							1 / 1	(100)	13 / 13	(100)	1 / 1	(100)		
2～3	12							12 / 12	(100)						
4～9	21							20 / 20	(100)	1 / 1	(100)				
10～14	20	15 / 15	(100)			1 / 1	(100)	4 / 4	(100)						
15～19	11	9 / 9	(100)	1 / 1	(100)							1 / 1	(100)		
20～24	18	6 / 6	(100)									1 / 1	(100)	11 / 11 (100)	
25～29	25	2 / 2	(100)									2 / 2	(100)	21 / 21 (100)	
30～39	31	1 / 1	(100)									3 / 3	(100)	25 / 27 (92.6)	
40～49	26	2 / 2	(100)									5 / 6	(83.3)	16 / 18 (88.9)	
50～59	23											1 / 1	(100)	20 / 22 (90.9)	
60～	23											1 / 1	(100)	20 / 22 (90.9)	
合計	225	35 / 35	(100)	1 / 1	(100)	1 / 1	(100)	37 / 37	(100)	14 / 14	(100)	15 / 16	(93.8)	113 / 121 (93.4)	
103 / 104 (99.0%)															

2型		ワクチン接種歴あり												接種歴不明	
年齢区分 (歳)	検体数 (人)	生2回以上		生1回		生1回不活化3回		不活化4回以上		不活化3回		回数不明		接種歴不明	
		陽性数/検査数	保有率(%)	陽性数/検査数	保有率(%)	陽性数/検査数	保有率(%)	陽性数/検査数	保有率(%)	陽性数/検査数	保有率(%)	陽性数/検査数	保有率(%)		
0～1	15							1 / 1	(100)	13 / 13	(100)	1 / 1	(100)		
2～3	11							11 / 11	(100)						
4～9	21							20 / 20	(100)	1 / 1	(100)				
10～14	20	15 / 15	(100)			1 / 1	(100)	4 / 4	(100)						
15～19	11	9 / 9	(100)	1 / 1	(100)							1 / 1	(100)		
20～24	18	6 / 6	(100)									1 / 1	(100)	11 / 11 (100)	
25～29	25	2 / 2	(100)									2 / 2	(100)	21 / 21 (100)	
30～39	31	1 / 1	(100)									3 / 3	(100)	26 / 27 (96.3)	
40～49	26	2 / 2	(100)									6 / 6	(100)	18 / 18 (100)	
50～59	23											1 / 1	(100)	21 / 22 (95.5)	
60～	23											1 / 1	(100)	22 / 22 (100)	
合計	224	35 / 35	(100)	1 / 1	(100)	1 / 1	(100)	36 / 36	(100)	14 / 14	(100)	16 / 16	(100)	119 / 121 (98.3)	
103 / 103 (100%)															

3型		ワクチン接種歴あり												接種歴不明	
年齢区分 (歳)	検体数 (人)	生2回以上		生1回		生1回不活化3回		不活化4回以上		不活化3回		回数不明		接種歴不明	
		陽性数/検査数	保有率(%)	陽性数/検査数	保有率(%)	陽性数/検査数	保有率(%)	陽性数/検査数	保有率(%)	陽性数/検査数	保有率(%)	陽性数/検査数	保有率(%)		
0～1	15							1 / 1	(100)	13 / 13	(100)	1 / 1	(100)		
2～3	12							12 / 12	(100)						
4～9	21							20 / 20	(100)	1 / 1	(100)				
10～14	20	9 / 15	(60)			1 / 1	(100)	4 / 4	(100)						
15～19	11	4 / 9	(44.4)	0 / 1	(0)							1 / 1	(100)		
20～24	18	3 / 6	(50)									1 / 1	(100)	6 / 11 (54.5)	
25～29	25	2 / 2	(100)									1 / 2	(50)	16 / 21 (76.2)	
30～39	31	1 / 1	(100)									3 / 3	(100)	21 / 27 (77.8)	
40～49	26	2 / 2	(100)									5 / 6	(83.3)	13 / 18 (72.2)	
50～59	23											1 / 1	(100)	17 / 22 (77.3)	
60～	23											0 / 1	(0)	21 / 22 (95.5)	
合計	225	21 / 35	(60.0)	0 / 1	(0)	1 / 1	(100)	37 / 37	(100)	14 / 14	(100)	13 / 16	(81.3)	94 / 121 (77.7)	
86 / 104 (82.7%)															

に対する抗体を保有している人の割合は、全体では78.1% (175/224)であった。年齢区分別では、0～9歳が100%と高かった。15～19歳が45.5%、20～24歳が55.6%と比較的低い値を示したが、これらは、3型に対する低い中和抗体保有率を反映しているものと考えられた(表2)。

わが国では、ポリオワクチンは1961年に乳幼児を対象に一斉に生ワクチンの接種が開始され、1963年からは2回接種が定期的に行われてきた[10]。その後、2012年9月からは不活化ワクチンの個別接種に切り替えられた[6]。不活化ワクチンの接種スケジュールは、生後3か月以上90か月未満の間に計4回接種する。初回接種として20～

56日間隔で(標準として12か月までに)3回接種し、その後追加免疫として初回免疫終了後12～18か月の間を標準として1回接種する[11]。

生ワクチンから不活化ワクチンへの移行が集団免疫へ及ぼした影響をみるために、移行前後の年(2011～2022年)における小児(0～10歳)の抗体保有状況[12-22]を比較した。検体数は、計846件であり、このうち、生ワクチン2回以上接種者は303名(35.8%)、不活化ワクチン4回以上接種者は245名(29.0%)であった。図1A、1Bに2011年から2022年までの小児(0～10歳)におけるポリオワクチン接種歴、および抗体保有率のそれぞれの推移を示した。不活化ワクチン移

表 4. 1・2・3 型ポリオウイルスに対する中和抗体の年齢区分別保有状況

年齢区分 (歳)	検体数 (人)	1,2,3型 ともに 抗体陰性	中和抗体の型別保有者数						1,2,3型(%)
			1型	2型	3型	1,2型	2,3型	1,3型	
0～1	15								15 (100)
2～3	11								11 (100)
4～9	21								21 (100)
10～14	20					6			14 (70.0)
15～19	11					6			5 (45.5)
20～24	18					8			10 (55.6)
25～29	25					6			19 (76.0)
30～39	31		1			5	2		23 (74.2)
40～49	26			3		3			20 (76.9)
50～59	23		1	1		3	1		17 (73.9)
60～	23			1		1	1		20 (87.0)
合計	224	0	2	5	0	38	4	0	175 (78.1)
(%)	(100)	(0)	(0.9)	(2.2)	(0)	(17.0)	(1.8)	(0)	(78.1)

行前の2011～2012年では、未接種者以外のすべてが生ワクチンを接種していた。不活化ワクチン移行後は、低年齢層から不活化ワクチンの接種にかわり、2022年では0～10歳のすべてが不活化ワクチンを接種していた。生ワクチンから不活化ワクチンへの切り替えにより、特に3型の抗体保有率がほぼ100%と高くなり改善した。

図2に、不活化ワクチン4回以上接種者における中和抗体価を、最終接種日からの経過月数別に示した。不活化ワクチン4回以上接種者では、1型、2型、3型ともに、経過月数を経るごとに中和抗体価が低くなる傾向がみられた(Jonckheere-Terpstra検定, 1型, 2型, 3型それぞれ $p<0.001$)。

生ワクチンは3種類のウイルスを同時に接種するため、ウイルスの干渉作用により、2型に比べ1型、さらに3型のポリオウイルスに対する免疫が得られにくいことが報告されている[23, 24]。不活化ワクチンの臨床試験では、4回の接種で生ワクチン接種と同等の免疫原性を有した結果が報告されている[25-28]。本調査でも不活化ワクチン接種者は今のところ3型も含めて高い抗体保有率を示しているが、不活化ワクチンへの移行が接種後の持続免疫や集団免疫保有状況にどのような影響を及ぼすかは、今後も推移を見ていく必要がある。

本調査では、県内においてポリオウイルスに対する高い抗体保有率が維持されていた。しかしながら、世界で野生株の伝播が止まり、生ワクチンが使用されなくなるまでは、ウイルスの侵入や地域伝播を防ぐために、今後も高い集団免疫を保ち、

適切な調査体制を維持していくことが重要である。

まとめ

感染源調査：2022年4月～2023年3月に毎月1回、下水流入水についてポリオウイルスの検査を実施した。その結果、ポリオウイルスは検出されなかった。

感受性調査：2022年7月から10月に採取された0歳から85歳までの225名(2型ポリオウイルスは224名)の血清について、ポリオウイルス(弱毒セービンウイルス)に対する中和抗体価を測定した。抗体価4倍以上の抗体保有率は1型96.0%、2型99.1%、3型80.0%であった。また、抗体保有者の幾何平均抗体価は1型83.5倍、2型76.9倍、3型30.4倍を示した。

謝 辞

本調査を実施するにあたり、検体採取等にご協力いただいた医療機関、下水処理場、ポリオウイルス2型の中和抗体価を測定いただいた国立感染症研究所、その他関係各位に深く感謝申し上げます。

文 献

1. WHO (2023). Weekly epidemiological record, 98, 195-204

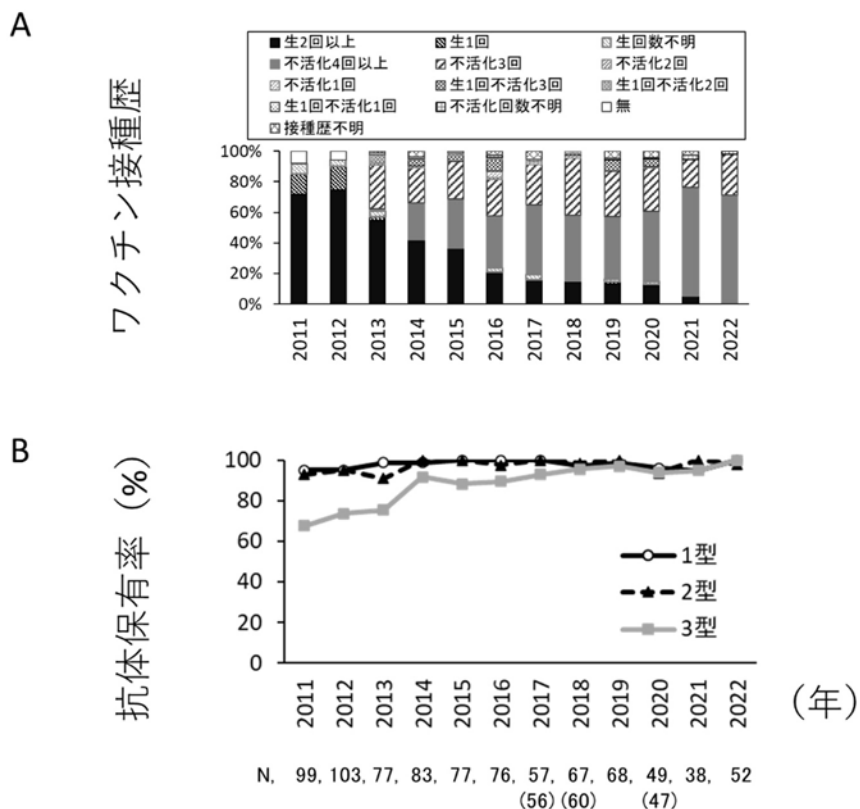


図 1. 0 ～ 10 歳の小児におけるポリオワクチン接種歴と抗体保有状況 (2011 ～ 2022 年) .

A: ワクチン接種歴, B: 抗体保有率, N 数の () は, ポリオ 2 型の検体数.

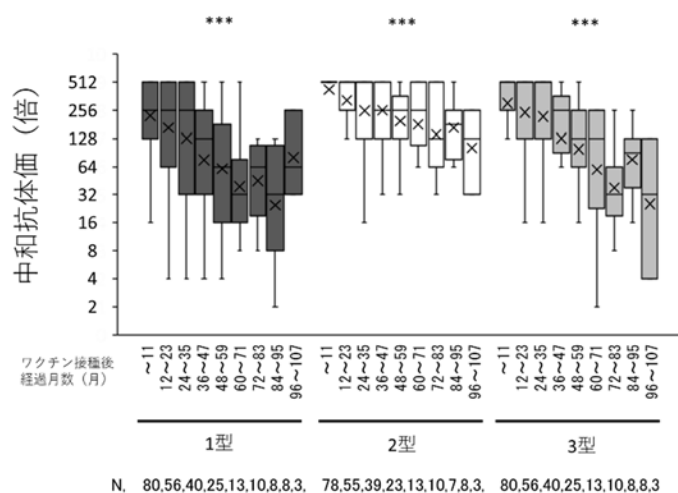


図 2. 不活化ワクチン 4 回以上接種後の経過期間別の中和抗体価 .

* 抗体価 512 倍以上を 512 倍とし, 4 倍未満を 2 倍とした.

***, Jonckheere-Terpstra 検定, $p < 0.001$

2. 国立感染症研究所, 全国地方衛生研究所 (2012). ポリオウイルス感染症の実験室診断マニュアル, 28-38
3. 板持雅恵, 名古屋真弓, 稲崎倫子, 他. (2017). 富山県衛生研究所年報 (平成 28 年度), 40, 55-60
4. 富山県感染症情報センター. 発生動向調査からのデータ, <https://www.pref.toyama.jp/branches/1279/kansen/ID=siryo.htm>
5. 国立感染症研究所, 厚生労働省健康局結核感染症課 (2015). 病原微生物検出情報, 36, 86-87
6. 国立感染症研究所, 厚生労働省健康局結核感染症課 (2016). 病原微生物検出情報, 37, 17-31
7. 国立感染症研究所, 厚生労働省健康局結核感染症課 (2018). 病原微生物検出情報, 39, 67-69
8. 厚生労働省健康局結核感染症課, 国立感染症研究所流行予測調査事業委員会 (2019). 感染症流行予測調査事業検査術式, 4-21
9. 厚生労働省 (2017). 平成 29 年度感染症流行予測調査実施要領, 5
10. 厚生労働省, 国立感染症研究所 (2001). 感染症発生動向調査週報, 3 (26), 8-11
11. 厚生労働省 (2013). 予防接種法第 5 条第 1 項の規定による予防接種の実施について, 平成 25 年 3 月 30 日付健発第 0330 第 2 号厚生労働省健康局長通知, 定期接種実施要領
12. 板持 (岩井) 雅恵, 堀元栄詞, 小淵正次, 他. (2012). 富山県衛生研究所年報 (平成 23 年度), 35, 62-67
13. 嶋一世, 板持雅恵, 堀元栄詞, 他. (2013). 富山県衛生研究所年報 (平成 24 年度), 36, 100-105
14. 板持雅恵, 嶋一世, 堀元栄詞, 他. (2014). 富山県衛生研究所年報 (平成 25 年度), 37, 93-99
15. 長谷川澄代, 稲畑良, 小淵正次, 他. (2015). 富山県衛生研究所年報 (平成 26 年度), 38, 80-85
16. 板持雅恵, 稲畑良, 名古屋真弓, 他 (2016). 富山県衛生研究所年報 (平成 27 年度), 39, 80-84
17. 板持雅恵, 稲畑良, 稲崎倫子, 他. (2017). 富山県衛生研究所年報 (平成 28 年度), 40, 88-93
18. 板持雅恵, 稲崎倫子, 米田哲也, 他. (2018). 富山県衛生研究所年報 (平成 29 年度), 41, 78-84
19. 板持雅恵, 稲崎倫子, 米田哲也, 他. (2019). 富山県衛生研究所年報 (平成 30 年度), 42, 87-94
20. 板持雅恵, 稲崎倫子, 寫田嵩久, 他. (2020). 富山県衛生研究所年報 (令和元年度), 43, 74-81
21. 板持雅恵, 稲崎倫子, 寫田嵩久, 他. (2021). 富山県衛生研究所年報 (令和 2 年度), 44, 58-65
22. 板持雅恵, 矢澤俊輔, 五十嵐笑子, 他. (2022). 富山県衛生研究所年報 (令和 3 年度), 45, 56-63
23. Maladonado, Y.A., Pema-Cruz, V., Sanchez, M. et. al. (1997). J. Infect. Dis., 175, 545-553
24. 土居穰, 鎗水宏, 山本浩, 他. (1993). 臨床とウイルス, 21, 123-131
25. Modlin, J.F., Halsey, N.A., Thoms, M.L. (1997). J. Infect. Dis., 175, S228-234
26. 一般財団法人阪大微生物病研究会, 田辺三菱製薬株式会社 (2013). テトラビック皮下注シリンジ医薬品インタビューフォーム, 改訂第 4 版, 14-29
27. 一般財団法人科学及び血清療法研究所, アステラス製薬株式会社 (2013). クアトロバック皮下注シリンジ医薬品インタビューフォーム, 改訂第 3 版, 7-21
28. Satoh, H., Tanaka-Taya, K., Shimizu, H., et al. (2019). Vaccine, 37, 1964-1971

日本脳炎流行予測調査における感受性調査(2022年度)

矢澤 俊輔 嵩田 嵩久 佐賀由美子 山崎 笑子
板持 雅恵 稲崎 倫子 関口 健治¹ 吉浦 祐舞²
鍋嶋 郁弥³ 高田 真衣⁴ 服部 瑞樹⁵ 松田 千穂⁶
谷 英樹

Serological Investigation of Japanese Encephalitis in Toyama Prefecture in the Fiscal Year 2022

Shunsuke YAZAWA, Takahisa SHIMADA, Yumiko SAGA, Emiko YAMAZAKI,
Masae ITAMOCHI, Noriko INASAKI, Kenji SEKIGUCHI, Yui YOSHIURA,
Ikumi NABESHIMA, Mai TAKATA, Mizuki HATTORI, Chiho MATSUDA,
and Hideki TANI

目的：本調査は、富山県住民の日本脳炎ウイルスに対する中和抗体保有状況を調べ、今後の流行の可能性を推定し、感染予防に役立てることを目的として実施した。

調査および検査方法：2022年7月から10月に、県内住民225名について採血と予防接種歴、罹患歴の調査を行った。

日本脳炎ウイルスに対する中和抗体価の測定は、peroxidase-anti-peroxidase (PAP) 法を応用したフォーカス計数法にて行った。血清を56℃、30分間非働化した後、10倍から2倍階段希釈し、100 focus forming units (FFU) /50 μL に調製したウイルス液（日本脳炎 Beijing-1 株）と等量で混合した。37℃、1時間の中和反応の後、Vero Osaka 細胞に接種した。37℃で1時間ウイルスを吸着させた後、培養液を追加し、37℃で46時間培養した。細胞を洗浄・固定後、抗日本脳炎ウイルスウサギ血清を用いたPAP法によってウイルスフォーカスを染色した。被検血清を加えていないコントロールに比較して、フォーカス数が50%以上減少した最大希釈倍数を中和抗体価とした。抗体価10倍以上を抗体陽性とした。

結果および考察：225名のうち、日本脳炎ウイルスに対する抗体陽性者は179名(79.6%)であった。図1に年齢群別の抗体保有率を示した。年齢

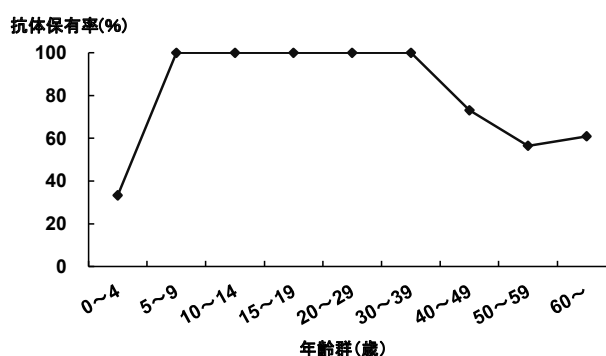


図1. 年齢群別の中和抗体保有率(2022年度)

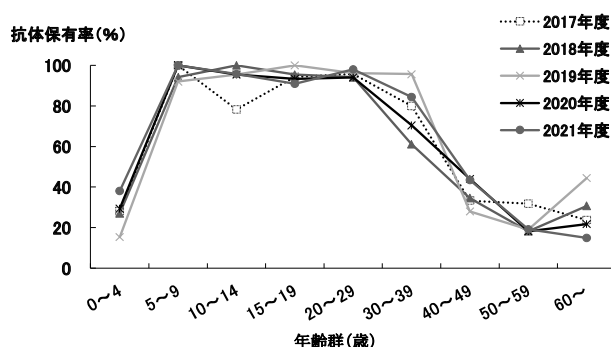


図2. 年齢群別の中和抗体保有率(2017～2021年度)

1. 新川厚生センター, 2. 中部厚生センター, 3. 高岡厚生センター, 4. 砺波厚生センター,
5. 富山市保健所, 6. 富山県厚生部健康対策室

表 1. 年齢群別およびワクチン接種歴別の中和抗体保有率

年齢群 (歳)	接種歴あり		接種歴なし		接種歴不明		合計	
	陽性数/検査数	陽性率	陽性数/検査数	陽性率	陽性数/検査数	陽性率	陽性数/検査数	陽性率
0～4	6 / 6	100.0%	4 / 23	17.4%	0 / 1	0.0%	10 / 30	33.3%
0～2	0 / 0		4 / 21	19.0%	0 / 1	0.0%	4 / 22	18.2%
3	3 / 3	100.0%	0 / 2	0.0%	0 / 0		3 / 5	60.0%
4	3 / 3	100.0%	0 / 0		0 / 0		3 / 3	100.0%
5～9	17 / 17	100.0%	1 / 1	100.0%	0 / 0		18 / 18	100.0%
10～14	20 / 20	100.0%	0 / 0		0 / 0		20 / 20	100.0%
15～19	10 / 10	100.0%	0 / 0		0 / 0		10 / 10	100.0%
20～29	15 / 15	100.0%	1 / 1	100.0%	28 / 28	100.0%	44 / 44	100.0%
30～39	5 / 5	100.0%	1 / 1	100.0%	25 / 25	100.0%	31 / 31	100.0%
40～49	4 / 6	66.7%	1 / 1	100.0%	14 / 19	73.7%	19 / 26	73.1%
50～59	1 / 1	100.0%	0 / 0		12 / 22	54.5%	13 / 23	56.5%
60～	2 / 4	50.0%	2 / 2	100.0%	10 / 17	58.8%	14 / 23	60.9%
計	80 / 84	95.2%	10 / 29	34.5%	89 / 112	79.5%	179 / 225	79.6%

群別に見ると、5～39歳では100%と高い抗体保有率を示した。これに対し、0～4歳では33.3%、40～49歳では73.1%、50～59歳では56.5%、60歳以上では60.9%と低い保有率を示す年齢群が存在した。この0～4歳の年齢群と40歳以上の年齢群で抗体保有率が低くなる傾向は、近年の富山県の結果[1-5](図2)や全国の結果[6]とほぼ同様であった。

0～4歳の乳幼児における抗体保有率が低い原因は、0～4歳の年齢群においてワクチン未接種者の割合が多いことが原因としてあげられる。日本脳炎ワクチンの標準的な接種年齢は3歳で2回(第1期)、4歳で1回(第1期追加)、9歳で1回追加(第2期)の計4回である[7]。図3に年齢群別のワクチン接種歴を、表1に年齢群別およびワクチン接種歴別の抗体保有率を示す。今回調査の0～4歳の年齢群におけるワクチン未接種者の割

合は76.6%(23/30)であった(図3、表1)。また、0～4歳の年齢群では、「ワクチン接種歴なし」の抗体保有率は17.4%(4/23)であり、「ワクチン接種歴あり」の抗体保有率は100%(6/6)であった(表1)。このことから、0～4歳の年齢群においては、ワクチン未接種者がこの年齢群の抗体保有率を引き下げているといえる。

40歳以上の年齢群で抗体保有率が低い理由は、加齢に伴いワクチン効果が減弱したためと考えられる。

年齢群別およびワクチン接種歴別の抗体保有率(表1)を見ると、「接種歴なし」の中に抗体陽性者が10名(34.5%)存在した。いずれも「罹患歴なし」であり、不顕性感染していた可能性がある。この値は、2016年～2020年の5年平均(16.9%)と比較して大きく増加し、昨年(40.6%)と同様高い値となった。全国平均(22.7%) [6]と比較しても高いことから、今後の動向を注視していく必要がある。

富山県では1997年を最後に日本脳炎患者は報告されていないが[8]、全国においては、日本脳炎ワクチン未接種の小児や高齢者からの患者発生が報告されている[6,7]。特に、2020年には隣県の石川県においても患者が発生している[9]。また、豚の抗体保有調査やウイルス分離調査において、近年も県内に日本脳炎ウイルスが存在していることが確認されている[8,10-13]。これらのことから、県内においても日本脳炎ウイルスに感染するリスクがあると推定されるため、日本脳炎の感染予防

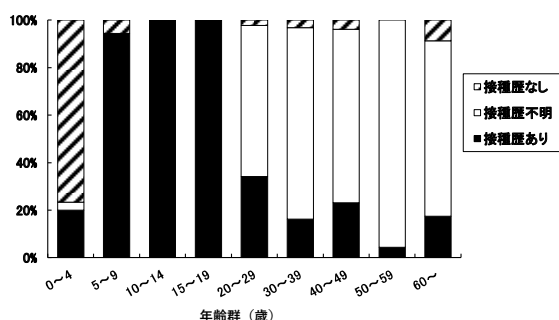


図 3. 年齢群別のワクチン接種歴 (2022 年度)

対策は継続して実施していかなければならない。したがって、引き続き感受性調査を実施し、日本脳炎ウイルスに対する抗体を保有していない者がどのくらい存在するのか把握する必要がある。

今回の調査では、例年と同様、県内においても0～4歳の小児や高齢者における抗体保有率が低いことが示された。したがって、これらの集団は日本脳炎ウイルスに感染するリスクが高いため、注意喚起が必要である。

まとめ：今回の調査では、県民の抗体保有率は79.6%であった。また、例年と同様、乳幼児および高齢者の抗体保有率が低いことが確認された。さらに、昨年に引き続きワクチン接種歴なしの抗体陽性者が大きく増加したことから、不顕性な自然感染の可能性も含めて今後の動向に注視していく必要がある。富山県では1997年を最後に日本脳炎患者は報告されていないものの[8]、近年においても県内に日本脳炎ウイルスが存在していることが確認されている[8,10-13]。

したがって、日本脳炎ウイルスに感染するリスクの高い抗体保有率の低い年代に対して、注意喚起が必要である。

謝 辞

本調査の実施にあたり、採血にご協力いただいた方々、検体採取等にご協力いただいた医療機関の方々、その他関係各位に深謝いたします。

文 献

1. 稲崎倫子, 青柳由美子, 米田哲也, 他. (2018). 富山衛研年報, 41, 75-77
2. 名古屋真弓, 畠田嵩久, 板持雅恵, 他. (2019). 富山衛研年報, 42, 84-86
3. 畠田嵩久, 長谷川澄代, 佐賀由美子, 他. (2020). 富山衛研年報, 43, 88-90
4. 畠田嵩久, 佐賀由美子, 五十嵐笑子, 他. (2021). 富山衛研年報, 44, 70-72
5. 矢澤俊輔, 長谷川澄代, 佐賀由美子, 他. (2022). 富山衛研年報, 45, 64-66
6. 厚生労働省健康局結核感染症課, 国立感染症研究所感染症情報センター(2022). 令和2年度感染症流行予測調査報告書, 105-128
7. 国立感染症研究所(2017). 病原微生物検出情報, 38, 151-152
8. Obara M, Yamauchi T, Watanabe M, et al. (2011). Am. J. Trop. Med. Hyg., 84, 695-708
9. 国立感染症研究所. 感染症発生動向調査週報(IDWR) <https://www.niid.go.jp/niid/ja/idwr-dl/2020.html> (2022年5月17日アクセス可能)
10. 佐賀由美子, 名古屋真弓, 稲崎倫子, 他. (2016). 富山衛研年報, 39, 69-75
11. 佐賀由美子, 名古屋真弓, 稲崎倫子, 他. (2017). 富山衛研年報, 40, 77-83
12. 佐賀由美子, 稲崎倫子, 青柳由美子, 他. (2018). 富山衛研年報, 41, 68-74
13. 佐賀由美子, 畠田嵩久, 長谷川 澄代, 他. (2021). 富山衛研年報, 44, 66-69

新型コロナウイルス感染症流行予測調査における感受性調査(2022年度)

佐賀由美子 板持 雅恵 稲崎 倫子 矢澤 俊輔
 鳶田 嵩久 関口 健治¹ 吉浦 祐舞² 鍋嶋 郁弥³
 高田 真衣⁴ 野崎 駆⁵ 松田 千穂⁶ 谷 英樹

Serological Investigation of Covid-19 in Toyama Prefecture
in the Fiscal Year 2022

Yumiko SAGA, Masae ITAMOCHI, Noriko INASAKI, Shunsuke YAZAWA,
 Takahisa SHIMADA, Kenji SEKIGUCHI, Yui YOSHIURA, Ikumi NABESHIMA,
 Mai TAKATA, Kakeru NOZAKI, Chiho MATSUDA, and Hideki TANI

目的：本調査は、富山県住民の新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）に対する中和抗体保有状況を調べ、今後の流行の可能性を推定し、感染予防に役立てることを目的として実施した。

調査および検査方法：2022年7月から10月に、県内住民0～85歳の合計225名について採血と予防接種歴、罹患歴の調査を行った。

中和抗体価の測定は、「感染症流行予測調査事業検査術式」[1]に準じて行った。被験血清をDMEM培養液で2.5倍希釈し、56℃ 30分間非働化した後、その50 μLを96穴マイクロプレート上で2段階希釈した。希釈血清それぞれに、100 TCID₅₀/50 μLとなるように調製したSARS-CoV-2 WK-521株50 μLを加えてよく混和し、37℃、1時間の中和反応を行った。中和後、VeroE6/TMPRSS2細胞浮遊液(1×10⁵細胞/mL)を100 μLずつ加え、37℃、5% CO₂の条件下で5～6日間培養した。細胞を固定後、クリスタルバイオレットで染色・観察し、ウイルス増殖を抑制した最大血清希釈倍数を中和抗体価とした。各検体は同時に2穴ずつ測定した。SARS-CoV-2は、国立感染症研究所から分与され、当研究所においてVeroE6/TMPRSS2細胞で1代継代後、さらにVero E6/TMPRSS2細胞で1代継代したものを使用した。

結果および考察：新型コロナウイルスに対する抗体保有率は79% (178/225)であり、2021年度[2]の33% (72/221)から顕著に上昇した。図1に年

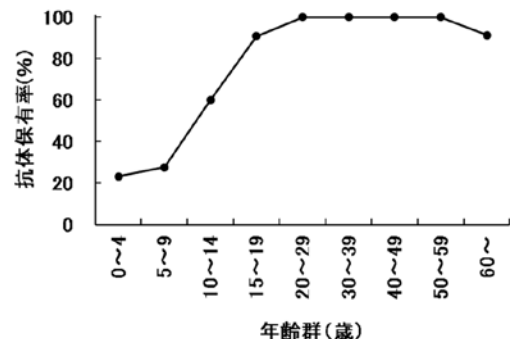


図1. 年齢群別の中和抗体保有率 (2022年度)

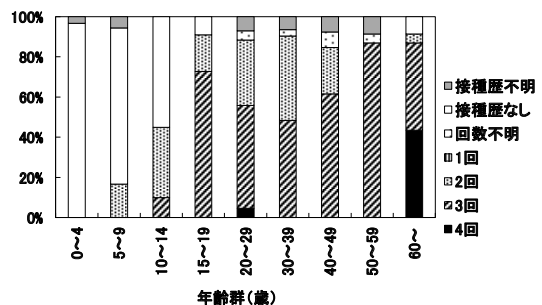


図2. 年齢群別のワクチン接種歴 (2022年度)

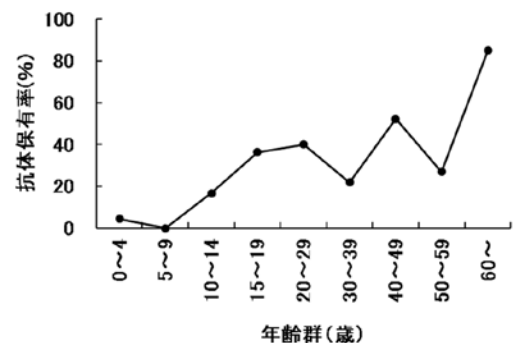


図3. 年齢群別の中和抗体保有率 (2021年度)

1. 新川厚生センター, 2. 中部厚生センター, 3. 高岡厚生センター, 4. 砺波厚生センター,
 5. 富山市保健所, 6. 富山県厚生部健康対策室

表 1. 年齢群別およびワクチン接種歴別の中和抗体保有率

年齢群 (歳)	抗体保有者数/検体数(抗体保有率)							
	接種歴なし	2回接種済み	3回接種済み	4回接種済み	接種済み(回数不明)	接種歴不明	合計	
0~4	6 / 29 (21%)	0 / 0 -	0 / 0 -	0 / 0 -	0 / 0 -	1 / 1 (100%)	7 / 30 (23%)	
5~9	1 / 14 (7%)	3 / 3 (100%)	0 / 0 -	0 / 0 -	0 / 0 -	1 / 1 (100%)	5 / 18 (28%)	
10~14	3 / 11 (27%)	7 / 7 (100%)	2 / 2 (100%)	0 / 0 -	0 / 0 -	0 / 0 -	12 / 20 (60%)	
15~19	0 / 1 (0%)	2 / 2 (100%)	8 / 8 (100%)	0 / 0 -	0 / 0 -	0 / 0 -	10 / 11 (91%)	
20~29	0 / 0 -	14 / 14 (100%)	22 / 22 (100%)	2 / 2 (100%)	2 / 2 (100%)	3 / 3 (100%)	43 / 43 (100%)	
30~39	0 / 0 -	13 / 13 (100%)	15 / 15 (100%)	0 / 0 -	1 / 1 (100%)	2 / 2 (100%)	31 / 31 (100%)	
40~49	0 / 0 -	6 / 6 (100%)	16 / 16 (100%)	0 / 0 -	2 / 2 (100%)	2 / 2 (100%)	26 / 26 (100%)	
50~59	0 / 0 -	0 / 0 -	20 / 20 (100%)	0 / 0 -	1 / 1 (100%)	2 / 2 (100%)	23 / 23 (100%)	
60~	0 / 2 (0%)	1 / 1 (100%)	10 / 10 (100%)	10 / 10 (100%)	0 / 0 -	0 / 0 -	21 / 23 (91%)	
合計	10 / 57 (18%)	46 / 46 (100%)	93 / 93 (100%)	12 / 12 (100%)	6 / 6 (100%)	11 / 11 (100%)	178 / 225 (79%)	

年齢群別の抗体保有率を示した。年齢群別に見ると、15歳以上では91～100%と高い抗体保有率を示した。一方、0～4歳では23%、5～9歳では28%、10～14歳では60%と、低い抗体保有率を示した。年齢群別のワクチン接種率は、0～4歳が0%、5～9歳が17%、10～14歳が45%と低いのに対し、15歳以上では91%以上と高かった(図2)。14歳以下で抗体保有率が低くなるのは、ワクチン未接種者の割合が多いことが原因であると考えられた。

表1に年齢群別およびワクチン接種歴別の抗体保有率を示した。ワクチン接種歴別の抗体保有率は、「接種歴なし」が18%(10/57)、「接種済み」が100%(147/147)、「接種歴不明」が100%(6/6)であった。なお、今回の調査では「1回接種済み」と回答した者はいなかった。

年齢群別およびワクチン接種歴別の抗体保有率(表1)を見ると、「接種歴なし」の中に抗体陽性者が10名(18%)存在した。これら10名の新型コロナウイルス罹患歴は、5名は「あり」で、5名は「なし」であった。罹患歴「なし」の抗体陽性者5名は、新型コロナウイルスに不顕性感染した可能性が考えられた。

年齢群別の抗体保有率について、2021年の富山県の結果[2](図3)と比較すると、15～59歳の抗体保有率は、2021年は22～52%と低かったのに対し、91～100%と高かった。この違いの原因は、2021年の調査時期には、65歳以上の高齢者へのワクチン接種が優先的に行われていたため、59歳以下の年齢群では「接種歴なし」の割合が高かった[2]のに対し、2022年の調査時期には15～59歳以下の年齢群において「接種歴なし」の割合が少なかった(図2)ことによると考えられた。一方、2021年、2022年において、14歳以下、特に9歳以下の年齢群の抗体保有率が低い傾向は一

致していた。この原因は、これらの年齢群において、ワクチン未接種者の割合が多いことが挙げられる。なお、新型コロナワクチンの標準的な接種年齢は、接種が開始された当初は16歳以上であり、2021年8月に12歳以上、2022年5月に5歳以上、2022年10月に生後6か月以上と、順次引き下げられた[3]。

今回の調査では、14歳以下、特に0～9歳の小児における抗体保有率が低いことが示された。したがって、これらの集団は新型コロナウイルスに感染するリスクが高いため、注意喚起が必要である。

まとめ：今回の調査では、県民の抗体保有率は79%であった。また、ワクチン接種が進んでいない14歳以下では抗体保有率が低く、ワクチン接種率が高い15歳以上では抗体保有率が高いことが確認された。さらに、不顕性な自然感染をしている人がいることも推定された。新型コロナウイルスに感染するリスクの高い抗体保有率の低い年代や重症化しやすい年代に対して、引き続き注意喚起が必要である。

謝 辞

本調査を実施するにあたり、検体採取等にご協力いただいた医療機関、その他関係各位に深謝いたします。

文 献

1. 厚生労働省健康局結核感染症課, 国立感染症研究所流行予測調査事業委員会. 令和3年度感染症流行予測調査事業検査術式, 60-67

2. 佐賀由美子, 五十嵐笑子, 板持雅恵, 他.
(2022). 富山衛研年報, 45, 67-69
3. 厚生労働省. 新型コロナワクチンに関する自治体向け通知・事務連絡等. [https://www.](https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/vaccine_notifications.html)

[mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/vaccine_notifications.html](https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/vaccine_notifications.html) (2023 年 5 月 29 日アクセス可能)

富山県の小児科医療機関における感染性胃腸炎ウイルス検出状況 (2022年度)

鳶田 嵩久¹ 稲崎 倫子¹ 村上美也子¹ 新谷 尚久²
島田 智恵³ 板持 雅恵 佐賀由美子 矢澤 俊輔
大石 和徳 谷 英樹

Infectious Gastroenteritis Viruses Detected in Paediatric Institutions in Toyama Prefecture in the Fiscal Year 2022

Takahisa SHIMADA, Noriko INASAKI, Miyako MURAKAMI, Naohisa SHINTANI,
Tomoe SHIMADA, Masae ITAMOECHI, Yumiko SAGA, Shunsuke YAZAWA,
Kazunori OISHI, and Hideki TANI

目的：感染性胃腸炎は、細菌またはウイルスなどの多様な病原体による嘔吐、下痢を主症状とする感染症である。感染性胃腸炎を引き起こすウイルスとしてはロタウイルスA・C群 (RVAs・RVCs)、ノロウイルスGI・GII (NoV GI・GII)、サポウイルス (SaV)、アデノウイルス (ADV)、アストロウイルス (AstV)、アイチウイルス (AiV)、エンテロウイルス (EV)、パレコウイルス (PeV) などのウイルスが知られている[1, 2, 3]。ここでは、富山県内の小児科定点医療機関（むらかみ小児科アレルギークリニックおよびしんたにこどもクリニック）で感染性胃腸炎と診断された症例の疫学情報や重症度、症例から検出されたウイルスの概要について報告する。

材料と方法：富山県内小児科定点2医療機関に依頼し、2022年8月から2023年3月までの期間に、医師が感染性胃腸炎と診断した一部の患者（2週間に2～3名ほど）を対象に便検体を採取した。また、その際、調査票により患者情報（年齢、性別、検体採取日、臨床症状、発生状況等）についても入手した。その後、富山県衛生研究所にて調査対象となった70症例の便検体についてリアルタイムPCRを行い、RVAs・RVCs、NoV GI・GII、SaV、ADV、AstV、AiV、EV、PeVの検出を試みた[4]。患者情報とウイルスの検出状況を紐づけ、疫学情報および重症度の評価を解析した。重症度については、2010年にFreedmanらに提唱さ

れ、国内でも用いられ始めた重症度評価ツールであるMVS (modified Vesikari score) を用いた[5]。

結果および考察：感染性胃腸炎患者70症例の年齢中央値は2歳（範囲：0歳－11歳）であり、女児が49%であった。ウイルスは41症例（59%）から検出され、検出されたウイルスの内訳はRVAs (n=2)、NoV GII (n=8)、SaV (n=2)、ADV (n=13)、AstV (n=1)、EV (n=2)、PeV (n=8)、EVとPeVの同時検出 (n=2)、NoV GIIとAdVの同時検出 (n=3) であった（表1）。2009年から2013年に国内の医療機関にて行われた2381例の下痢症患者の便検体を対象とした調査ではRVAが検出された割合が20%であったが[6]、今回の70症例の感染性胃腸炎患者を対象とした調査ではRVAが検出された割合は2.9%と低かった。RVAsが検出された2症例の年齢はそれぞれ7歳および8歳であり、両症例ともRVワクチン（ロタリックス）接種済みであった。2症例から検出されたRVAsの遺伝子型はそれぞれG8であり、ワクチン株 (G1P[8]) とは異なっていた。ノロウイルスについては冬季の感染性胃腸炎症例でよく見られた。ウイルスが検出された41症例のうち、発熱を生じない症例（ $\leq 37.5^{\circ}\text{C}$ ）は29症例（71%）であった。症例を発生状況別にみると、散発症例が42例（60%）、家族内発生ありの症例が12例（17%）、集団発生ありの症例が16例（23%）であった。集

1. むらかみ小児科アレルギークリニック、2. しんたにこどもクリニック
3. 国立感染症研究所実地疫学研究センター

団発生ありの16症例のうちウイルスが検出された症例は11例であり、ウイルスの内訳はNoV GII (n=2), ADV (n=5), AstV (n=1), EV (n=1), PeV (n=1), EVおよびPeV (n=1) であった。中等症以上の17症例 (24%) のうちウイルスが検出された症例は14例であり、検出されたウイルスの内訳はRVAs (n=2), NoV GII (n=4), ADV (n=4), AstV (n=1), EV (n=1), PeV (n=2) であった。

国内においてはRV ワクチンが、2011 年からは任意接種として2020 年からは定期接種として導入されている。本研究における対象症例数は70 例と少ないものの、この対象症例中のRVA の検出割合が、RV ワクチンの任意接種導入前から定期接種導入前の間に行われた前述の研究に比べて大きく減少した所見は、RV ワクチンの定期接種導入の効果と考えられる。また、RVA が検出された年長児2 例はワクチン接種後7 年以上が経過しており、ワクチン効果の減弱に伴うブレイクスルー感染と考えられた。本研究において感染性胃腸炎

と診断された中等症以上の患者は24%であり、様々なウイルス種に感染した症例で中等症以上の症例が一定数見られることが明らかとなった。

文 献

1. Krisztián B, Mary KE, Vito M, et al. (2018). Lancet., 392(10142), 175-186
2. Enrique R, Jesu's LR, (2020). Virol Sin., 35(5), 501-516
3. S C M de Crom, J W A Rossen, A M van Furth, et al. (2016). Eur J Pediatr., 175(8), 1023-1029
4. 稲崎倫子, 寫田嵩久, 山崎笑子, 他. (2023). 富山衛研年報, 46, 70-73
5. Stephen BF, Mohamed E, Marc G, (2010). Pediatrics., 125(6), e1278-1285
6. Thongprachum A, Takanashi S, Kalesaran AFC, et al. (2015). J Med Virol., 87(7), 1141-1148

表 1. 2022 年度 感染性胃腸炎症例からの検体採取月別ウイルス検出状況

ウイルス	2022年					2023年			合計
	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月	
ロタウイルスA群	0	0	0	1	1	0	0	0	2
ノロウイルスGⅡ	0	0	0	0	0	2	5	1	8
サポウイルス	1	1	0	0	0	0	0	0	2
アデノウイルス	2	1	1	6	2	0	0	1	13
アストロウイルス	0	0	0	0	1	0	0	0	1
エンテロウイルス	1	1	0	0	0	0	0	0	2
パレコウイルス	0	3	3	0	1	1	0	0	8
パレコウイルス、エンテロウイルス	0	0	2	0	0	0	0	0	2
ノロウイルスGⅡ、アデノウイルス	0	0	0	0	0	1	2	0	3
ウイルス不検出	7	5	2	4	3	4	3	1	29
合計	11	11	8	11	8	8	10	3	70

ウイルス性胃腸炎の集団発生事例及び散発例から検出された ノロウイルスの遺伝子型について(2022年度)

稲崎 倫子 嶋田 嵩久 頼成 明奈¹ 山崎 笑子
矢澤 俊輔 佐賀由美子 板持 雅恵 谷 英樹

Genotypes of Noroviruses Detected in Outbreaks and Sporadic Cases of Viral Gastroenteritis in Toyama Prefecture in the Fiscal Year 2022

Noriko INASAKI, Takahisa SHIMADA, Akina RAIJOU, Emiko YAMAZAKI,
Shunsuke YAZAWA, Yumiko SAGA, Masae ITAMOCHI, and Hideki TANI

目的：ウイルス性の感染性胃腸炎や食中毒の集団発生は、冬季を中心に多発し、ノロウイルス(NoV)、ロタウイルス、サポウイルス、アデノウイルスなどが原因ウイルスとなる。この中でも発生が多いのはNoVで、厚生労働省の食中毒統計[1]では、患者数が最も多い。

NoVは、冬季に散発および集団発生する感染性胃腸炎の主たる原因ウイルスであり、乳幼児から高齢者までの全年齢層に経口感染する[2]。ヒトに感染するNoVは主にGenogroup I (GI) と Genogroup II (GII) に分けられる。さらに、それぞれが複数の遺伝子型に分類される[3-6]。

NoVのゲノムには3つの蛋白質コード領域(open reading frame; ORF)が存在しており、ORF1は非構造蛋白質、ORF2は構造蛋白質(VP1, カプシド)、ORF3は構造蛋白質(VP2)をコードしている。従来の遺伝子型判別は、主にVP1のカプシドN/S領域における塩基配列をもとに行われてきた。しかし、NoVはORF1の最下流に存在するRNA依存性RNAポリメラーゼ(RdRp)をコードする領域とVP1領域の境界(ORF1-2ジャンクション領域)を起点とするゲノムの組み換えが多発することから、RdRp領域およびVP1領域のそれぞれの遺伝子型を決定するdual typing法による遺伝子型分類法が提唱されている[7]。

NoVはヒトの小腸で増殖し、吐物や糞便中に排泄される。吐物には1 gあたり103～106個、糞便には109個ものNoVが含まれている[8]。NoVは、感染者から2週間以上にわたり排泄され[9,10]、環境中でも長期間感染性を維持するとされ

る。100個以下で感染・発病させるといわれている[11]ため、調理従事者が感染すると、その手指を介して食品がNoVで汚染され、集団食中毒を引き起こすことがある。また、ヒトから排泄されたNoVは、海に入り、カキなどの二枚貝の中腸腺に蓄積されるため[12]、二枚貝を生あるいは不十分な加熱で喫食することによって食中毒を起こすことがある。一方、NoVは食中毒のみならず、ヒトからヒトへ手指等を介して感染し、散発例、集団発生なども引き起こしている。

近年、本県ではウイルス性胃腸炎の集団発生のほとんどがNoVによるものであるため[13-27]、主にNoVを対象としたウイルス性胃腸炎の集団発生事例および散発例の調査を実施した。

材料と方法：

1. 集団発生事例

2022年4月～2023年3月までに当所および富山市保健所で受け付けた集団発生事例の検体を対象とした。検体採取と疫学調査は各事例の管轄厚生センター、富山市保健所で実施した。

2. 散発例

2022年4月～2023年3月までに当所で受け付けた小児散発例の検体を対象とした。検体採取は感染症発生動向調査病原体定点医療機関、管轄厚生センターおよび調査に協力の得られたしんたにこどもクリニック(富山市)およびむらかみ小児科アレルギークリニック(富山市)が実施した。

3. ウイルスの検出

病原体検出マニュアル[28]に準じ、糞便からのRNA抽出、逆転写反応を行い、リアルタイム

1. 富山市保健所

PCR 法によるNoV GIおよびGIIの検出を行った。陽性検体のcDNAについては、Nakamuraら[29]のnested PCR法によりRdRp領域の一部からVP1領域の一部(カプシドN/S領域)にまたがる領域の遺伝子を増幅した。シーケンス用プライマーには、PCRに用いたプライマーに加えて、GI:COG1F, COG1R, GII:G2-SKF, RIGHT184 [26]を用いて、ダイレクトシーケンスにより塩基配列(GI:774bp, GII:761bp)を決定した。このnested PCR法において陰性であった検体については、厚生労働省通知[30]に準じたnested PCR法によりGI:G1-SKF/G1-SKR, GII:G2-SKF/G2-SKR領域の遺伝子を増幅し、ダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定した。

遺伝子型および亜型の判定は、Norovirus Genotyping Tool Version 2.0 (<https://www.rivm.nl/mpf/typingtool/norovirus/>)を用いて行った。遺伝子型番号は、Norovirus Genotyping Toolの分類[31]に従い、VP1領域タイプ[RdRp領域タイプ]の形式で表記した。

結果および考察:

1. 集団発生事例の概要

2022年度に当所で受け付けた感染性胃腸炎の集団発生14事例のうち、5事例からノロウイルスが検出された。これに富山市保健所で検査した事例を加えた計6事例の概要を表1に示す。原因ウイルスの内訳はいずれもNoV GIIであった。NoVの遺伝子型は、GII.4[P16]が3事例、GII.2[P16]が1事例、GII.4[P31]が1事例、GII.3[P12]が1事例であり、県内ではこれまで散发事例から1例のみ確認されていたGII.4[P16]が2023年1月に初めて集団事例から確認された[27]。カキの喫食に関連した事例は確認されなかった。その他の食品が原因と疑われた食中毒事例は3件(No.3, 4, 6)あり、感染者により食品が汚染されることによって発生したと考えられた。

2. 月別ウイルス性胃腸炎集団発生事例数(図1)

NoV陽性事例の発生時期は5月および1~2月であり、例年と同様に冬季に流行があったと考えられた。1年間の発生数は、過去5年間の発生数と比較すると、2017~2019年度(年9~16件)と比べて少なく、2020~2021年度(1~2件)より多かった。このことから、2020年3月以降の新型コロナウイルス感染症(COVID-19)の流行に伴う行動制限の緩和により、集団胃腸炎事例の主な発生施設の1つである飲食店等の利用機会が

増加したことなどにより、NoVの流行がCOVID-19流行以前の水準に戻りつつあると推測された。

3. 散发例における遺伝子型別(表2)

2022年度に受け付けた感染性胃腸炎の小児散发例104例のうち、13例からNoVが検出された。検出されたNoVの遺伝子型は、6例がGII.4[P31]、5例がGII.4[P16]、1例がGII.2[P16]、1例がGII.4(RdRp未解析)であり、GII.4[P16]は集団事例と同様に2023年1月以降に確認された。

4. NoVの遺伝子解析

単一の遺伝子型が原因と考えられた集団発生事例のうち、複数の検体からNoVが得られた事例は5件あり、そのうちNoVの塩基配列が100%一致していた事例は4件(事例No.2, 3, 4, 6)であった。これらは同じ感染源から感染したと考えられた。事例No.1では患者のうち1名の検出株が他の患者株とカプシドN/S領域(282bp)において1塩基異なっていた。この患者が他の患者と異なる感染源から感染した可能性も否定できないが、患者の腸内でNoVがわずかに変異した可能性も考えられた。事例No.4, 6においては発生施設の従業員(順に1名, 2名)からNoVが検出されており、検出株の塩基配列はいずれも患者株と一致した。このことから、これらの従業員から食品が汚染されたか、従業員が患者と同一の感染源から感染したと考えられた。事例No.1においては、従業員1名からNoVが検出されたものの、遺伝子型は患者と異なりGII.4であったことから、この従業員は集団発生には関与していないと考えられた。

NoV GII.4株のカプシドN/S領域は、GII.4[P16]、GII.4[P31]株ともにSydney 2012亜型(標準株:Sydney/NSW0514/2012/AU, accession no. JX459908に近縁の株)[32]に分類されたことから、2022年度は2013~2021年度[18-27]に引き続きこの亜型がGII.4の流行の中心であったと推測された。

NoV GII.4[P16]は2016年に大阪市で初めて確認されたGII.4の遺伝子組み換え株であり[33]、富山県内ではこれまで大きな流行は確認されていなかった。今回の調査において2023年1月以降に集団事例、散发例ともに検出数が増加したことから、この組み換え株が新たな主流株となり、大きな流行を引き起こす可能性があるため、今後の検出状況を注視していく必要があると考えられた。

遺伝子解析により、各遺伝子型や亜型の流行状況が明らかとなった。集団発生事例では、複数の

検体で遺伝子配列が一致すれば、単一暴露と推測できると考えられる。このように、遺伝子解析は、流行状況の把握、集団発生事例の原因究明などに有効であると考えられた。

謝 辞

本調査の実施にあたり、検体採取等にご協力いただきました厚生センター、富山市保健所、感染症対策課、生活衛生課、感染症発生動向調査定点医療機関の関係各位ならびにしんたにこどもクリニックの新谷尚久先生、むらかみ小児科アレクシークリニックの村上美也子先生に深謝いたします。

文 献

1. 厚生労働省：食中毒統計資料. https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/shokuhin/syokuchu/04.html (2022年6月28日アクセス可能)
2. 食品媒介ウイルス性胃腸炎集団発生実態調査研究班：国立予防衛生研究所 (1995).
3. Ando T, Noel JS, Fankhauser RL. (2000). *J. Infect. Dis.*, 181, S336-348
4. Vinjé J, Green J, Lewis DC, et al. (2000). *Arch. Virol.*, 145, 223-241
5. Kawamoto H, Yamazaki K, Utagawa E, et al. (2001). *J. Med. Virol.*, 64, 569-576
6. Katayama K, Sirato-Horikoshi H, Kojima S, et al. (2002). *Virology*, 299, 225-223
7. 片山和彦, 木村博一. ノーウォークウイルス (ノロウイルス) の遺伝子型 (2015年改訂版). 2015. <https://www.niid.go.jp/niid/ja/id/778-disease-based/na/norovirus/idsc/iasr-news/5913-pr4274.html> (2022年5月18日アクセス可能)
8. 西尾 治, 新川奈緒美 (2002). *日本医事新報*, 4105, 6-9
9. 杉枝正明, 新川奈緒美, 大瀬戸光明, 他. (2004). *臨床とウイルス*, 32, 189-194
10. Obara M, Hasegawa, S, Iwai M, et al. (2008). *J. Clin. Microbiol.*, 46, 3397-3403
11. Glass RI, Noel J, Ando T, et al. (2000). *J. Infect. Dis.*, 181, S254-261
12. 染谷雄一 (2000). *ウイルス*, 50, 173-184
13. 長谷川澄代, 小原真弓, 中村一哉, 他. (2008). *富山衛研年報*, 31, 104-110
14. 長谷川澄代, 小原真弓, 中村一哉, 他. (2009). *富山衛研年報*, 32, 90-96
15. 小原真弓, 長谷川澄代, 森岡誠二, 他. (2010). *富山衛研年報*, 33, 97-102
16. 小原真弓, 森岡誠二, 小渕正次, 他. (2011). *富山衛研年報*, 34, 74-79
17. 名古屋 (小原) 真弓, 森岡誠二, 堀元栄詞, 他. (2012). *富山衛研年報*, 35, 74-79
18. 名古屋真弓, 稲崎倫子, 石田 徹, 他. (2013). *富山衛研年報*, 36, 51-57
19. 稲崎倫子, 名古屋真弓, 石田 徹, 他. (2014). *富山衛研年報*, 37, 53-59
20. 稲崎倫子, 森岡誠二, 稲畑 良, 他. (2015). *富山衛研年報*, 38, 49-54
21. 稲崎倫子, 名古屋真弓, 森岡誠二, 他. (2016). *富山衛研年報*, 39, 47-52
22. 稲崎倫子, 名古屋真弓, 森岡誠二, 他. (2017). *富山衛研年報*, 40, 49-54
23. 稲崎倫子, 名古屋真弓, 森岡誠二, 他. (2018). *富山衛研年報*, 41, 27-31
24. 稲崎倫子, 森岡誠二, 嵩田嵩久, 他. (2019). *富山衛研年報*, 42, 33-38
25. 稲崎倫子, 頼成明奈, 嵩田嵩久, 他. (2020). *富山衛研年報*, 43, 37-42
26. 稲崎倫子, 頼成明奈, 五十嵐笑子, 他. (2021). *富山衛研年報*, 44, 83-86
27. 稲崎倫子, 頼成明奈, 五十嵐笑子, 他. (2022). *富山衛研年報*, 45, 49-55
28. 木村博一, 片山和彦, 大森亮介, 他. 病原体検出マニュアル ノロウイルス (第1版). <https://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/Norovirus20190611.pdf> (2022年5月18日アクセス可能)
29. Nakamura K, Iwai M, Jie Zhang, et al. (2009). *Jpn J Infect Dis* 62(5): 394-398
30. 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長 (2003) 食安監初 115001 号.
31. Chhabra P, de Graaf M, Parra GI, et al. (2019). *J Gen Virol.*, 100, 1393-1406
32. van Beek J, Ambert-Balay K, Botteldoorn N, et al. (2013). *Euro Surveill.*, 18(1), 8-9
33. 入谷展弘, 上林大起, 改田 厚, 他. (2016). *IASR*, 37, 136-138

表 1. 2022 年度に受け付けたウイルス性胃腸炎集団発生事例

事例No.	発生月	発生／原因施設	患者数	推定原因ウイルス	推定感染源	
1	2022年 5月	ホテル宴会場	27	NoV GII.2[P16]	不明	**
2	2022年 5月	飲食店	県外 不明	NoV GII.4[P31]	不明	
3	2023年 1月	ホテル	県外 15	NoV GII.4[P16]	食品	
4	2023年 1月	飲食店	11	NoV GII.4[P16]	食品	
5	2023年 1月	ケアハウス	13	NoV GII.4[P16]	不明	*
6	2023年 2月	飲食店(仕出し弁当)	13	NoV GII.3[P12]	食品	**

* 富山市保健所にて検査

** 当所及び富山市保健所にて検査

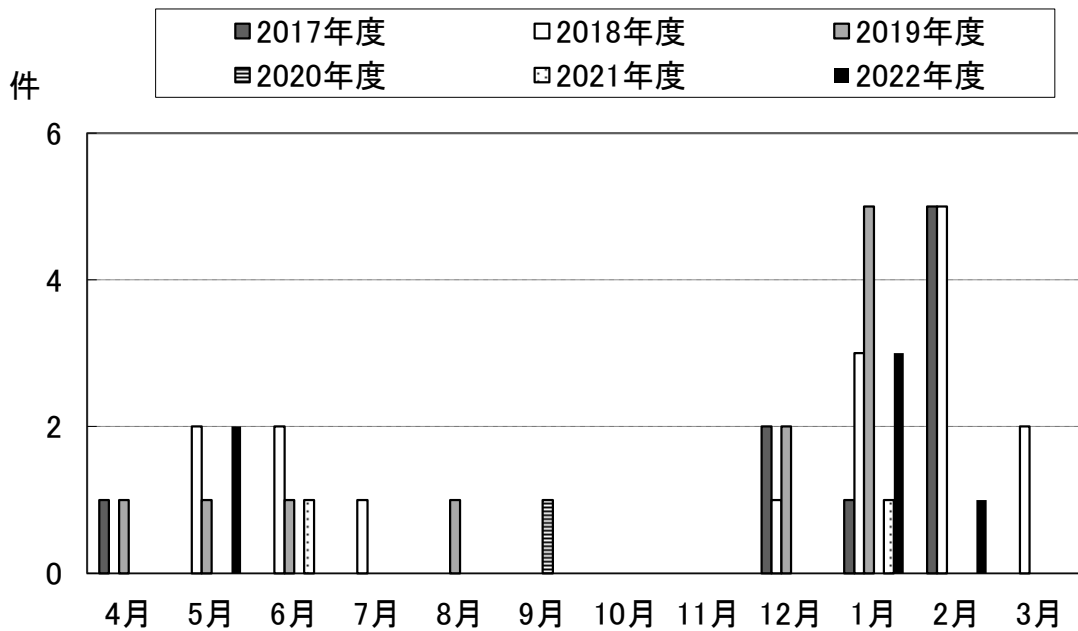


図 1. 年度ごとの月別ウイルス性胃腸炎集団発生事例数

表 2. 2015-2022 年度に県内で採取された NoV の dual typing 法による遺伝子型別検出状況

遺伝子群		Genogroup I						Genogroup II							
遺伝子型	カプシドN/S領域	GI.2	GI.3		GI.4	GI.6	GI.7	GII.2	GII.3	GII.4 Sydney 2012			GII.6	GII.9	GII.17
	RdRp領域	GI.P2	GI.P3	GI.P13	GI.P4	GI.P11	GI.P7	GII.P16	GII.P12	GII.P12	GII.P16	GII.P31	GII.P7	GII.P7	GII.P17
発生 年度	2015年度	1							1			14			8
	2016年度		1		1	1		8	3			3	2		2
	2017年度	1								1		13			4
	2018年度	1	1	1			2	8			1	14	2	1	1
	2019年度							12	4			2	1		
	2020年度											1			
	2021年度							3				3			
	2022年度							2	1		8	7			
計		3	2	1	1	1	2	33	9	1	9	57	5	1	15

(数値：集団発生事例数と小児散発例症例数の合計)

感染性胃腸炎ウイルスの同時複数検出系について

稲崎 倫子 畠田 嵩久 山崎 笑子 矢澤 俊輔
佐賀由美子 板持 雅恵 谷 英樹

Simultaneous Multiple Detection Systems for Infectious Gastroenteritis Viruses.

Noriko INASAKI, Takahisa SHIMADA, Emiko YAMAZAKI, Shunsuke YAZAWA,
Yumiko SAGA, Masae ITAMOCHI, and Hideki TANI

感染性胃腸炎は細菌やウイルスなどの感染性病原体による嘔吐、下痢を主症状とする感染症であり、中でもウイルスが主な病原体である。主な原因ウイルスとしては、ノロウイルス、ロタウイルス、サポウイルス、アデノウイルス、アストロウイルス、エンテロウイルス、パレコウイルス、アイチウイルス等が知られている。これまで当衛生研究所では感染症発生动向調査、集団事例の行政検査および調査研究において、感染性胃腸炎の患者検体からの原因ウイルスの検査を行ってきた。しかし、従来のPCR法またはリアルタイムPCR法では、ウイルス種ごとに試薬および反応条件が異なるため、手技が煩雑で時間を要していた。食中毒の原因究明のための検査など、迅速に結果を出すことが求められることがあるため、複数のウイルスを同時検出する検査手法が必要であると考えられる。

先行研究において、サポウイルス、アストロウイルス、A群ロタウイルス、C群ロタウイルス、アデノウイルス、エンテロウイルスを同時に検出可能なマルチプレックスリアルタイムPCR法が報告されている[1]。しかし、この検査法で使用しているサポウイルスおよびA群ロタウイルスのプライマー・プローブでは、一部の型のウイルスが検出不可能であることが報告されている[2, 3]。また、ノロウイルスについては別に検査を行う必要があり、小児感染性胃腸炎患者からしばしば検出されるパレコウイルスや、集団胃腸炎事例から検出報告のあるアイチウイルスについては検出対象外となっている。そこで本研究では、先行研究における検査法を改良し、より多くの種類のウイルスを同時に検出可能なマルチプレックスリアルタイムPCR法の反応条件を検討した。また、設計した検査法を用いて小児胃腸炎患者検体から感染性胃腸炎ウイルスの検出を試みたので、その概要

を報告する。

材料と方法：

1. 材料

サポウイルス、A群ロタウイルス及びノロウイルスの陽性対照検体は、国立感染症研究所から分与された既知の濃度のプラスミドを用いた。C群ロタウイルス、アデノウイルス、アストロウイルス、エンテロウイルス、パレコウイルス、アイチウイルスについては、過去に当所で陽性と判定された臨床検体を用いた。

ウイルス検出用胃腸炎検体として、2016年8月から2022年8月までに当所で受け付けた集団胃腸炎事例検体のうち、行政検査でノロウイルス陰性であった17事例27名の便検体より合成したcDNAを用いた。

2. 方法

臨床検体は滅菌PBS(-)にて乳剤を作成し、14,000 rpmで10分間冷却遠心後に上清を回収し、うち140 µLからQIAamp Viral RNA mini kit(QIAGEN)を用いて核酸60 µLを抽出した。抽出した核酸はノロウイルスの病原体検出マニュアル[4]に基づき逆転写反応を行い、RNAからcDNAを合成した。

リアルタイムPCRのプライマー及びプローブは、サポウイルスとA群ロタウイルスはそれぞれの病原体検出マニュアルのもの[5, 6]を、C群ロタウイルス、エンテロウイルス、アデノウイルスは先行研究のもの[1]を、アストロウイルスはMoriら[7]の、パレコウイルスはNixら[8]の、アイチウイルスはKitajimaら[9]の報告によるものを使用した(表1)。これらのプライマー・プローブを、Aセット(サポウイルス、C群ロタウイルス、アストロウイルス、パレコウイルス)、Bセット(A群ロタウイルス、エンテロウイルス、

アイチウイルス、アデノウイルス)の組み合わせで使用した。プライマー・プローブの濃度は、HuSaV-F1, HuSaV-F2, HuSaV-F3は1.2 μ M, NSP3-FDegは0.4 μ M, その他のプライマー・プローブは0.2 μ Mとなるよう調製した。試薬はQuantiTect ProbePCR Kit (QIAGEN)を使用し、cDNAのテンプレートは1反応当たり2 μ Lとして、合計20 μ Lとなるよう反応液を調製した。

リアルタイムPCRの測定機器はQuantStudio5 (ThermoFisher)を用いた。反応時間は、95℃15分で処理後、熱変性95℃15秒、アニーリングと伸長反応1分を45サイクル行った。アニーリング温度は56℃と60℃の2種類の条件でリアルタイムPCRを実施した。反応終了後、Threshold lineをマニュアルで0.01に設定し、各温度条件におけるCt値を比較した。

ノロウイルスについては、病原体検査マニュアルに記載されたプライマー・プローブ[4]を用いて、試薬をQuantiTect ProbePCR Kitに変更し、設計したマルチプレックスリアルタイムPCR法の反応条件でリアルタイムPCRを行った。

結果および考察：

1. リアルタイムPCR条件の検討

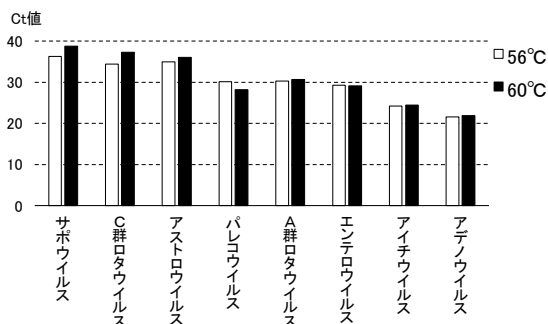


図1. アニーリング温度ごとのCt値比較サポウイルス、A群ロタウイルスはプラスミド103コピー/ウェル、その他のウイルスは陽性検体を使用した。

アニーリング温度を56℃と60℃の2種類の条件においてマルチプレックスリアルタイムPCRを行ったところ、いずれの条件においても標的ウイルスを対象とした蛍光色素において増殖曲線が確認された(図1)。同一セット内で標的とするウイルス種以外を対象とする増殖曲線がみられた検体は確認されなかった。

サポウイルスにおいては25、102～104コピー/ウェルまで、A群ロタウイルスは102～105コ

ピー/ウェルまでの希釈系列を作製してCt値を比較した(図2)。その結果、A群ロタウイルスではアニーリング温度の違いによるCt値の差は小さく、いずれの温度でもマニュアルに記載された100コピーまで検出された。これに対してサポウイルスでは、56℃では単独検出法の検出限界[2]である25コピー/ウェルまで検出されたものの、60℃では検出されなかった。また、102～104コピー/ウェルにおいては、いずれも56℃より60℃の方がCt値が高かった。このことから、アニーリング温度条件を56℃に設定して以降の実験を行った。

マルチプレックスリアルタイムPCR法とノロウイルスリアルタイムPCR法の同時検出について検討するため、ノロウイルス検出マニュアルに記載のリアルタイムPCR法の温度条件と試薬の種類をマルチプレックスリアルタイムPCR法のものに変更し、ノロウイルスGI, GIIの陽性コントロールプラスミドを対象としたリアルタイムPCRを行った。その結果、GI, GIIともに10コピー/ウェルまで検出が確認された。これより、マルチプレックスリアルタイムPCRと同時にノロウイルスGI, GIIの検出が可能であることが確認された。

陽性検体のリアルタイムPCR結果をもとに、マルチプレックスリアルタイムPCR法の判定方法を以下の通り設定した。

パレコウイルス、エンテロウイルス、アデノウイルスにおいては陽性コントロールにおける蛍光強度が低いためThreshold lineを0.005に、その他の検査項目においては0.01に設定する。また、baselineが正しく設定されないことがあるため、その場合は手動でbaselineを設定する。

ノロウイルスは10コピー/ウェル、サポウイルスとA群ロタウイルスは病原体検出マニュアル[5, 6]の記述に準じて100コピー/ウェル以上の検体を陽性と判定した。その他のウイルスについては、増殖曲線の立ち上がりが見られた検体を陽性と判定した。

2. 集団事例からのウイルス検出

2016年8月から2022年8月までに当所で受け付け、行政検査でノロウイルス陰性であった17事例27名の検体について、ノロウイルス以外の胃腸炎ウイルスのマルチプレックスリアルタイムPCRを行った。その結果、2事例4検体においてサポウイルスが陽性となった。この2事例の検体

についてPCR法[5]によるサポウイルスの検出を行ったところ、患者全員からサポウイルスの遺伝子が検出され、同一事例内の患者で遺伝子配列が一致していたことから、この2事例はサポウイルスが原因の集団胃腸炎であったと考えられた。

本研究では、多様なウイルスが原因となる感染性胃腸炎の原因ウイルス検出を迅速に行うため、マルチプレックスリアルタイムPCR法による胃腸炎ウイルスの同時検出法を検討した。その結果、10種類のウイルスを同時に検出することが可能な検出系を設計した。ただし、今回の検討では一部のウイルスについて既知の濃度のプラスミドを用いた検出下限値の確認を行えておらず、既存の検出法との検出感度の比較を行えていない。また、近年胃腸炎患者から確認され、胃腸炎を引き起こすとされるアストロウイルスMLB株やVA株については検出不可能である。そのため、従来の検出法との比較検討や、新たな胃腸炎ウイルスへの対応を行う必要があると考えられた。

謝 辞

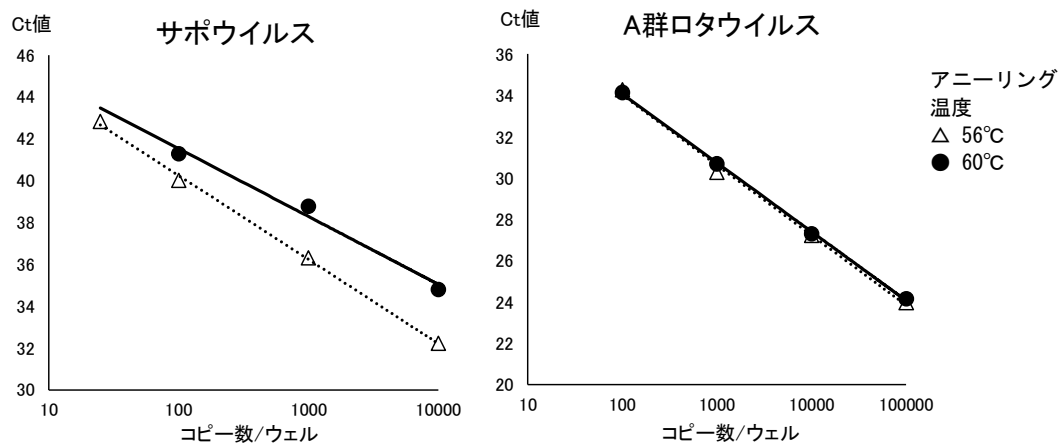
本調査の実施にあたり、検体採取等にご協力いただきました厚生センター、富山市保健所、感染症対策課、生活衛生課、感染症発生動向調査定点医療機関の関係各位に深謝いたします。

文 献

1. 小和田和誠, 東方美保, 平野映子, 他. (2011). 福井県衛生環境研究センター年報, 10, 40-44
2. Oka T, Iritani N, Yamamoto S, et al. (2019). J Med Virol., 91, 370-377
3. ノロウイルス（下痢症ウイルス）レファレンスセンター会議報告. 2022. https://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/reference/R4_Norovirus.pdf (2023年3月26日アクセス可能)
4. 木村博一, 片山和彦, 大森亮介, 他. 病原体検出マニュアル ノロウイルス（第1版）. <https://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/Norovirus20190611.pdf> (2022年5月18日アクセス可能)
5. 斎藤 博之, 高橋 知子, 坂上 亜希恵, 他. 病原体検出マニュアル サポウイルス（第1版）. <https://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/Sapovirus20210716.pdf> (2023年3月26日アクセス可能)
6. 藤井克樹, 染谷雄一. 病原体検出マニュアル ロタウイルス（第2版）. <https://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/Rotavirus20190619.pdf> (2023年3月26日アクセス可能)
7. Mori K, Hayashi Y, Akiba T, et al. (2013). J. Virol. Methods., 191, 141-147
8. Nix WA, Maher K, Johansson ES, et al. (2008). J. Clin. Microbiol., 46(8), 2519-2524
9. Kitajima M, Hata A, Yamashita T, et al. (2013). Appl Environ Microbiol., 79(13), 3952-3958

表 1. マルチプレックスリアルタイム PCR 法に用いたプライマー・プローブ

セット	検索ウイルス	名称	Sequencea (5'-3')	Reporter - Quencher	終濃度 (μM)	出典
A	サポウイルス	HuSaV-F1	GGCHCTYGCCACCTAYAAYG		1.2	[5]
		HuSaV-F2	GACCARGCHCTCGCYACCTAYGA		1.2	
		HuSaV-F3	GCWRYKGCWTGYTAYAACAGC		1.2	
		HuSaV-R	CCYTCCATYTCAAACACTA		1.2	
		HuSaV-TP-a	CCNCCWATRWACCA	FAM-MGB	0.2	
		HuSaV-TP-b	CCNCCWACRWACCA	FAM-MGB	0.2	
	C 群ロタウイルス	CRV7F	GCTGCATTTGGTAGTGACTGYGA		0.2	[1]
		CRV7R	AGTTTCTGTACTAGCCGGTGAACA		0.2	
		CRV7	TCTGTCTGTCCATTAGATACTACAAGTAATGGAATYGG	Cy5-TAO-IBFQ	0.2	
	アストロウイルス	AstF	CATGGGAAGCTCCTRTGCTAYCA		0.2	[7]
		AstR	GABAGGCAGTGYTCYACA		0.2	
		Ast	TGCTYGCTGCRTTYATGGCAGARG	SUN-ZEN-IBFQ	0.2	
	パレコウイルス	AN345	GTAACASWWGCCTCTGGGSCCAAAAG		0.2	[8]
		AN344	GGCCCCWGRTCAGATCCAYAGT		0.2	
		AN257	CCTRYGGGTACCTYCWGGGCATCCTTC	TAMRA-BHQ2	0.2	
B	A 群ロタウイルス	NSP3-FDeg	ACCATCTWCACRTRACCCTC		0.4	[6]
		NSP3-R1	GGTCACATAACGCCCTATA		0.2	
		NSP3-Probe	ATGAGCACAATAGTTAAAAGCTAACACTGTCAA	FAM-ZEN-IBFQ	0.2	
	エンテロウイルス	EnteroPrimer1F	TCCTCCGGCCCCTGA		0.2	[1]
		EnteroPrimer1R	RATTGTACACATAAGCAGCCA		0.2	
		EnteroTaqman1	CGGAACCGACTACTTTGGGTGWCCGT	Cy5-TAO-IBFQ	0.2	
	アイチウイルス	AiV-AB-F	GTCTCCACHGACACYAAYTGGAC		0.2	[9]
		AiV-AB-R	GTTGTACATRGACGCCAGG		0.2	
		AiV-AB-TP	TTYTCCTTYGTGCGTGCG	VIC-MGB	0.2	
	アデノウイルス	JTVXF	GGACGCCTCGGAGTACCTGAG		0.2	[1]
		JTVXR	ACIGTGGGGTTTCTGAACCTGTT		0.2	
		JTVXP	CTGGTGCGAGTTCGCCCGTGCCA	TAMRA-BHQ2	0.2	



伴侶動物の重症熱性血小板減少症候群ウイルス感染状況調査(2022年度)

佐賀由美子 矢澤 俊輔 嵩田 嵩久 稲崎 倫子
板持 雅恵 山崎 笑子 長谷川澄代 谷 英樹

Survey of Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Virus Infection in Companion Animals in Toyama Prefecture, in the Fiscal Year 2022

Yumiko SAGA, Shunsuke YAZAWA, Takahisa SHIMADA, Noriko INASAKI,
Masae ITAMUCHI, Emiko YAMAZAKI, Sumiyo HASEGAWA, and Hideki TANI

重症熱性血小板減少症候群 (SFTS) は、2011 年に中国の研究者より報告されたフェニウウイルス科バンダウイルス属に属する SFTS ウイルス (SFTSV) によるマダニ媒介性感染症である [1]。国内では 2013 年に初めて発症者が確認 [2] されて以降、西日本を中心に年間 50 ～ 100 症例程度の患者が報告されている。北陸地域では、2015 年に石川県で、2017 年に福井県でヒトの SFTS 症例が報告されている [3]。SFTS の国内における致死率は 27% と高く [4]、流行地域において公衆衛生上重要な問題となっている。

近年、SFTSV に感染したネコやイヌ等の伴侶動物の咬傷や体液を介してヒトに感染したと推定される SFTS 症例が報告されている [4-8]。このため、ヒトにおける SFTSV 感染リスクを検討する際には、SFTS を発症した伴侶動物を介した感染も考慮する必要がある。

そこで、本県の伴侶動物の SFTSV 感染状況を把握することを目的として、県内動物病院を受診した伴侶動物の SFTSV 抗体保有状況および SFTS 発生状況について調査した。

材料と方法：

1. SFTSV 抗体保有状況調査

2022 年 2 月～2023 年 1 月に県内動物病院 2 施設を受診したイヌ 108 頭およびネコ 43 頭の血清を材料とした (表 1)。SFTSV に対する IgG 抗体検出スクリーニングとして、国立感染症研究所獣医科学部のプロトコルに準じた酵素免疫測定法 (ELISA) を実施した (図 1)。

2. SFTS 発生状況調査

2022 年 5 ～ 6 月に県内動物病院を受診し、SFTS を疑う症状を呈したイヌ 4 頭および SFTS

(1) 抗原のコーティング

SFTSV 抗原 (SFTSV 感染 Huh7 細胞溶解液) と Mock 抗原 (非感染 Huh7 細胞溶解液) をリン酸緩衝液 (PBS) を用いて 800 倍に希釈した後、ELISA プレートに 100 μ l/well ずつ分注し、4℃で 1 晩反応させる。

↓ 0.05% Tween20 in PBS (PBST) で 1 回洗浄

(2) ブロッキング

20% Blocking-One in DDW を 100 μ l/well ずつ分注し、室温で 1 時間反応させる。

↓ PBST で 1 回洗浄

(3) 1 次抗体 (血清) の反応

20% Blocking-One in PBST (diluent) を用いて 100 倍希釈した血清を 100 μ l/well ずつ分注し、37℃で 1 時間反応させる。

↓ PBST で 3 回洗浄

(4) 標識 2 次抗体の反応

diluent を用いて 20,000 倍希釈した Protin A/G を 100 μ l/well ずつ分注し、37℃で 1 時間反応させる。

↓ PBST で 3 回洗浄

(5) 基質の反応

ABTS 基質液を 100 μ l/well ずつ分注し、室温で 1 時間反応させる。

(6) OD 値の測定

405nm の OD 値を測定し、(SFTS 抗原の OD 値) - (Mock 抗原の OD 値) $\geq$ 0.3 を陽性と判定する。

図 1. SFTSV に対する IgG 抗体検出用 ELISA のプロトコル

と確定したイヌと同居していたイヌ2頭から採取した血清を材料とした(表2)。リアルタイム RT-PCR 法 [9] により遺伝子検出を行った。間接蛍光抗体法 (IFA) により SFTSV 特異的 IgG 抗体価および IgM 抗体価の判定を行った。IFA 抗原は、SFTSV YG-1 株感染 VeroE6 細胞を用い、抗体価 40 倍以上を陽性とした。

結果：

1. SFTSV 抗体保有状況調査

イヌ 108 検体およびネコ 43 検体について、SFTSV に対する IgG 抗体検出のスクリーニング検査として ELISA を実施したところ、全て陰性であった。

2. SFTS 発生状況調査

5 月に SFTS を疑う症状を呈したイヌ 1 頭の血清を検査したところ、SFTSV 遺伝子および SFTSV 特異的 IgM 抗体、IgG 抗体が検出された(表2 D-97)。そこで、このイヌの同居犬 3 頭の血清についても検査したところ、体調不良を呈していた 1 頭も SFTSV 陽性と判明した(表2 D-99)。体調に異常のなかった 2 頭については、遺伝子、抗体ともに陰性であった(表2 D-100, 101)。

他に、5 月と 6 月に SFTS を疑う症状を呈したイヌ各 1 頭の血清を検査したが、遺伝子、抗体ともに陰性であった(表2 D-105, 110)。

考察：今回の調査で、2022 年 5 月に県内で初めて SFTS のイヌ 2 症例が確認された[10]。さらに、2022 年 11 月には、ヒトの SFTS 症例も県内で初めて確認された[11]。抗体保有状況調査においては、前年度分と合わせるとイヌ 165 頭、ネコ 58 頭について検査したが、SFTSV 特異的 IgG 抗体を保有している動物はみつからなかった。しかしながら、今年度、県内でイヌおよびヒトの SFTS 症例が確

表 1. SFTSV 抗体保有状況調査において血清を採取した伴侶動物の概要

動物種	イヌ	ネコ	合計
検体数	108	43	151
動物病院 (所在地)	A(富山市)	6	32
	B(高岡市)	37	119
年齢	0	13	21
	1～5	16	35
	6～10	6	38
	11～	8	55
	不明	0	2
性別	♀	2	12
	♀(避妊)	18	60
	♂	2	26
	♂(去勢)	20	52
	不明	1	1
飼育地	氷見市	0	8
	高岡市	33	90
	小矢部市	0	1
	砺波市	0	2
	射水市	3	17
	富山市	6	31
	魚津市	1	1
	立山町	0	1
マダニ予防薬	有	7	54
	なし	36	96
	不明	0	1
屋外行動	有	20	121
	なし	23	30

認されたことから、県内にも SFTSV を保有するマダニが分布していることが明らかとなった。ヒトの生活と密接に関わる伴侶動物の SFTSV 感染状況を把握することは、ヒトへの SFTSV 感染防止対策を実施する上で重要である。したがって、今後も継続して調査を実施する必要がある。抗体調査のための検体を採取する定点動物病院の施設数を増やし、県内の広い地域から検体を集める予定にしている。

また、県内の SFTSV 浸淫状況を把握する上で、野生動物の SFTSV 保有状況を調査することは意義がある。当所の過去の調査では、2014～2018 年に採取したイノシシ 129 頭の血清から SFTSV 抗体や遺伝子は検出されなかった。しかしながら、

表 2. SFTS 発生状況調査において検体の提出された伴侶動物の概要と初回検査結果

検体No.	動物種	年齢	性別	屋外行動	マダニ予防薬	発症日	検体採取日	qPCR 結果	IF 抗体価	
									IgM	IgG
D-97	イヌ	8	♂(去勢)	有	なし	2022/5/1	2022/5/7	+	≥640	≥640
D-99	イヌ	14	♂(去勢)	有	なし	2022/4/30	2022/5/9	+	≥640	≥640
D-100	イヌ	10	♀(避妊)	有	なし		2022/5/9	-	<40	<40
D-101	イヌ	8	♀(避妊)	有	なし		2022/5/9	-	<40	<40
D-105	イヌ	2	♀	有	有	2022/5/16	2022/5/17	-	<40	<40
D-110	イヌ	11	♀(避妊)	有	不明	2022/6/6	2022/6/6	-	<40	<40

2019 年以降の状況は把握していない。今年度、イヌおよびヒトのSFTS 症例が確認されたことから、県家畜保健衛生所にイノシシの検体の分与を依頼し、抗体調査の実施が可能か否かを検討したい。

謝 辞

本調査の実施にあたり、検体採取等にご協力いただいた関係各位に深謝いたします。

文 献

1. Yu XJ, Liang MF, Zhang SY, et al. (2011). Fever with thrombocytopenia associated with a novel bunyavirus in China. *N Engl J Med*, 364, 1523-1532
2. Takahashi T, Maeda K, Suzuki T, et al. (2014). The first identification and retrospective study of Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome in Japan. *J Infect Dis*, 209(6), 816-827
3. 国立感染症研究所. 重症熱性血小板減少症候群 (SFTS) . <https://www.niid.go.jp/niid/ja/sfts/3143-sfts.html> (2023 年 5 月 23 日アクセス可能)
4. Kobayashi Y, Kato H, Yamagishi T, et al. (2020). *Emerg Infect Dis*, 26(4), 692-699
5. Yamanaka A, Kirino Y, Fujimoto S, et al. (2020). *Emerg Infect Dis*, 26(12), 2994-2998
6. Kida K, Matsuoka Y, Shimoda T, et al. (2019). *Jpn J Infect Dis*, 72, 356-358
7. Oshima H, Okumura H, Maeda K, et al. (2022). *Jpn J Infect Dis*, 75, 423-426
8. 石嶋慧多, 平良雅克, 松鶴 彩, 他. (2023). *IASR*, 44, 31-32
9. Yoshikawa T, Fukushi S, Tani H, et al. (2014). *J Clin Microbiol*, 52, 3325-3333
10. 佐賀由美子, 矢澤俊輔, 瀧田嵩久, 他. (2022). *IASR*, 43, 218-219
11. 坂東彬人, 村田久仁男, 村井祐至, 他. (2023). *IASR*, 44, 42-43

富山県で初めて確認された重症熱性血小板減少症候群の1症例

佐賀由美子	稲崎 倫子	矢澤 俊輔	嵩田 嵩久
板持 雅恵	坂東 彬人 ¹	村田久仁男 ²	村井 佑至 ³
狩野 恵彦 ³	垣内 孝子 ⁴	林 江美 ⁴	越坂 裕子 ⁴
三井千恵子 ⁵	宮島 重憲 ⁵	守田万寿夫 ⁵	大石 和徳
	谷 英樹		

The First Identification of Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome in Toyama Prefecture

Yumiko SAGA, Noriko INASAKI, Shunsuke YAZAWA, Takahisa SHIMADA, Masae ITAMOCHI, Akihito BANDO, Kunio MURATA, Yushi MURAI, Shigehiko KARINO, Takako KAKIUCHI, Emi HAYASHI, Yuko KOSHISAKA, Chieko MITSUI, Shigenori MIYAJIMA, Masuo MORITA, Kazunori OISHI, and Hideki TANI

目的：2012年に日本国内で重症熱性血小板減少症候群（Severe fever with thrombocytopenia syndrome: SFTS）が報告されてからちょうど10年となる。当初、西日本中心に発生していた本疾患の患者発生地域は、徐々に中日本、東日本地域へと拡大しており、北陸地域においては、福井県、石川県で患者発生が報告されている[1]。本疾患は、SFTSウイルス（SFTSV）を原因とする人獣共通感染症であり、本ウイルスを保有するマダニの刺咬により発症する。また最近では、SFTSを発症したイヌやネコなどの伴侶動物等からの接触感染も報告されている[2]。

富山県では、これまで狩猟犬での抗体陽性が確認されていたものの、SFTSの患獣および患者の発生やSFTSVの遺伝子検出などは報告されていなかった。しかしながら、2022年5月に県内で飼育されている同居イヌがSFTSを発症し、検体からSFTSV遺伝子が検出された[3]。今回、イヌに引き続きヒトにおいても富山県で初めてSFTSVの感染事例が確認されたので、報告する。

材料および方法：発症から6日目の患者から採取された全血および痂皮を検査材料とした。つつが虫病リケッチアおよび紅斑熱群リケッチアの遺伝子検出は、同時検出可能なリアルタイムPCR法[4]を用いて行った。SFTSVの遺伝子検出はリアルタ

イムRT-PCR法[5]で、抗体検出はSFTSV YG-1株感染VeroE6細胞を抗原とする間接蛍光抗体法で行った。ウイルス分離試験は、VeroE6細胞を用い、分離結果の確認は培養上清中のSFTSV遺伝子検出により行った。

結果および考察：患者は県内西部の山間部に居住する60歳代の女性で、潜伏期間には連日、自宅近くの果樹園で農作業をしていた。なお、体調不良の動物等との接触歴はなかった。2022年11月9日に発熱、倦怠感、食欲不振で発症し、同12日に近医を受診し、風邪と診断され解熱剤を処方された。3日経過しても症状が改善しないことから、11月14日に近医を再診し、11月15日に厚生連高岡病院を受診した。受診時に発熱（38.6℃）、関節痛に加え、下痢、肝機能検査値の異常も認められた。本人にダニ咬傷の自覚はなかったものの、右大腿屈側基部に虫刺様の皮疹（15 × 10 mmの楕円形紅斑の中心に径1mmの点状痂皮を伴う）を認めた。このため、当初、つつが虫病および日本紅斑熱が疑われ、発症から6日目の全血および痂皮検体が提出され、つつが虫病リケッチアおよび紅斑熱群リケッチアの遺伝子検出を行ったが、陰性であった。近医受診時の臨床症状に加え、同患者の末梢血検査において白血球数 2,600 /μL、血小板数 9.6 × 10⁴ /μLであったことから、SFTSVの遺伝子検出

1. 厚生連高岡病院呼吸器内科, 2. 厚生連高岡病院皮膚科, 3. 厚生連高岡病院総合診療科・感染症内科,
4. 高岡厚生センター, 5. 富山県厚生部健康対策室

を追加で実施した。その結果、患者の血漿および白血球成分、痂皮からSFTSVのNP遺伝子が検出された。次に、患者の血漿中のSFTSV特異IgMおよびIgG抗体価について判定した結果、IgMは320倍、IgGは160倍の陽性であった。また、ウイルス分離試験ではSFTSVは分離されなかった。

今回、本症例のウイルス診断が確定した後、本患者の居住地域管轄の厚生センターと連携して患者が野外活動をした地域の環境調査を行なった。患者は農業に従事しており、推定感染時期には連日山間部で野外活動をしていた。活動時には皮膚を露出しない服装であった。10月下旬から11月初旬の富山県山間部では、最低気温が10℃を下回ることもあり、マダニの活動もかなり低下していると推定されことから、本症例の原因となったマダニ刺咬の機会は稀と考えられた。実際に、環境調査を行なった11月下旬にマダニ採取を試みたものの採取することは出来なかった。

他県においては、これまでもリケッチア症疑似例からSFTS症例が見つかる例は数多く報告されている[6-10]。本症例では、リケッチア診断の検査陰性確定後にSFTSの検査診断を行なったために、SFTS陽性判定時には発症してから13日が経過していた。この時点で患者は既に軽快しており、軽症のSFTS症例であったと考えられた。しかし、SFTSの高い致死率（10～30%）を鑑みると、早期検査診断を可能にする診療・検査体制の必要性が示唆された。医療機関の医師、獣医師に対して、リケッチア症の鑑別疾患としてSFTSの存在を周知する一方、SFTSを疑ったものの日本紅斑熱やツツガムシ病である例も考えられるため、マダニ媒介感染症を疑う場合は、鑑別診断をし

かり行ってもらうことが重要であると考えられた。

謝 辞

本調査の実施にあたり、検体採取等にご協力いただいた関係各位に深謝いたします。

文 献

1. 国立感染症研究所. 重症熱性血小板減少症候群 (SFTS). <https://www.niid.go.jp/niid/ja/diseases/sa/sfts.html> (2023年5月29日アクセス可能)
2. Kobayashi Y, Kato H, Yamagishi T, et al. (2020). *Emerg Infect Dis*, 72, 356-358
3. 佐賀由美子, 矢澤俊輔, 瀧田嵩久, 他. (2022). *IASR*, 43, 218-219
4. Kawamori F, Shimazu Y, Monma N, et al. (2017). *Jpn J Infect Dis*, 71, 267-273
5. Yoshikawa T, Fukushi S, Tani H, et al. (2014). *J Clin Microbiol*, 52, 3325-3333
6. Uehara N, Yano T, Ishihara A, et al. (2016). *Intern Med*, 55, 831-838
7. Satoh M, Akashi S, Ogawa M, et al. (2017). *J Infect Chemother* 23: 45-50
8. 寺杣文男, 松井由樹, 濱島洋介, 他. (2017). *IASR* 38: 116-117
9. 川口剛, 梅北邦彦, 岡山昭彦, 他. (2020). *IASR*, 41, 137
10. 平良雅克, 追立のり子, 西嶋陽奈, 他. (2021). *IASR*, 42, 150-152

COVID-19 mRNA ワクチン接種後のオミクロン株BA.1およびBA.5に対する抗体応答に関する高齢者施設コホート調査

板持 雅恵 矢澤 俊輔 稲崎 倫子 佐賀由美子
山崎 笑子 嵩田 嵩久 田村 恒介 前西 絵美
磯部 順子 中村 雅彦 高岡 美紗 笹島 仁
川尻千賀子 谷 英樹 大石 和徳

Neutralization of Omicron Subvariants BA.1 and BA.5 by a Booster Dose of COVID-19 mRNA Vaccine in a Japanese Nursing Home Cohort

Masae ITAMUCHI, Shunsuke YAZAWA, Noriko INASAKI, Yumiko SAGA, Emiko YAMAZAKI, Takahisa SHIMADA, Kosuke TAMURA, Emi MAENISHI, Junko ISOBE, Masahiko NAKAMURA, Misuzu TAKAOKA, Hitoshi SASAJIMA, Chikako KAWASHIRI, Hideki TANI, and Kazunori OISHI

新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) の原因である重症呼吸器症候群コロナウイルス 2 (SARS-CoV-2) は、2019 年 12 月に中国・武漢における肺炎症例から初めて検出され、2020 年に世界的な流行となった [1]。高齢者施設における入居者は COVID-19 の重症化リスクが高く [2]、日本と米国における COVID-19 による死亡のうち、それぞれ 14% と 26.6% が高齢者施設入居者で占められていることが報告されている [3-5]。2020 年初頭の長期療養施設における COVID-19 のクラスターに関する先行研究では、長期療養施設における集団発生数と流行規模がそれぞれ死亡率の高さと関連しており [5]、長期療養施設における COVID-19 の集団発生を予防することの重要性が示唆されている。

COVID-19 ワクチンは迅速に開発され、2020 年末から世界的にワクチンが導入された。2020 年に実施されたランダム化比較試験において、COVID-19 mRNA ワクチンである BNT162b2 (Pfizer-BioNTech) および mRNA-1273 (Moderna) は接種後約 2 か月で 90% 以上の予防効果を示した [6-7]。日本では、2021 年 2 月から医療従事者への mRNA ワクチン (BNT162b2 ワクチン) の 1 回目と 2 回目の接種が開始され、その後、65 歳以上の高齢者、基礎疾患のある成人、60～64 歳の成人、高齢者施設職員への接種が続いた。BNT162b2 ワクチンまたは mRNA-1273 ワクチンによる 3 回目接種は、2 回目接種から 6 か月以上経過した対象者に実施された。

2020 年 12 月以降、B.1.1.7 (アルファ株)、B.1.351 (ベータ株)、P.1 (ガンマ株)、B.1.617.2 (デルタ株)、B.1.1.529 (オミクロン株) などの複数の SARS-CoV-2 変異株が世界中で報告されている [8]。感染性や抗原性などのウイルス特性が変化したこれらの懸念される変異株は、集団免疫に対応して進化した可能性がある [9]。初期の mRNA ワクチンは武漢株を基に製造されていたが、SARS-CoV-2 変異株は免疫回避することが示されている [10-11]。また、Matsumura らは、京都府の高齢者施設でオミクロン株による集団発生が発生した際に、ワクチン接種済にもかかわらず、入居者の死亡率と罹患率が高かったことを報告している [12]。

本研究では、COVID-19 の重症化リスクの高い高齢者を対象に、mRNA ワクチン接種後の SARS-CoV-2 オミクロン株に対する抗体反応を評価するため、富山県内の高齢者施設の入居者と職員を対象にコホート調査を実施した。

材料と方法：

1. 対象者

研究期間：2021 年 5 月から 2022 年 12 月

研究参加者：富山県内の 6 か所の高齢者施設における SARS-CoV-2 未感染者 335 名

うち、入居者：141 名 (年齢中央値：88 歳、範囲：57～103 歳)、施設職員：194 名 (年齢中央値：44 歳、範囲：18～79 歳)

研究期間中のブレイクスルー感染者 (BTI) は、

COVID-19 mRNA ワクチン接種後, SARS-CoV-2 の逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) またはイムノクロマトグラフィー検査の陽性結果によって確認されたCOVID-19 の届出者, または自然感染のバイオマーカーである血清中の抗 N-IgG の陽性者 [13] と定義した. その結果, 研究期間をとおしてSARS-CoV-2 未感染者が284 名 (職員 161 名, 入居者 123 名), SARS-CoV-2 ブレイクスルー感染者が51 名 (アルファ株流行期: 1 名, オミクロン株 BA.1 流行期: 14 名, BA.5 株流行期: 36 名) であった (表, 図 1B).

すべての参加者は, 2021 年 4 月から 6 月にかけて, 初回シリーズのワクチンとしてBNT162b2 ワクチンを筋肉内注射で 2 回接種された. 3 回目接種は, 2022 年 1 月から 3 月にかけて 131 名が BNT162b2 ワクチンを, 204 名が mRNA-1273 ワクチンを接種された (図 1A および B). 採血は, ワクチン接種前の 2021 年 5 月から 6 月, 2 回目接種 2 か月後および 5 か月後の 2021 年 8 月から 9 月, 2021 年 11 月から 12 月にそれぞれ実施した. また, 3 回目接種 2 か月後および 5 か月後の 2022 年 3 月から 6 月, 2022 年 6 月から 9 月に, それぞれ採血した.

2. SARS-CoV-2 の全ゲノム解析

COVID-19 の感染症発生動向調査により 2021 年 3 月から 2022 年 10 月まで富山県内の医療機関で PCR または抗原検査で SARS-CoV-2 陽性となった鼻咽頭ぬぐい液または唾液の計 1,356 検体をゲノム解析の対象とした. ウイルス RNA は, QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen) を用いて抽出した. 抽出 RNA は, SARS-CoV-2 ARTIC Network プロトコル [14] に従い PCR 後, QIAseq FX DNA Library kit (Qiagen) を用いて次世代シーケンサー (NGS) ライブラリを構築し, iSeq プラットフォーム (Illumina) により全ゲノムの塩基配列を解読した. 塩基配列は, BWA-MEM アルゴリズム (バージョン 0.7.13-r1126) を用いて SARS-CoV-2 Wuhan-Hu-1 参照配列 (GenBank アクセッション番号 MN908947.3) にマッピングし [15], Varscan version 2.4.3 [16-17] を用いて変異アリール頻度を解析した. SARS-CoV-2 塩基配列について, COG-UK (<https://pangolin.cog-uk.io/>) を用いてアルファ株 (B.1.1.7) またはデルタ株 (B.1.617.2), あるいはオミクロン株 BA.1 (B.1.1.529.1) または BA.5 (B.1.1.529.5) の遺伝子系統を決定した. しかしながら, 本研究では, 高

齢者施設におけるブレイクスルー感染者のウイルス遺伝子系統の決定はできていない.

3. SARS-CoV-2 シュードタイプウイルス (pv) 中和活性の測定

SARS-CoV-2 の S タンパク質を外套した水疱性口内炎ウイルス (SARS-CoV-2pv) は, 既報と同様に作製した [18]. SARS-CoV-2 スパイクタンパク質の発現プラスミドである pCAGG-pm3-SARS2-SHu-d19_Eng (アルファ株), pCAGG-pm3-SARS2-SHu-d19_B.1.617.2 (デルタ株), pCAGG-pm3-SARS2-SHu-d19_B.1.1.529.1 (オミクロン株 BA.1), pCAGG-pm3-SARS2-SHu-d19_B.1.1.529.5 (オミクロン株 BA.5) は大阪大学微生物病研究所の小野慎子博士および松浦善治博士から分与を受けた. SARS-CoV-2pv は, 使用時まで -80°C で保存した.

被験血清は, ワクチン接種前, 2 回接種 2 か月後および 5 か月後, 3 回接種 2 か月後および 5 か月後に対象者から採取した. 血清中の中和抗体は, 武漢株, アルファ株 (B.1.1.7), デルタ株 (B.1.617.2), オミクロン株 BA.1 (B.1.1.529.1) および BA.5 (B.1.1.529.5) の S タンパク質を外套した SARS-CoV-2pv を用いた中和試験により測定した. すなわち, 100 μ L/well の 8% のウシ胎児血清添加ダルベッコ変法イーグル培地の入った 96 穴プレート上の VeroE6/TMPRSS2 細胞に, 対象者血清 1 μ L と SARS-CoV-2pv 10 μ L を加えて混合し, 37°C, 5% 炭酸ガス存在下で一晩培養した. 陰性対照および陽性対照は, 検体と同様の方法で測定した. ルシフェラーゼ活性は, Pica gene BrilliantStar-LT (TOYO B-Net) を用いて, GloMax navigator system (Promega) により測定した. 中和抗体価は, 陰性対照血清と中和後の SARS-CoV-2pv のルシフェラーゼ活性の値を被験血清と中和後の SARS-CoV-2pv ルシフェラーゼ活性の値で除した値とした. 各検体は同時に 2 穴ずつ測定した. ウサギ免疫血清とヒト血清を用い, SARS-CoV-2pv および SARS-CoV-2 生ウイルスに対するそれぞれの中和抗体価の間の有意な相関を確認した (図 2). SARS-CoV-2 生ウイルスとウサギ免疫血清は, 国立感染症研究所の福士秀悦博士から分与を受けた [19].

4. IgG ELISA

ELISA プレートに SARS-CoV-2 武漢株の Receptor binding domain (RBD) タンパク質 (1

μg/mL, 50 μL/well) またはスクレオカプシド (N) タンパク質 (1 μg/mL, 50 μL/well) (ACRO Biosystems) を、4℃一晩固相化させた。次に、0.1 % -Tween20 添加リン酸緩衝生理食塩水 (PBST) で洗浄し 20 % Blocking-One 添加 PBST で反応させた。ブロッキング後、RBD タンパク質については400 倍または1600 倍、N タンパク質については100 倍に希釈した血清を反応させて洗浄した。続いて、抗ヒト IgG HRP (Promega) を反応させ、洗浄後、ABTS 溶液 (Merck) を加え、4N 硫酸で反応を停止し、波長 405/490 nm のプレートリーダーで吸光度を測定した。吸光度が 1.0 以上の場合、N-IgG 陽性とした。測定範囲は、中和抗体価が $1 \sim 1.0 \times 10^6$ 、抗 RBD-IgG および抗 N-IgG でそれぞれ $0 \sim 8.0 \times 10^4$ U/mL であった。

5. 統計解析

年齢別、性別の RBD IgG 価、対数変換した中和抗体価について、危険率 5 % 未満を有意とし、IBM SPSS Statistics 27.0 (IBM) を用いて検定を行った。ノンパラメトリック検定の群間比較には、Mann-Whitney U 検定および Wilcoxon signed-rank 検定を用いた。抗体価間の相関はピアソンの相関係数を用いた。Jonckheere-Terpstra 検定は、年齢区分別の抗体価の傾向を検定するために用いた。

6. 倫理審査

調査の実施に際し、富山県衛生研究所倫理審査委員会により承認を受け (R3-1)、ヘルシンキ宣言に従った。研究対象者または代諾者には、本調査への協力について、文書により同意を得た。

結果：

1. SARS-CoV-2 のゲノム疫学

富山県における SARS-CoV-2 感染者からは、2021 年 3 月から 8 月にかけてアルファ株、2021 年 7 月から 10 月にかけてデルタ株が検出された。また、2021 年 12 月からオミクロン株 BA.1 による COVID-19 の流行が始まり、流行株は 2022 年 4 月から 7 月にかけてオミクロン株 BA.2 に置き換わり、2022 年 8 月から 12 月にかけてオミクロン株 BA.5 に置き換わった (図 1A)。

2. SARS-CoV-2 未感染者およびブレイクスルー感染者における RBD IgG と中和抗体価

SARS-CoV-2 未感染者 284 名における血清中抗 RBD-IgG 価の平均値は、ワクチン接種前のベースライン値から 2 回目接種 2 か月後には 1.6×10^4 U/mL に増加し、2 回目接種 5 か月後には 7.1×10^3 U/mL に減少したが、3 回目接種 2 か月後には 3.7×10^4 U/mL に上昇した (図 3A)。3 回目接種 5 か月後には、SARS-CoV-2 未感染者 209 名の抗 RBD-IgG 価の平均値は 2.3×10^4 U/mL に減少した (図 3A)。

SARS-CoV-2 未感染者 284 名では、武漢株、およびアルファ株、デルタ株、オミクロン株 BA.1、および BA.5 に対する幾何平均中和抗体価は、ワクチン接種前のベースライン値から 2 回目接種 2 か月後に、それぞれ 33.8 倍、6.4 倍、2.7 倍、1.2 倍、1.1 倍に増加し、2 回目接種 5 か月後にはそれぞれ 19.9 倍、5.2 倍、2.1 倍、1.0 倍に減少した (図 3B)。一方、3 回目接種 2 か月後にはそれぞれ 336.0 倍、119.4 倍、43.1 倍、6.0 倍、5.2 倍に顕著に増加し、3 回目接種 5 か月後にはそれぞれ 88.0 倍、30.1 倍、23.2 倍、2.4 倍、1.7 倍に低下した。

アルファ株流行期 (2021 年 8 月) には、41 歳の施設職員 1 名がブレイクスルー感染し、この参加者の抗 RBD-IgG と中和抗体価は 3 回目ワクチン接種 2 か月後に増加した (データ示さず)。オミクロン株 BA.1 流行期 (2022 年 1 月～3 月) には、14 名が 3 回目接種 2 か月後までにブレイクスルー感染した。これらの 14 名の RBD IgG 価の平均値は、2 回目接種 5 か月後 (3.9×10^4 U/mL) から、3 回目接種 2 か月後 (5.8×10^4 U/mL) に顕著に上昇した ($p < 0.001$) (図 3C)。また、これらの 14 名の武漢株、アルファ株、デルタ株、オミクロン株 BA.1、BA.5 に対する幾何平均中和抗体価も 3 回目接種 2 か月後にそれぞれ 1373.4 倍、1077.8 倍、155.7 倍、38.1 倍、10.5 倍と、2 回目接種 5 か月後から有意に増加した ($p < 0.001$, 図 3D)。これらの 14 名の幾何平均中和抗体価は、3 回目接種 5 か月後には、3 回目接種 2 か月後と比較して有意に減少した (武漢株： $p < 0.01$, アルファ株およびオミクロン株 BA.1： $p < 0.05$)。

オミクロン株 BA.5 流行期 (2022 年 6 月～9 月) にブレイクスルー感染した 35 名における RBD-IgG 価の平均値は、3 回目接種 5 か月後 (4.4×10^4 U/mL) と、3 回目接種 2 か月後 (4.3×10^4 U/mL) とで差がみられなかった ($p > 0.05$, 図 3E)。これらの 35 名における、武漢株、アルファ株、デルタ株、オミクロン株の BA.1 および BA.5 に対する幾何平均中和抗体価は、3 回

目接種2か月後にそれぞれ266.3倍, 95.2倍, 50.6倍, 6.4倍, 5.7倍と, 2回目接種5か月後から有意に増加した ($p < 0.001$, 図3F). これらの35名は, 3回目接種2か月後と5か月後との間にブレイクスルー感染したため, 3回目接種5か月後では, 3回目接種2か月後と比較して, 武漢株, アルファ株, デルタ株, オミクロン株 BA.1 および BA.5 に対する幾何平均中和抗体価がそれぞれ860.0倍, 220.7倍, 141.0倍, 20.1倍, 30.0倍と, 顕著に増加した (デルタ株, オミクロン株 BA.1 および BA.5 : $p < 0.001$, 武漢株およびアルファ株 : $p < 0.05$).

3. SARS-CoV-2 未感染者における年齢区分別 RBD IgG および中和抗体価

SARS-CoV-2 未感染者の年齢区分別のRBD-IgG 価の平均値および幾何平均中和抗体価を図4に示す. 2回目接種および3回目接種のそれぞれ2か月後と5か月後において, 高齢になるほどRBD-IgG 価は低かった ($p < 0.001$, 図4A). 2回目接種2か月後および5か月後, 武漢株, アルファ株, デルタ株, オミクロン株 BA.1 および BA.5 に対する幾何平均中和抗体価も, 高齢になるほど低かった ($p < 0.001$, 図4B). 2回目接種2か月後と5か月後におけるオミクロン株 BA.1 および BA.5 に対する中和抗体価は, すべての年齢層で低かった. 一方, オミクロン株 BA.1 および BA.5 に対する中和抗体価は, 80歳以上の高齢者においても, 3回目接種2か月後に上昇したが, 5か月後には減弱した. 3回目接種2か月後と5か月後におけるオミクロン株 BA.1 と BA.5 に対する中和抗体価は, 高齢になるほど低く, 年齢と有意な相関があった ($p < 0.001$, 図4B).

また, 57～79歳の同年齢のSARS-CoV-2 未感染者を対象に, COVID-19 mRNA ワクチン2回目および3回目接種後の免疫応答に職員と入居者で違いがあるかどうかを検討した. 2回目接種後, 武漢株, アルファ株, デルタ株, オミクロン株 BA.5 に対する中和抗体価は入居者より職員で有意に高かったが, 3回目接種2か月後 (年齢中央値: 職員64歳, 入居者75歳) では, RBD-IgG および武漢株とオミクロン株 BA.5 を含むすべての変異型に対する中和抗体価の上昇に職員と入居者で差は認められなかった (図5).

考察: 本研究では, mRNA ワクチンのブースター接種により, 高齢者施設入居者と職員のSARS-

CoV-2 抗RBD IgG 価および中和抗体価が顕著に上昇した. また, 2回目および3回目接種後の中和抗体価は, 武漢株に対して最も高く, 次いでアルファ株, デルタ株, オミクロン株 BA.1, BA.5 と続いた. このことはCOVID-19 mRNA ワクチンの3回目接種による集団免疫からSARS-CoV-2変異株が免疫回避していることを示していると考えられる[9-11]. mRNA ワクチンの3回目接種により, オミクロン株 BA.1 を含む変種株に対する抗RBD-IgG および中和抗体価が上昇したことは, 医療従事者[20-22] および高齢者施設入居者における先行研究[23-24]と一致している. 本研究では, 3回目接種により, オミクロン株 BA.5 に対する中和抗体価が増強され, BA.1 に対する中和抗体価と同等になることが明らかになった. Kotakiらは, mRNA ワクチン2回目接種により, 接種後約5か月間, 種々の変異株に対する中和抗体が持続し, 3回目接種後, メモリーB細胞サブセットがオミクロン中和抗体を誘導する可能性を示している[25].

一方, BA.5 流行期に35名の参加者に発生したブレイクスルー感染は, COVID-19 mRNA ワクチンの3回目接種により誘導された武漢株, アルファ株, デルタ株, オミクロン株 BA.1, BA.5 に対する中和抗体価を増強することが判明した. mRNA ワクチンを1～2回目接種すると医療従事者の抗体反応が高まるというこれまでの報告は, 我々の結果と一致している[26-27]. Altarawnehらは, 既感染者におけるBNT162b2 ワクチン3回目接種のワクチン効果は77.3%であったのに対し, 既感染者におけるBNT162b2 ワクチン2回目接種のワクチン効果は55.1%であり, 自然感染と最近のブースターワクチン接種によるハイブリッド免疫が最も強力であると報告している[28]. ワクチン接種後のブレイクスルー感染者におけるBA.5に対する中和抗体価の持続期間については未だ明らかではないため, 今後の検討課題である.

本研究では, SARS-CoV-2 未感染者における中和抗体価は, 武漢株に比較してBA.1で36.7倍, BA.5で51.8倍低く, オミクロン株 BA.5 流行期のブレイクスルー感染者における中和抗体価は, 武漢株に比較してBA.1で42.8倍, BA.5で28.7倍低かった. Hachmanらは, SARS-CoV-2 未感染者 (年齢中央値35歳) のmRNA ワクチン3回目接種後の中和抗体価は, 武漢株と比較して, BA.1で6.4倍, BA.5で21倍低いことを報告している[29]. 本研究と先行研究におけるBA.1とBA.5の中和抗体価の違いは, 参加者の年齢分布

の違いが一因と考えられる。

また、本研究における、SARS-CoV-2 未感染者のオミクロン株 BA.1 および BA.5 に対する中和抗体価は、mRNA ワクチン 3 回目接種 2 か月後に顕著に増加したが、3 回目接種から 5 か月後に急速に減少したことがわかった。Lyke らは、オミクロン株を含む SARS-CoV-2 既感染者において、mRNA ワクチン 3 回目接種 9 か月後の中和抗体価の減少速度がやや緩やかであることを報告している [30]。Qu らは、ワクチン 3 回目接種 30 日後の中和抗体価の低下率は、D614G 変異を持つプロトタイプウイルスに対しては 17.1%，BA.4/5 に対しては 12.1% であり、SARS-CoV-2 既感染者はオミクロン株、特に BA.4/5 に高い中和抗体価を有していることを報告している [31]。

他方、Müller らは、ドイツの成人において、BNT162b2 ワクチン 2 回目接種後のスパイク特異的 IgG 値の年齢依存的な負の相関を報告している [32]。また、Kawasuji らは、20 歳から 70 歳までの医療従事者において、変異株に対する RBD IgG および中和抗体価の年齢依存的な減少を報告している [21]。これらの知見は、高齢者施設における mRNA ワクチン 2 回目および 3 回目接種後に RBD IgG と中和抗体価が年齢依存的に減少するという我々の知見と一致する。本研究では、COVID-19 mRNA ワクチン 2 回目接種後の抗 RBD-IgG および中和抗体価は、職員と入居者の間で有意な差が見られたが、3 回目接種 2 か月後には、職員、入居者ともに中和抗体価が上昇し、抗体価に差が見られなかった。これらの結果は、COVID-19 mRNA ワクチンのブースター接種により、高齢者施設の入居者においても職員等と同様にオミクロン株に対する高い中和抗体価が得られることを示唆しており、既報 [33] と一致する。

さらに、本研究では、特に 80 歳以上の SARS-CoV-2 未感染者において、mRNA ワクチン 3 回目接種 5 か月後に中和抗体価が非常に低いことが判明した。日本では 8 月から 2022 年末までオミクロン株 BA.5 の流行が続いたため、2022 年 9 月以降、mRNA ワクチン 2 回目接種済の 12 歳以上を対象に BA.1 または BA.5 の 2 価 mRNA ワクチンが接種されている。これまでの報告では、BA.1 または BA.5 の 2 価 mRNA ワクチンブースター接種による BA.5 に対する中和抗体価は、1 価の mRNA ワクチンブースター接種による中和抗体価よりも高いか同等であると報告されている [34-35]。80 歳以上の高齢者における、BA.1 または

BA.5 の 2 価 mRNA ワクチン追加接種によって誘導されたオミクロン株 BA.5 等の変異株に対する中和抗体の持続性は明らかでないため、さらなる調査が必要であると考えられる。

本研究にはいくつかの制限がある。第 1 に、地域で生活する高齢者施設職員と入居者の抗体反応のデータを 1 つのコホートとして分析した。第二に、慢性疾患の有無など、各参加者の病歴に関する情報を収集していない。これらの要因が抗体反応に影響を与えた可能性が考えられる。第三に、自己免疫疾患や免疫抑制剤の使用など、特定の慢性疾患が抗体反応に影響を与えた可能性があるが [36]、本研究では、このような慢性疾患の抗体反応に与える影響を評価することができなかった。

結論：SARS-CoV-2 未感染者では、COVID-19 mRNA ワクチンの 3 回目接種 2 か月後に、オミクロン株 BA.1 および BA.5 に対する抗 RBD-IgG および中和抗体価が顕著に増加した。SARS-CoV-2 未感染者のオミクロン株 BA.1 および BA.5 に対する抗 RBD-IgG および中和抗体価は、年齢が高くなるに従い 3 回目接種 2 か月後および 5 か月後に低下し、特に 80 歳以上で顕著であった。BA.5 流行期（3 回目接種 2～5 か月）のブレイクスルー感染者は、3 回目接種 5 か月後でもオミクロン株 BA.5 に対して高い中和抗体価がみられた。

謝 辞

本研究にご協力くださった高齢者施設の入居者、職員、富山市医師会の看護師の方々、室谷ゆかり氏（アルペンリハビリテーション病院）、杉森洋一氏、石黒真弓氏（特別養護老人ホームアルペンハイッ、あしたねの森）、平田洋介氏（特別養護老人ホーム雅）、伊勢美和氏（特別養護老人ホームはるかぜ）、坂井麻貴氏（特別養護老人ホームかがやき）、見波栄二郎氏、幅一芳氏（特別養護老人ホームくれは苑）に深謝いたします。本研究の実施にあたり、技術支援くださった長谷川澄代氏、川口泉氏、金森陽子氏、ウイルスゲノム解析の技術的支援をいただいた国立感染症研究所病原体ゲノム解析センターの黒田誠博士、関塚剛博士にお礼申し上げます。

本研究は、日本公衆衛生学会（2021）（谷英樹）、大同生命厚生事業団（2021-14）（谷英樹）、黒住医学研究振興財団（2021）（板持雅恵）の助成を受けた。

本資料は, Vaccine. 2023; 41: 2234-2242 に報告した。

文 献

1. Zhu N, Zhang D, Wang W, et al. (2020). N Engl J Med, 382, 727-733
2. White EM, Kosar CM, Feifer RA, et al. (2020). Am J Geriatric Society, 68, 2167-2173
3. 共同通信. 介護施設で死亡全体の14% 新型コロナ、共同通信自治体調査 <https://www.47news.jp/4808143.html> (2023 年 5 月 23 日アクセス可能)
4. Comas-Herrera A, Marczak J, Byrd W, et al. LTCcovid International living report on COVID-19 and Long-Term Care. <https://ltccovid.org/international-living-report-covid-ltc/> (2023 年 5 月 23 日アクセス可能)
5. Iritani O, Okuno T, Hama D, et al. (2020). Geriatr Gerontol Int, 20, 715-719
6. Polack FP, Thomas SJ, Kitchin N, et al. (2020). N Engl J Med, 383, 2603-2615
7. Baden LR, El Sahly HM, Essink B, et al. (2021). N Engl J Med, 384, 403-416
8. WHO. Tracking SARS-CoV-2 variants. <https://www.who.int/en/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants/>(2023 年 5 月 23 日アクセス可能)
9. Lucas C, Vogels CB, Yildirim I, et al. (2021). Nature, 600, 523-529
10. Iketani S, Liu L, Guo Y, et al. (2022). Nature, 604, 553-556
11. Harvey WT, Carabelli AM, Jackson B, et al. (2021). Nature Rev Microbiol, 19, 409-424
12. Matsumura Y, Yamamoto M, Shinohara K, et al. (2022). Am J Infect Control, S0196-6553, 00675-00677
13. Lee N, Jeong S, Lee SK, et al. (2022). Vaccines, 10, 1143
14. Itokawa K, Sekizuka T, Hashino M, et al. (2020). PLoS One, 15, e0239403
15. Li H, Durbin R. (2009). Bioinformatics, 25, 1754-1760
16. Koboldt DC, Zhang Q, Larson DE, et al. (2012). Genome Res, 22, 568-576
17. Melero R, Sorzano COS, Foster B, et al. (2020). IUCrJ, 7, 1059-1069.
18. Tani H, Kimura M, Tan L, et al. (2021). E Virol J, 18, 16
19. Yamada S, Fukushi S, Kinoshita H, et al. (2021). BMJ Open Respir Res, 8, e000830
20. Haveri A, Solastie A, Ekstrom N, et al. Eur J Immunol, 52, 816-824
21. Kawasuji H, Morinaga Y, Tani H, et al. (2021). Microbiol Spectr, 9, e0056121
22. Furukawa K, Handayani T, Kurahashi Y, et al. (2022). JAMA Netw Open, 5, e2210780
23. Chong Y, Goto T, Tani N, et al. (2022). Influenza Other Respir Viruses, 16, 1066-1071
24. Canaday DH, Oyebanji OA, White E, et al. (2022). EBioMedicine. 80, 104066
25. Kotaki R, Adachi Y, Moriyama S, et al. (2022). Science Immunol, 7, eabn8590
26. Vicenti I, Gatti F, Scaggiante R, et al. (2021). Int J Infect Dis. 108, 176-178.
27. Ontanon J, Blas J, de Cabo C, et al. (2021). EBioMedicine, 73, 103656.
28. Altarawneh HN, Chemaitelly H, Ayoub HH, et al. (2022). N Engl J Med, 387, 21-34
29. Hachmann NP, Miller J, Collier AY, et al. (2022). N Engl J Med, 387, 86-88
30. Lyke KE, Atmar RL, Islas CD, et al. (2022). Cell Rep Med, 3, 100679
31. Qu P, Faraone JN, Evans JP, et al. (2022). N Engl J Med, 387, 1329-1331
32. Müller L, Andrée M, Moskorz W, et al. (2021). Clin Infect Dis, 73, 2065-2072
33. Shapiro JR, Sitaras I, Park H-S, et al. (2022). Clin Infect Dis, 75, S61-S71
34. Chalkias S, Harper C, Vrbicky K, et al. (2022). N Engl J Med, 387, 1279-1291.
35. Collier AY, Miller J, Hachmann NP, et al. (2023). N Engl J Med, 388, 565-567
36. Furer V, Eviatar T, Zisman D, et al. (2021). Ann Rheum Dis, 80, 1330-1338

表. 性別, 年齢別, 感染歴別の研究参加者数

	SARS-CoV-2 未感染者			SARS-CoV-2 ブレイク スルー感染者			計
	職員	入居者	小計	職員	入居者	小計	
参加者(n)	161	123	284	33	18	51	335
女性 (%)	114(71)	92(75)	206(73)	28(85)	16(89)	44(86)	250(75)
年齢 (歳) 中央値 (四分位範囲)	47 (36-58)	88 (83-93)	66 (45-86)	38 (26-43)	90 (85-94)	43 (35-86)	62 (43-86)
年齢区分 (歳)							
18-29	21		21	9		8	30
30-39	29		29	9		7	38
40-49	40		40	11		9	51
50-59	36	1	37	2		2	39
60-69	22	2	24	2		2	26
70-79	13	14	27		2	2	29
80-89		56	56		7	7	63
90-103		50	50		9	8	59

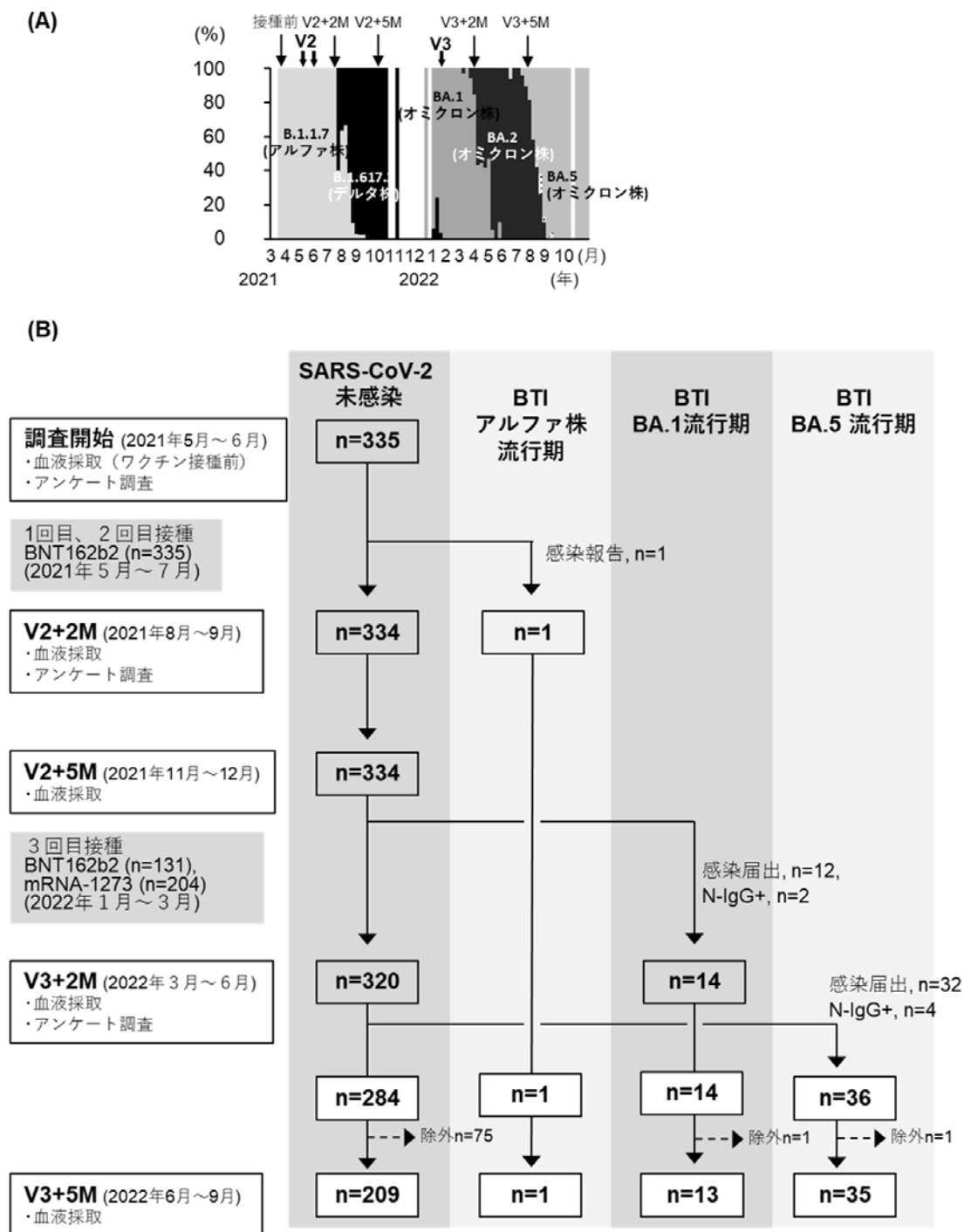
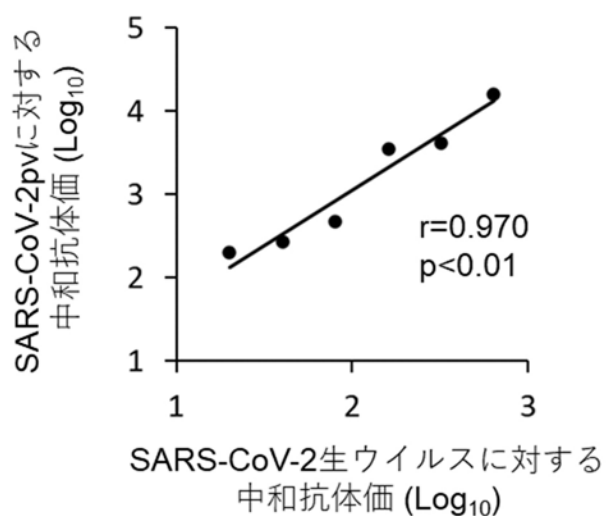


図1. ゲノム疫学と研究デザイン

(A) 富山県における SARS-CoV-2 変異株のゲノム疫学 2021 年 3 月から 2022 年 10 月まで SARS-CoV-2 陽性検体のうち 0 ～ 178 検体 / 月を解析し、各変異株の割合を示した。(B) 高齢者施設におけるコホート調査のフローチャート。SARS CoV-2 未感染者 335 名の登録後、アルファ株流行期 (n = 1)、オミクロン株 BA.1 流行期 (n = 14)、BA.5 流行期 (n = 36) にブレイクスルー感染者がみられた。うち 6 名は、COVID-19 感染者としての報告はなかったが、3 回目接種の 2 か月後 (n = 2) または 5 か月後 (n = 4) に、抗 N IgG 陽性であった。77 名の研究参加者は、49 名が 3 回目接種 5 か月後の採血前に mRNA ワクチン 4 回目接種を受けたため、研究対象から除外された。また、3 回目接種 5 か月後において、職員 14 名と入居者 7 名が採血を辞退し、入居者 7 名は老衰で死亡した。V2 + 2M：ワクチン 2 回目接種 2 か月後、V2 + 5M：ワクチン 2 回目接種 5 か月後、V3 + 2M：ワクチン 3 回目接種 2 か月後、V3 + 5M：ワクチン 3 回目接種 5 か月後、BTI：ブレイクスルー感染

(A) ウサギ血清希釈系列



(B) ヒト血清

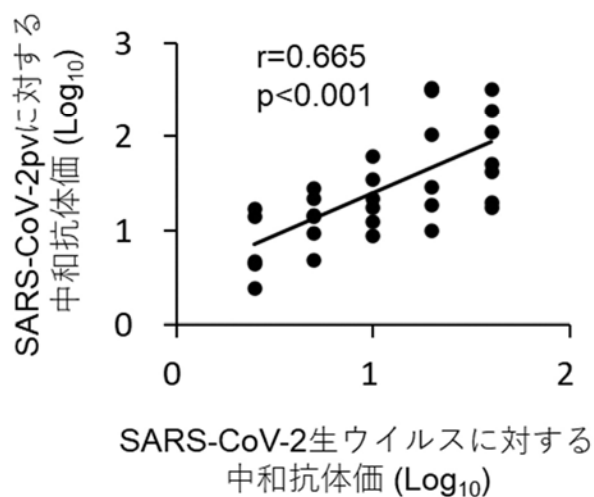


図 2. ウサギ免疫血清とヒトの血清サンプルを用いた, SARS-CoV-2 生ウイルスに対する中和抗体価と SARS-CoV-2pv に対する中和抗体価の相関

(A) ウサギ免疫血清の希釈シリーズ, (B) ヒト血清検体 (n=31)

* 中和抗体価 = 陰性血清中の SARS-CoV-2pv ルシフェラーゼ活性 / 被験血清中の SARS-CoV-2pv ルシフェラーゼ活性

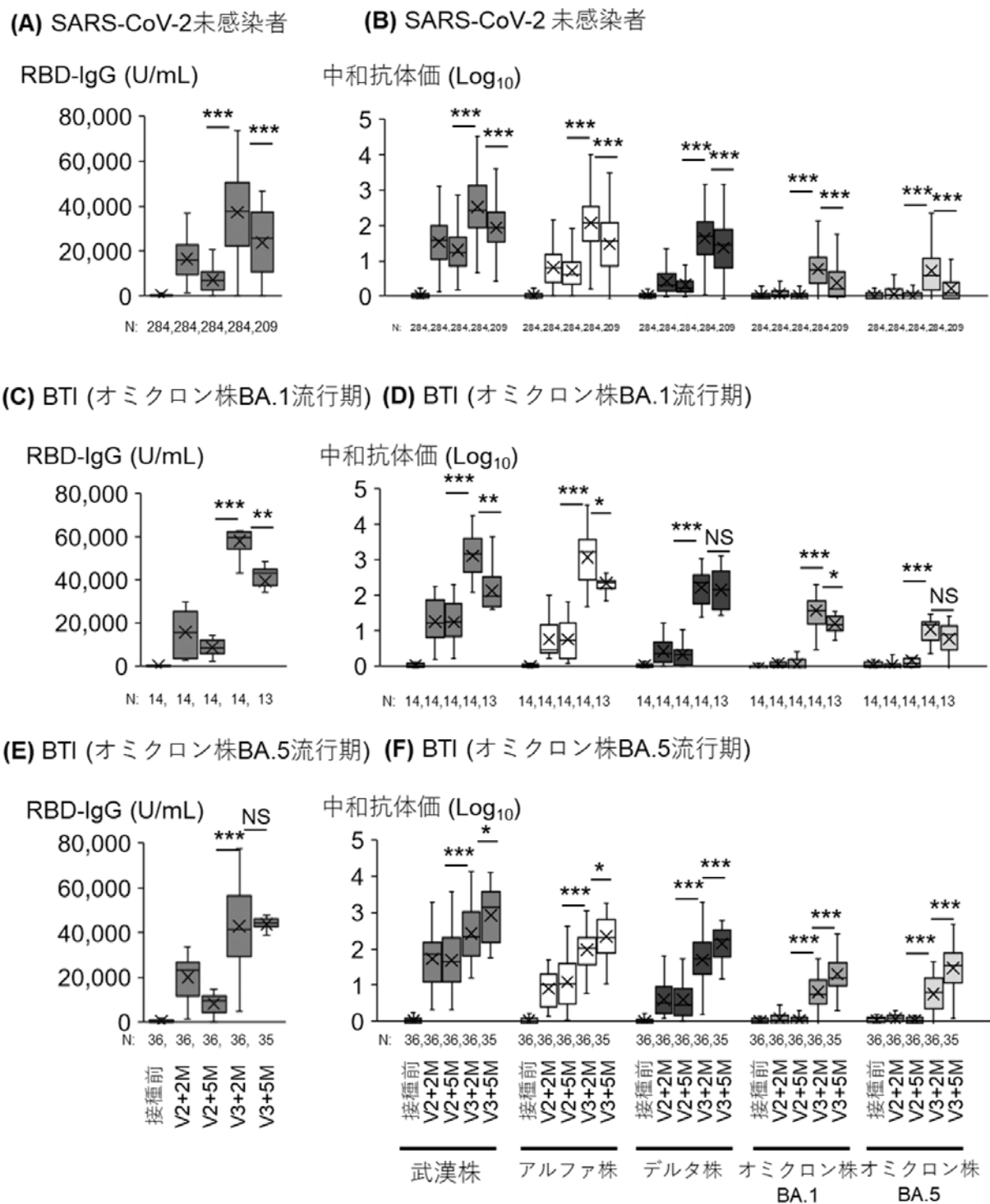


図 3. 感染歴別の mRNA ワクチン 2 回目および 3 回目接種 2 か月および 5 か月後の抗 RBD IgG 価および中和抗体価

(A) SARS-CoV-2 未感染者における RBD IgG 価, (B) SARS-CoV-2 未感染者における SARS-CoV-2pv に対する中和抗体価, (C) BA.1 流行期 (2022 年 1 ~ 3 月) ブレイクスルー感染者における RBD IgG 抗体価, (D) BA.1 流行期 (2022 年 1 ~ 3 月) ブレイクスルー感染者における中和抗体価, (E) BA.5 流行期 (2022 年 6 ~ 9 月) ブレイクスルー感染者における RBD IgG 価, (F) BA.5 流行期 (2022 年 6 ~ 9 月) ブレイクスルー感染者における中和抗体価. ***, $p < 0.001$; **, $p < 0.01$; *, $p < 0.05$; NS, 有意差なし. V2 + 2M: ワクチン 2 回目接種 2 か月後, V2 + 5M: ワクチン 2 回目接種 5 か月後, V3 + 2M: ワクチン 3 回目接種 2 か月後, V3 + 5M: ワクチン 3 回目接種 5 か月後, BTI: ブレイクスルー感染

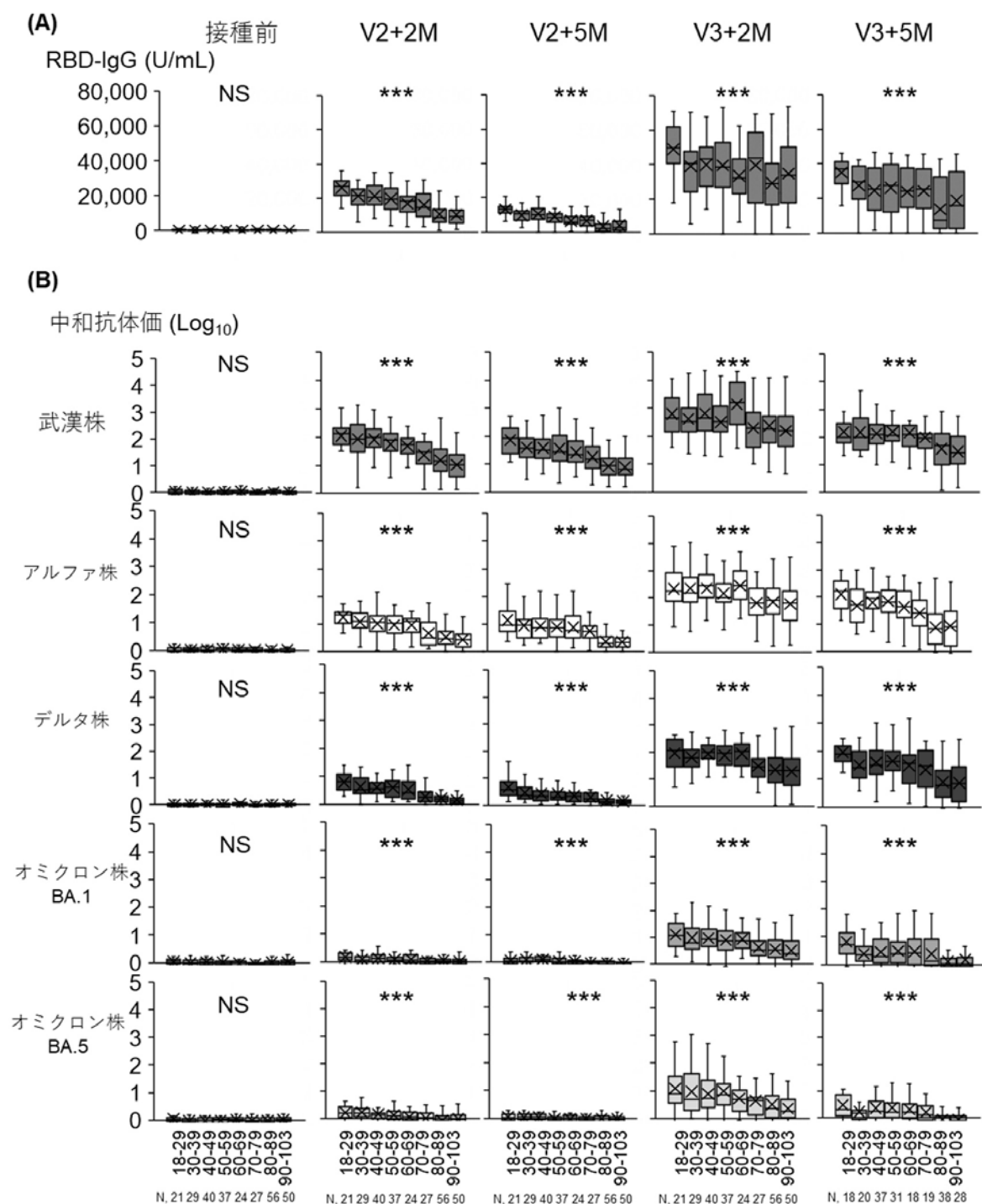


図 4. 年齢区分別のSARS-CoV-2 未感染者におけるmRNA ワクチン 2 回目および 3 回目接種 2 か月および 5 か月後の抗 RBD IgG 価および中和抗体価

(A) SARS-CoV-2 RBD IgG 価, (B) SARS-CoV-2pv に対する中和抗体価, N = 284. ***, $p < 0.001$; *, $p < 0.05$; NS, 有意差なし (Jonckheere-Terpstra 検定)

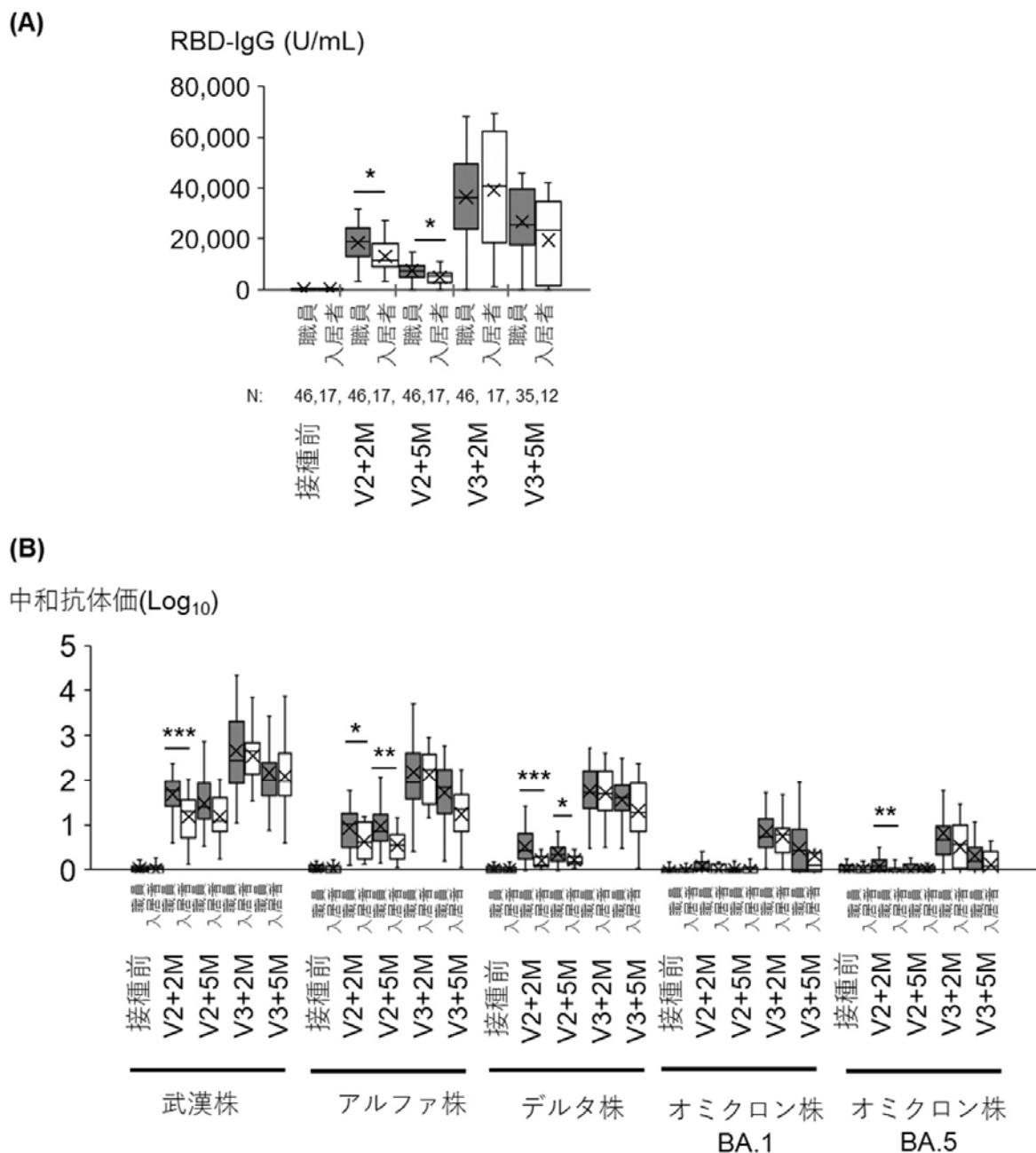


図 5. 57～79 歳の職員および入居者における COVID-19 mRNA ワクチン 2 回および 3 回目接種 2 か月後および 5 か月後の RBD IgG 価および中和抗体価

***, $p < 0.001$; **, $p < 0.01$; *, $p < 0.05$ (Mann Whitney U 検定による職員と入居者の比較)

富山県内の腸管出血性大腸菌感染症発生状況(2022年)

木全 恵子 金谷 潤一 小坂 真紀 前西 絵美
綿引 正則 磯部 順子 頼成 明奈¹ 大石 和徳

Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Infectious Diseases Detected in Toyama Prefecture in 2022

Keiko KIMATA, Jun-ichi KANATANI, Maki KOSAKA, Emi MAENISHI,
Masanori WATAHIKI, Junko ISOBE, Akina RAIJYOU, and Kazunori OISHI

目的：腸管出血性大腸菌（EHEC）感染症は、下痢、腹痛、血便などの症状のほか、時として溶血性尿毒症症候群（HUS）や脳症などの重篤症状を発症する疾患である。また、EHECは感染力が強く、大規模な食中毒や分散型広域食中毒（diffuse outbreak）、集団感染事例を引き起こす。このため、EHECの発生状況や広域流行株の把握は重要である。EHEC感染症は感染症法では三類感染症に位置づけられ、国内でのEHEC感染症の発生状況の迅速な把握が行われている。

2022年1月から12月までに富山県において発生したEHEC感染事例は15件、感染者は22名であった。これらの内訳は、EHEC O157感染事例が7件、10名、EHEC O26感染事例が1件、4名、EHEC O146感染事例が1件、2名、EHEC Og93感染事例が2件、2名、EHEC OgN-RK14、O103、O111感染事例がそれぞれ1件、1名、Og156・O115感染事例が1件、1名であった（表1）。

当所では県内で発生したEHEC感染症について分離株の収集・解析を行っている。以下に2022年の富山県におけるEHEC感染症の発生状況について、概要、疫学的解析結果を報告する。

材料と方法：2022年1月から12月までに富山県で発生したEHEC感染事例15件（表1）について届出数および分離株の解析を行った。

分離株のO血清群およびH血清型は市販抗血清（デンカ）を用いて型別した。市販抗血清で型別できない場合は既報の遺伝子型別を行った[1, 2]。遺伝子型別により決定したO血清群およびH血清型はそれぞれOg、Hgと記載した。

薬剤感受性試験は、13薬剤（ノルフロキサシン、ナリジクス酸、カナマイシン、ゲンタマイシ

ン、ホスホマイシン、アンピシリン、SXT合剤、テトラサイクリン、ストレプトマイシン、セファゾリン、クロラムフェニコール、セフトジジム、セフトキシム）について行った。CLSIのプロトコールに準拠し、Kirby-Bauer法に基づいたディスク法（センシ・ディスク、日本ベクトン・ディッキンソン）を用いた。

各事例の分離株について接着因子遺伝子 *eae*、ベロ毒素遺伝子 *stx1*, *stx2*、凝集付着性大腸菌耐熱性毒素遺伝子 *astA* のPCRによる検出を行った。

O157, O26, O111のmultiple-locus variable-number tandem-repeat analysis (MLVA) は当所で、O103のMLVAは国立感染症研究所で行った[3]。MLVAはゲノム上の17の標的遺伝子座にお

表1. 富山県腸管出血性大腸菌感染症発生状況(2022)

事例No	発生時期	感染者数 (名)	発生形態 (散発・集団)	大腸菌 血清型 ^{*1}	ベロ毒素遺伝子型
1	2022.4	2	集団	O157:H7	<i>stx1stx2</i>
2	2022.5	4	集団	O26:H11	<i>stx1</i>
3	2022.5	1	散発	O157:H7	<i>stx2</i>
4	2022.5	1	散発	OgN-RK14:H29	<i>stx2</i>
5	2022.6	2	集団	O157:H7	<i>stx2</i>
6	2022.6	2	集団	O157:H7	<i>stx2</i>
7	2022.7	2	集団	O146:Hg21	<i>stx1stx2</i>
8	2022.8	1	散発	O157:H7	<i>stx1stx2</i>
9	2022.8	1	散発	O157:Hg7	<i>stx2</i>
10	2022.8	1	散発	O103:H2	<i>stx1</i>
11	2022.8	1	散発	O157:H7	<i>stx1stx2</i>
12	2022.9	1	散発	Og93:Hg28	<i>stx2</i>
13	2022.10	1	散発	O111:Hg8	<i>stx1stx2</i>
14	2022.10	1	散発	Og93:H28	<i>stx2</i>
15	2022.11	1	散発	Og156:Hg25・ O115:H10	<i>stx1</i> , <i>stx2</i>

O157 7件(10名)、O26 1件(4名)、O146 1件(2名)、Og93 2件(2名)、OgN-RK14 1件(1名)、O103 1件(1名)、O111 1件(1名)、Og156・O115 1件(1名) 計15件(22名)

^{*1} 遺伝子型別により決定したO血清群、H血清型はそれぞれOg、Hgと表記した

ける繰り返し配列数（以降、反復配列数）の違いにより遺伝子型別を行う。得られたMLVAの各標的遺伝子座の反復配列数情報に基づいて国立感染症研究所で付与されたMLVA型（MLVA type）を示した。また、1遺伝子座の反復配列数のみ異なるMLVA型は遺伝子関連性があると判定し、これらの1遺伝子座のみ異なる複数のMLVA型をひとつの関連性のある一群、「コンプレックス」とし、コンプレックス型（MLVA comp）として標記した（表2）。また、互いに2つの遺伝子座の反復配列数が異なるMLVA型は関連する可能性を示し、3つ以上の遺伝子座の反復配列数が異なるMLVA型は遺伝的関連性がないと判定した[4]。

結果：

2022年におけるEHEC感染症発生状況：2022年の富山県におけるEHEC感染事例は散発事例が10件、集団事例が5件であった。このうち健康診断で探知された無症状病原体保有者は散発事例4件（表1 事例No. 12, 13, 14および15）および集団事例1件（表1 事例No.7）であった。また、事例No.8の接触者検便で、異なる血清型のEHECが偶然検出された無症状病原体保有者が1名報告された（表1 事例No.10）。事例数、感染者数はそれぞれ前年比0.94, 1.38（16件、16名）で、感染者数が微増した（表1）。事例数及び感染者数の月別動向を図1に示した。2022年は5月から8月にかけて事例数の66.7%（10件／15件）とEHEC感染症が多く発生した。感染者に対する有症者の割合は63.4%（14名／22名）であった。年代別の割合は10歳代および20歳代が、それぞれ22.7%（5名／22名）で、あわせて全体の約45%を占めていた（図2）。また、男女比は男性40.9%、女性59.1%で女性がやや多い傾向がみられた。

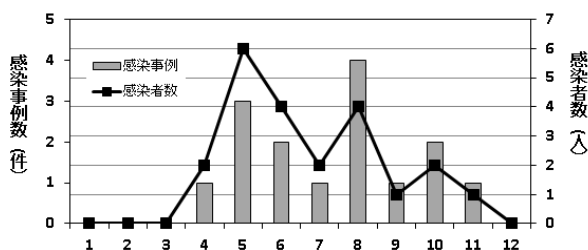


図1. 富山県における腸管出血性大腸菌感染症月別発生動向（2022）

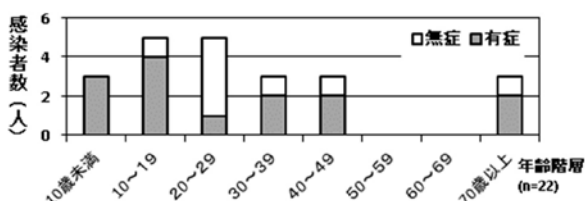


図1. 年齢別腸管出血性大腸菌感染症発生状況（2022）

分離株の薬剤感受性：表1の各事例の代表16株について、薬剤感受性試験を行った。供試菌株のうち、上述の13薬剤のいずれかに耐性を示したのは事例No.1および15の分離株（ストレプトマイシン）、No.4分離株（ストレプトマイシン、テトラサイクリン）、No.5および6の分離株（ストレプトマイシン、テトラサイクリン、SXT合剤、クロラムフェニコール）、No.13分離株（テトラサイクリン）の6株（37.5%）であった。

分離株の病原因子：ベロ毒素遺伝子型を表1に示した。stx1 stx2保有型が5株、stx2保有型が7株、stx1保有型が4株であった。事例No.4, 7, 12, 14および事例15の分離株O115 (stx1) はeaeを保有していなかった。また、重複感染事例No.15の分離株Og156はastA陽性であった。

表2. MLVAにおける各標的遺伝子座の反復配列数

O157		EH111-11	EH111-14	EH111-8	EH157-12	EH26-7	EHC-1	EHC-2	EHC-5	EHC-6	O157-3	O157-34	O157-9	O157-25	O157-17	O157-19	O157-36	O157-37	MLVAtype	MLVAcomp
事例No.	血清型																			
1	O157	2	-2	1	4	-2	5	4	13	-2	16	11	20	4	5	4	11	6	22m0090	22c013
3	O157	2	-2	1	4	-2	5	4	13	16	16	20	4	5	4	11	6/23	22m0091	22c013	
5	O157	2	-2	1	6	-2	7	5	-2	-2	8	10	10	6	4	8	11	7	22m0092	
6	O157	2	-2	1	6	-2	7	6	-2	-2	8	9	-2	5	4	7	9	5	21m0308	22c014
8	O157	2	-2	1	6	-2	7	6	-2	-2	7	9	-2	5	4	7	9	5	22m0104	22c014
9	O157	2	-2	1	4	-2	5	4	-2	-2	10	11	16	7	7	6	3	6	22m0238	22c032
11	O157	2	-2	1	4	-2	3	4	10	-2	11	12	8	5	7	5	5	7	22m0137	22c007
O26-O111		EH111-11	EH111-14	EH111-8	EH157-12	EH26-7	EHC-1	EHC-2	EHC-5	EHC-6	O157-3	O157-34	O157-9	O157-25	O157-17	O157-19	O157-36	O157-37	MLVAtype	MLVAcomp
2	O26	2	1	1	2	6	8	14	2	-2	-2	1	9	2	-2	1	-2	-2	21m2115	
13	O111	4	1	5	2	-2	19	9	-2	3	-2	3	8	2	-2	1	-2	5	22m3012	

O157, O26, O111のMLVAによる遺伝子型別：表2に2022年に県内で分離されたO157, O26およびO111の各事例分離株について、当所で取得したMLVAの各標的遺伝子座の反復配列数と、MLVA型(表2, MLVA type)およびコンプレックス型(表2, MLVA comp)を示した。

事例No.1ではMLVA型22m0090と22m0091が検出された(表2)。この2つのMLVA型は遺伝子座EHC-6の反復配列数が異なるMLVAコンプレックス型22c013であった。また、MLVA型22m0091の遺伝子座O157-37で2種類の反復配列数が検出されたため、表2に「/」をつけて該当する配列数を併記した。これは、標的遺伝子座が複数コピーあること等が原因となり、2種類の反復配列数が検出されたためであると考えられた。22m0091のO157-37の2種類の反復配列数のうち、反復配列数6は22m0090と一致していた。

事例No.6においても2つのMLVA型21m0308および22m0104が検出された。これらは遺伝子座O157-3の反復配列数のみが異なるMLVAコンプレックス型22c014であった。

また、事例No.10の分離株EHEC O103は国立感染症研究所で型別された。MLVA型は16m4003であった。

複数の感染事例で同一のMLVA型もしくはMLVAコンプレックスが検出された事例は、事例No.5および6(表2, MLVA型21m0308, MLVAコンプレックス22c014)であった。事例No.5および6は2022年6月に発生した感染事例であったが、事例間の関連性は不明であった。

国立感染症研究所のMLVAによる分子疫学サーベイランスの結果、2022年に全国5機関以上の地衛研等から検出された広域流行株のMLVA型またはMLVAコンプレックスは、18種類であった[5]。このうち、本県で検出された広域流行株のMLVA型および、MLVAコンプレックスは以下のとおりであった。

事例No.2のMLVA型21m2115は7県で5月から8月にかけて検出された。また、事例No.5および6のMLVAコンプレックス22c014は6県で1月と5月から7月にかけて検出された。事例No.11のMLVAコンプレックス22c007は1都5県で5月から8月にかけて検出された。

2022年に本県で検出されたMLVA型は、O157が8タイプ、O26・O111・O103がそれぞれ1タイプであった。他県のEHEC感染事例と同じMLVA型またはMLVAコンプレックスは、

O157で3種類(表1, 事例No. 5, 6, 8および11)、O26とO111でそれぞれ2種類(表1, 事例No. 2および13)が検出された(表2)。しかし、これらの事例について、他県の同じMLVA型またはMLVAコンプレックスが検出された感染事例との関連性は不明であった。

特記すべき事例の報告：2022年の感染事例のうち、上述の広域流行株以外の事例について以下に詳細を報告する。

県内で発生したEHEC OgN-RK14感染事例：2022年5月に市販の大腸菌O血清群抗血清に凝集せず、OUTと報告された感染事例が1件報告された(表1, 事例No.4)。この事例の分離株について、当所で整備されたPCRによるO血清群遺伝子型別[1]を実施したところ、遺伝子型不明であった。このため、国立感染症研究所においてさらに追加の新規O血清群の遺伝子型別を行った。その結果、分離株のO血清群はOgN-RK14であることが判明した[2]。

異なるO血清群のEHECが分離された感染事例：2022年11月にO血清群不明のEHECによる散発感染が1件報告された(表1, 事例No.15)。本事例では陰性化確認試験で、EHEC O115が検出された。当所でO血清群不明のEHECのO血清群遺伝子型別[1]を行った結果、Og156であった。以上から本事例では、Og156, O115の2種類のEHECが関与していたことが判明した。

考察：2022年のEHEC感染事例数およびEHEC感染者数は、15件、22名であり、新型コロナウイルス感染症流行前の2012年から2019年の本県の感染事例数および感染者数の平均値(19.1件、36.6名)の78.5%、60.1%であった(2021年は83.8%、43.7%)。2021年・2022年のEHEC感染事例数は新型コロナウイルス感染症流行前の平均値に対して約80%前後で推移しており、新型コロナウイルス感染症流行による事例数への大きな影響は認められなかった。これはEHEC感染が「EHECに汚染された食品の摂取」による場合が多く新型コロナウイルス感染症とは感染経路が異なることが影響していると考えられる。

また、2022年は、市販の大腸菌O血清群抗血清による型別ができないEHEC感染事例が4件発生した(表1, 事例No.4, 12, 14および15)。これらの新規もしくは市販血清では対応できないO血清群のEHECの検出はO血清群遺伝子の遺伝子型別で行うことができる。大腸菌のゲノム解析

の進展により、新しいO血清群遺伝子が追加されている[2]。本県で分離されたSTEC OgN-RK14は2019年に報告された新規のO血清群であり、国内外でヒト、ウシ、食品（牛肉、鶏肉）および環境（農場）などからの分離が報告されている[6, 7]。今後、これらの新規O血清群のSTECの検出報告が集積され、その分布およびヒトへの感染経路が解明されることが期待される。従って、地方衛生研究所など検査機関において、随時追加される新しいO血清群遺伝子型について情報収集し、O血清群遺伝子型別への対応が必要であると考えられる。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、ご協力頂きました県内の医療機関、厚生センター、富山市保健所、感染症対策課、生活衛生課の関係各位ならびに国立感染症研究所 伊豫田淳先生、泉谷秀昌先生に深く感謝致します。

文 献

1. Iguchi A, Iyoda S, Seto K, et al. (2015). J Clin Microbiol, 53, 2427-2432
2. Iguchi A, Nishii H, Seto K, et al. (2020). J Clin Microbiol, 58, e01493-20
3. Pei Y, Terajima J, Saito Y, et al. (2008). Jpn J Infect Dis, 61, 58-64
4. 石原朋子, 泉谷秀昌, 伊豫田淳, 他. (2014) 病原微生物検出情報, 35, 129-130
5. 泉谷秀昌, 李 謙一, 伊豫田淳, 他. (2023) 病原微生物検出情報, 44, 72-73
6. Lang C, Hiller M, Konrad R, et al. (2019) J Clin Microbiol, 57, e00768-19
7. Nguyen TTH, Iguchi A, Ohata R, et al. (2021). J Clin Microbiol, 59, e02624-20

富山県における浴槽水中のレジオネラ属菌の分離状況(2022年度)

金谷 潤一 磯部 順子 綿引 正則 木全 恵子
小坂 真紀 前西 絵美 大石 和徳

Isolation of *Legionella* Species from Public Bath Water in Toyama Prefecture in the Fiscal Year 2022

Jun-ichi KANATANI, Junko ISOBE, Masanori WATAHIKI, Keiko KIMATA,
Maki KOSAKA, Emi MAENISHI and Kazunori OISHI

目的：レジオネラ属菌は土壌や淡水などの自然環境に広く生息するが、近年は冷却塔、加湿器、循環式浴場など、人工的な水環境にも広く生息する。このレジオネラ属菌が肺胞マクロファージの中で増殖し、ヒトに経気道感染（レジオネラ症）を引き起こす。循環式入浴施設での集団感染事例が多く報告され、レジオネラ症と入浴施設は強く関連していることが明らかとなっている[1-3]。レジオネラ症の届出数は全国的に増加傾向を示し、2022年には暫定値で2,129件報告されている[4]。富山県のレジオネラ症罹患率（人口10万人当たりの患者発生数）は4.25（全国第1位）で、全国の罹患率1.69のおよそ2.5倍と高い状況が続いている。富山県では、レジオネラ症の発生予防に資することを目的として、おもな感染源となる入浴施設におけるレジオネラ属菌による汚染実態調査を継続している。ここでは2022年の結果を報告する。

材料と方法：材料と方法：2022年6月から2023年の1月にかけて、県内8施設から採取した浴槽水33検体、シャワー水8検体、カラン水8検体、計49検体を試料とした。採水は厚生センターおよび富山市保健所の担当者に依頼した。検体は採取後直ちにハイポ入り滅菌採水瓶に入れ、当日中または翌日（冷蔵保存）に当所へ搬入された。

検査は、令和元年9月19日付け薬生衛発0919第1号「公衆浴場における浴槽水等のレジオネラ属菌検査方法について」の「別添 公衆浴場における浴槽水等のレジオネラ属菌検査方法」を参考に実施した[5]。すなわち、検水500 mLをポリカーボネート製メンブランフィルター（直径47 mm, 0.22 μ m, 日本ミリポア）で吸引ろ過した。このフィルターを50 mL滅菌コニカルチューブに入れ5 mLの滅菌蒸留水を加え、ボルテックス

ミキサーで1分間攪拌し、100倍濃縮試料（未処理試料）とした。レジオネラ属菌以外の細菌（夾雑菌）の発育を抑制するために、濃縮試料のうち0.5 mLはpH2.2の0.2 M KCl-HCl（レジオネラ検体用前処理液、極東製薬工業）を等量加え5分間静置し、酸処理試料とした。また、0.5 mLは50℃で20分間処理し、加熱処理試料とした。酸処理試料は200 μ Lを、未処理試料および加熱処理試料は100 μ LをGVPC寒天培地（日水製薬）にコンラージ棒で全面に広げ、試料が吸収されるまで室温で静置した。菌数が多く、濃縮試料では菌数が測定できない場合も想定されるため、検体の原液（非濃縮検体）を用いて、濃縮試料と同様の培養（未処理のみ）も行なった。培地は乾燥しないよう湿潤箱に入れ、35℃で7日間培養した。培養3日目から実体顕微鏡を用いてレジオネラ属菌に特異的に見られるモザイク模様、カットガラス様の形態を斜光法[6]により平板上の発育菌で観察した。

レジオネラ属菌様のコロニーを血液寒天培地（BD）およびBCYE α 寒天培地（ジオメリュー）に再分離し、2日後にBCYE α 寒天培地のみに発育したコロニーをレジオネラ属菌とした。菌数は処理法に関わらず、最も多く発育した培地のコロニー数を浴槽水100 mLあたりに換算し、検出限界値となる10 CFU以上を陽性とした。

血清凝集試験のため、1検体あたり1～10個のBCYE α 寒天培地に発育した菌を用い、病原体検出マニュアルに従い、加熱抗原を作製した[7]。反応はレジオネラ免疫血清（デンカ）およびLegionella Latex Test Kit（オキソイド）を用いて実施した。

LAMP法による遺伝子検査のため、分離株を5%キレックス懸濁液（バイオラッド）に懸濁し、

100℃で10分間加熱処理を行い、遠心(15,000 rpm, 5分)して得られた上清をDNA溶液とした。Loopamp レジオネラ検出試薬キットE(栄研化学)を用い、濁度装置 Loopamp EXIA で判定した。本法は定量性がないため、定性試験として遺伝子の増幅が認められた場合、レジオネラ属菌陽性とした。

結果：レジオネラ属菌の検出状況を表1に示した。平板培養法では浴槽水の3検体、シャワー水の1検体、カラン水の5検体からレジオネラ属菌が検出された。検出率は、浴槽水が9.1%であったのに対し、シャワー水は25.0%、カラン水は62.5%であった。LAMP法による検出率は、浴槽水が45.5% (15/33検体)、シャワー水が62.5% (5/8検体) カラン水が75.0% (6/8検体) であり、例年と同様、平板培養法より高かった。

検出されたレジオネラ属菌の菌数を見ると、浴槽水は3検体全てが10～99 CFU/100 mLであったのに対し、カラン水の2検体では100～999 CFU/100 mL、シャワー水の1検体では1,000 CFU/100 mL以上であった(表2)。分離されたレジオネラ属菌の血清群別を実施した結果、浴槽水の2検体、カラン水の1検体からレジオネラ・ニューモフィラ血清群1が検出された(表3)。平板培養法とLAMP法の相関を見ると、全体の63.3% (31/49検体) の検体では、両方の結果が一致した(表4)。また、1検体は平板培養法陽性・LAMP法陰性であり、17検体は平板培養法陰性・LAMP法陽性であった。

考察：レジオネラ症の感染源は多様であるが、集団発生事例では、老人福祉施設でのポータブル加湿器(2017年)[8]や入浴施設(2019年)[9]が感染源・原因施設として報告されている。しかしながら、近年では大規模な台風や豪雨による水害が発生した被災地の泥などからもレジオネラ属菌が分離され[10]、そのような地域からの報告数が増加する傾向にある。幸い富山県ではこのような大規模な水害などは発生していないが、人口あたりの報告数は高い状況で推移している。富山県におけるレジオネラ症の感染源は、患者への聞き取り調査などからおよそ4割が入浴施設であろうと推定されるが、感染源の特定には至らない場合がほとんどである。このような背景のなか、これら4割の患者を減らすため、入浴施設のレジオネラ属菌の調査を継続し、施設の衛生管理を徹底するた

めの資料としている。

県内の浴槽水のレジオネラ属菌検出率は、培養法では9.1%であり、昨年度(3.3%)より高かった。浴槽水に加え、平成25年度からはシャワー水、昨年度からはカラン水のレジオネラ属菌検出率も調査している。今年度は、シャワー水の25.0%、カラン水の62.5%からもレジオネラ属菌が検出され、その値は浴槽水の検出よりも高かった。レジオネラ症は、レジオネラ属菌を含むエアロゾルを吸い込むことが原因で発症することから、エアロゾルが多く発生するシャワーの管理は特に重要である。遺伝子検査法は、全体的に平板培養法よりも陽性率が高かった。この理由として、死菌のDNAを検出している可能性が考えられた。また、培養法の検出下限値である10 CFU/100 mL未満のレジオネラ属菌が存在した可能性や、生きているが培養できない(viable but non-culturable, VNC)状態のレジオネラ属菌を検出している可能性も考えられた。検出されたレジオネラ属菌の血清群の内訳では、レジオネラ肺炎の原因菌の90%以上を占めるレジオネラ・ニューモフィラ血清群1が浴槽水とカラン水から検出された。このことから、レジオネラ症発生防止のためには、施設への指導が重要であると考えられた。

富山県では2016年3月にはレジオネラ症患者発生時における対応要領を制定するなど、入浴施設に対する行政指導を強化しているが、患者数は依然増加傾向を示しており、レジオネラ症対策の難しさを示している。コロナ禍が続くなかでも増加しているレジオネラ症の動向に注視しなければならない。本調査により、公衆浴場の水系にはレジオネラ属菌がある一定の割合で生息していることが明らかとなっている。県内の公衆浴場の汚染実態を明らかにするため、継続して監視する必要がある。また、入浴施設の利用以外の感染源の探索を含め、レジオネラ症感染防止対策について、更なる研究が必要であろう。

謝 辞

本研究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厚生センター、富山市保健所、生活衛生課の関係各位に心より感謝いたします。

なお、本研究は厚生労働科学研究費補助金「健康安全・危機管理対策総合研究事業」の一環として行った。

文 献

1. 岡田美香, 河野喜美子, 倉 文明, 他. (2005). 感染症学雑誌, 79, 365-374
2. Nakamura H., Yagyu H., Kishi K., et al. (2003). Intern Med, 42, 806-811
3. 平成 29 年度生活衛生関係技術担当者研修会. 2017 年に広島県内で発生したレジオネラ症集団感染事案について.
<https://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-10900000-Kenkoukyoku/0000194768.pdf?msckid=7f316ecbd0d011ecacef11c37956a6b8>
(2023 年 5 月 10 日アクセス可能)
4. 国立感染症研究所 IDWR 速報データ 2022 年第 52 週
<https://www.niid.go.jp/niid/ja/data/11740-idwr-sokuho-data-j-2252.html>
(2023 年 5 月 10 日アクセス可能)
5. 厚生労働省. 「公衆浴場における浴槽水等のレジオネラ属菌検査方法について」の「別添公衆浴場における浴槽水等のレジオネラ属菌検査方法」. 令和元年 9 月 19 日付け薬生衛発 0919 第 1 号
6. 森本 洋. (2010). 日本環境感染学会誌, 25, 8-14
7. 国立感染症研究所, 全国地方衛生研究所. 病原体検出マニュアル レジオネラ症 2020 年 9 月版
8. 厚生労働省. 加湿器を原因とした老人福祉施設でのレジオネラ症集団発生事例
<https://www.mhlw.go.jp/content/10900000/000483754.pdf>
(2023 年 5 月 10 日アクセス可能)
9. 厚生労働省. 静岡市内の入浴施設におけるレジオネラ症患者の集団発生について
<https://www.mhlw.go.jp/content/10900000/000590890.pdf>
(2023 年 5 月 10 日アクセス可能)
10. 国立感染症研究所. (2020). 病原微生物検出情報, 41, 210.
<https://www.niid.go.jp/niid/ja/legionella-m/legionella-iasrd/9972-489d01.html>
(2023 年 5 月 10 日アクセス可能)

表 1. 平板培養法および LAMP 法におけるレジオネラ属菌の検出結果

	陽性数/検体数 (%)			
	平板培養法		LAMP 法	
浴槽水	3/33	(9.1)	15/33	(45.5)
シャワー水	2/8	(25.0)	5/8	(62.5)
カラン水	5/8	(62.5)	6/8	(75.0)

表 2. 平板培養法によるレジオネラ属菌数

菌数 (CFU/100 mL)	検体数		
	浴槽水	シャワー水	カラン水
10未満	30	6	3
10~99	3	1	3
100~999	0	0	2
1,000以上	0	1	0
計	33	8	8

表 3. 分離菌の血清群別の検体数

		浴槽水	シャワー水	カラン水
レジオネラ・ ニューモフィラ	SG 1	2		1
	SG 5		1	1
	SG 6	1	1	2
	SG 7			1
	SG 13			1
その他の レジオネラ属菌			1	1

表 4. 平板培養法と LAMP 法との相関

		平板培養 (CFU/100 mL)		
		≥10	<10	計
LAMP	+	9	17	26
	-	1	22	23
		10	39	49

富山県におけるカルバペネム耐性腸内細菌目細菌感染症の患者発生動向と患者由来株の β -ラクタマーゼ遺伝子保有状況について(2022年)

小坂 真紀 綿引 正則 磯部 順子 木全 恵子
金谷 潤一 前西 絵美 大石 和徳

Surveillance of Carbapenem-resistant *Enterobacterales* Infectious Diseases and Detection of β -Lactamase Genes from the Isolates in Toyama Prefecture in 2022

Maki KOSAKA, Masanori WATAHIKI, Junko ISOBE, Keiko KIMATA,
Jun-ichi KANATANI, Emi MAENISHI, and Kazunori OISHI

目的：カルバペネム耐性腸内細菌目細菌(carbapenem-resistant *Enterobacterales*, CRE)感染症は、メロペネムなどのカルバペネム系薬剤及び広域 β -ラクタム剤に対して耐性を示す腸内細菌目細菌による感染症である。主に感染防御機能の低下した患者や外科手術後の患者、抗菌薬を長期にわたって使用している患者などに感染症を起こす。肺炎などの呼吸器感染症、尿路感染症、手術部位や皮膚・軟部組織の感染症、カテーテル関連血流感染症、敗血症、髄膜炎、その他多様な感染症を起こし、医療関連感染の原因となることもある。また、無症状で腸管等に保菌されることもある[1]。

国内では、2014年9月19日にCRE感染症が感染症法に基づく感染症発生動向調査の5類全数把握疾患に追加された。

2017年3月28日に、厚生労働省健康局結核感染症課長通知が発出され、地域における流行状況を把握するために、CRE感染症の届出があった際には地方衛生研究所等で耐性遺伝子等の試験検査が実施されることとなった。また、地域内の医療機関等への情報提供を行うとともに必要に応じた対策の実施が求められている[2]。

ここでは富山県における2022年の患者発生動向と、分離されたCREの β -ラクタム剤分解酵素である β -ラクタマーゼ遺伝子保有状況について報告する。

材料と方法：

1. CRE感染症届出数

富山県および全国の過去5年間のCRE感染症の届出数を集計した。あわせて2022年1～12月に県内の医療機関から報告されたCRE感染症に

ついて菌種別に集計した。

2. CREの β -ラクタマーゼ遺伝子保有状況

県内医療機関で分離され、当所に搬入されたCRE15株について調査した。腸内細菌目細菌のカルバペネム耐性化に最も寄与するカルバペネマーゼ遺伝子(IMP型、NDM型、VIM型、KPC型、OXA-48型、GES型)の検出はPCR法[3]により行った。また、カルバペネマーゼ遺伝子以外の β -ラクタマーゼ遺伝子(基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ(ESBL)遺伝子：TEM型、SHV型、CTX-M-1型、CTX-M-2型、CTX-M-8型、CTX-M-9型、及びAmpC β -ラクタマーゼ遺伝子：MOX型、CIT型、DHA型、ACC型、EBC型、FOX型)の保有状況についてもPCR法にて調査を行った[4, 5]。

結果と考察：

1. CRE感染症届出数

富山県及び全国の過去5年間のCRE感染症届出数を表1に示した。2022年は23件の届出であった。全国のCRE感染症届出数のうち、本県が占めるのは1%以下となっている。

菌種別では、*Klebsiella aerogenes*(旧名：*Enterobacter aerogenes*)が7株、*Enterobacter cloacae*が4株、*Enterobacter sp.*、*Escherichia coli*、*Serratia marcescens*が各2株、*Enterobacter cloacae* complex、*Morganella morganii*が各1株、菌種不詳が4株であった(表2)。

2. CREの β -ラクタマーゼ遺伝子保有状況

2022年に分離されたCRE菌株からは、カルバペネマーゼ遺伝子は検出されなかった。ESBL遺伝子は、CTX-M-9型及びTEM型が同時検出された*Enterobacter cloacae* 1株と、TEM型のみ検

表1. CRE 感染症の届出数 (2018～2022 年)

診断年	富山県	全 国
2018年	18	2,289
2019年	11	2,333
2020年	13	1,956
2021年	12	2,038
2022年	23	1,965

表2. 富山県における菌種別 CRE 感染症届出状況 (2022 年)

菌種	届出数(件)
<i>Klebsiella aerogenes</i>	7
<i>Enterobacter cloacae</i>	4
<i>Enterobacter</i> sp.	2
<i>Escherichia coli</i>	2
<i>Serratia marcescens</i>	2
<i>Enterobacter cloacae</i> complex	1
<i>Morganella morganii</i>	1
不詳	4
計	23

出された *Klebsiella aerogenes* 1 株の計 2 株で確認された。AmpC β -ラクタマーゼ遺伝子については、*Enterobacter cloacae* 2 株と *Enterobacter* sp. 1 株から EBC 型が検出された (表 3)。

CRE のカルバペネム耐性はカルバペネマーゼの産生、あるいは外膜タンパクの変化を伴った β -ラクタマーゼの産生量の増加による。上記の 5 株は ESBL や AmpC β -ラクタマーゼの産生に加え、膜の透過性低下によりカルバペネム耐性を呈したものと考えられた。

CRE の中でもカルバペネマーゼを産生する腸内細菌目細菌は、 β -ラクタム剤以外の抗菌薬に

耐性となる場合も多く、予後が悪いと報告されている [6]。また、カルバペネマーゼ遺伝子のほとんどがプラスミド上に存在していることが知られており、腸内細菌目の他の様々な菌種に容易に伝播し、CRE が国内に蔓延する可能性がある。そのため、今後も CRE の発生動向を注視し、カルバペネマーゼ遺伝子保有状況等の調査を継続していくことは公衆衛生上、また医療関連感染対策上重要である [1]。

謝 辞

本調査の実施にあたり、菌株収集等にご協力いただきました富山県医務課、富山県健康対策室感染症対策課および各厚生センター、富山市保健所、また、菌株を分与いただきました県内の医療機関の関係各位に深謝いたします。

文 献

1. 病原微生物検出情報 (2019). 40, 1-14
2. 厚生労働省健康局結核感染症課長通知「カルバペネム耐性腸内細菌科細菌 (CRE) 感染症にかかる試験検査の実施について」健感発 0328 第 4 号, 平成 29 年 3 月 28 日
3. Watahiki M, Kawahara R, Suzuki M, et al. (2020). Jpn J Infect Dis., 7, 166-72
4. Le QP, Ueda S, Nguyen TNH, et al. (2015) Foodborne Pathog Dis., 12, 719-725
5. Pérez-Pérez FJ, Hanson ND. (2002). J Clin Microbiol., 40, 2153-2162
6. 八木哲也, 松本あかね, 富田ゆうか 他. (2019). 病原微生物検出情報 40, 24-25

表 3. 富山県におけるCRE 患者分離株の β -ラクタマーゼ遺伝子検出状況 (2022 年)

菌種 (分離数)	カルバペネマーゼ遺伝子				
	IMP型	VIM型	NDM型	KPC型	OXA-48型
<i>Klebsiella aerogenes</i> (7) * ¹	0	0	0	0	0
<i>Enterobacter cloacae</i> (4)	0	0	0	0	0
<i>Enterobacter</i> sp. (2) * ¹	0	0	0	0	0
<i>Escherichia coli</i> (2) * ²	- * ³	-	-	-	-
<i>Serratia marcescens</i> (2) * ¹	0	0	0	0	0
<i>Enterobacter cloacae</i> complex (1)	0	0	0	0	0
<i>Morganella morganii</i> (1)	0	0	0	0	0
不詳 (4) * ¹	0	0	0	0	0

菌種 (分離数)	基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ (ESBL) 遺伝子				
	TEM型	SHV型	CTX-M-1型	CTX-M-2型	CTX-M-9型
<i>Klebsiella aerogenes</i> (7) * ¹	1	0	0	0	0
<i>Enterobacter cloacae</i> (4)	1 * ⁴	0	0	0	1 * ⁴
<i>Enterobacter</i> sp. (2) * ¹	0	0	0	0	0
<i>Escherichia coli</i> (2) * ²	- * ³	-	-	-	-
<i>Serratia marcescens</i> (2) * ¹	0	0	0	0	0
<i>Enterobacter cloacae</i> complex (1)	0	0	0	0	0
<i>Morganella morganii</i> (1)	0	0	0	0	0
不詳 (4) * ¹	0	0	0	0	0

菌種 (分離数)	AmpC β -ラクタマーゼ遺伝子					
	MOX型	CIT型	DHA型	ACC型	EBC型	FOX型
<i>Klebsiella aerogenes</i> (7) * ¹	0	0	0	0	0	0
<i>Enterobacter cloacae</i> (4)	0	0	0	0	2	0
<i>Enterobacter</i> sp. (2) * ¹	0	0	0	0	1	0
<i>Escherichia coli</i> (2) * ²	- * ³	-	-	-	-	-
<i>Serratia marcescens</i> (2) * ¹	0	0	0	0	0	0
<i>Enterobacter cloacae</i> complex (1)	0	0	0	0	0	0
<i>Morganella morganii</i> (1)	0	0	0	0	0	0
不詳 (4) * ¹	0	0	0	0	0	0

*¹) 未搬入株含む ; *²) 未搬入 ; *³) -, 未実施 ; *⁴) 同時検出

富山県における 2022 年の病原微生物検出情報

磯部 順子 前西 絵美 綿引 正則 小坂 真紀
金谷 潤一 木全 恵子 大石 和徳

Pathogenic Bacteria Isolated in Toyama Prefecture in 2022

Junko ISOBE, Emi MAENISHI, Masanori WATAHIKI, Maki KOSAKA
Jun-ichi KANATANI, Keiko KIMATA, and Kazunori OISHI

目的：当所では県内 10 か所の公的病院，4 か所の富山県厚生センター，富山市保健所，衛生研究所を定点として病原細菌の検出情報を収集し，県内での感染症の動向監視の一助としている。

結果：2022 年 1 月から 12 月までの検出情報を菌種別（図 1）および材料別（表 1，2）に集計した。病院で分離された *Staphylococcus aureus* については，methicillin - resistant *S. aureus* (MRSA) の割合（表 3）を求めた。

全体の分離菌（15,990 株）は昨年の 15,795 株に比べると 101.2% と増加傾向を示した。詳細をみる

と，菌種別では *Escherichia coli* が分離数 4,639 株（29.0%）でもっとも多かった。次いで，*S. aureus* が 2,847 株（17.8%），コアグラーゼ陰性 *S. aureus* 1,630 株（10.2 %），*Klebsiella pneumoniae* が 1,257 株（7.8 %），*Pseudomonas aeruginosa* が 1,239 株（7.8%）で，上位 5 菌種は昨年と同じであった。

分離菌を検出材料別（表 1）に見ると，尿から 7,446 株（46.6%）と最も多く，続いて喀痰，気管吸引液および下気道の材料から 3,666 株（22.9%），血液から 2,546 株（15.9%）の順であった。これらの材料からの分離菌で全体の 85.3% を

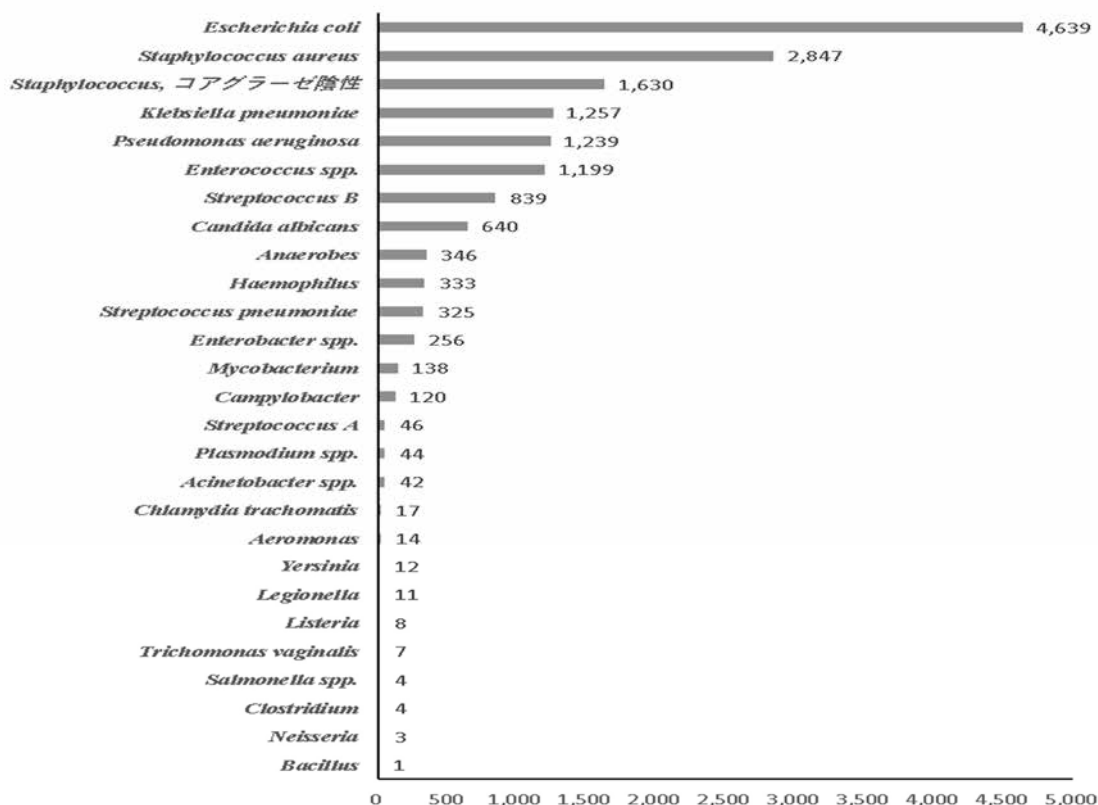


図 1. 菌種別病原細菌分離状況（2022）

表 1. 材料別病原細菌分離状況 (医療機関)

分離材料	分離菌数	割合 (%)
尿	7,446	46.6
喀痰、気管吸引液および下気道の材料	3,666	22.9
血液	2,546	15.9
陰部尿道頸管擦過 (分泌) 物	1,046	6.5
糞便	549	3.4
穿刺液 (胸水、腹水、関節液など)	404	2.5
咽頭および鼻咽喉からの材料	332	2.1
髄液	1	0.01
合計	15,990	100.0

占めた。この傾向は昨年と同様であった。

以下に材料別の分離状況について報告する。

糞便：分離菌数は医療機関からの報告が549株で、これに保健所・地衛研からの報告(表2-1)の *Legionella pneumophila* 以外の23株を含め計572株(前年比90.1%)であった。最も多かったのはMRSA 96株を含む *S. aureus* 226株で、前年の85.3%であった。次に多かったのは *E. coli* (EPEC) 130株で、前年の172株のおよそ78.5%であった。*E. coli* 腸管出血性 (EHEC/VTEC) は医療機関から7株、保健所・地衛研から16株が分離され、その内訳は血清群 O157 が10株、O26 が4株、Og93, O146 が各2株、O103, O111, O115, Og156, OgN-RK14 が各1株であった(データ未掲載)。*Campylobacter* は117株で前年の91.4%であった。2019年までもっとも多く分離された *E. coli* の分離数が2020年から著しく減少し、その傾向が続いている。

穿刺液：分離菌数は404株で前年の109.8%であった。穿刺液からの分離菌数は2017年からの増加傾向は継続中である。*E. coli*, コアグラールゼ陰性 *S. aureus* およびMRSA 以外の *S. aureus* な

どが多く分離された。

髄液：分離菌数はMRSA 以外の *S. aureus* 1株のみの報告であった。

血液：分離菌数は2,546株、前年の102.9%であった。*E. coli* (961株), コアグラールゼ陰性 *S. aureus* (865株), *S. aureus* (MRSA 以外) (249株), MRSA (154株) が多く、これら3菌種で87.5%を占めた。

咽頭および鼻咽喉：分離菌数は332株で前年のおよそ半数(47.6%)であった。分離されたのは *Streptococcus pneumoniae* (148株), *Haemophilus influenzae* (141株) で87.0%を占めた。

喀痰、気管吸引液および下気道：分離菌数は3,666で昨年比109.3%であった。*S. aureus* が1,749株(MRSA 841株, それ以外の *S. aureus* 908株) でもっとも多く、*Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* など多く分離された。

尿：分離菌数は7,446株で前年の104.9%であった。*E. coli* の分離菌数(3,459株) がもっとも多く、尿からの分離菌のおよそ半数(47.6%)を占めた。*Enterococcus spp.*, コアグラールゼ陰性 *Staphylococcus*, *K. pneumoniae* など多く分離された。

陰部尿道頸管擦過 (分泌) 物：分離菌数は1,046株、昨年比89.8%で、昨年同様 *Streptococcus B*, *Candida albicans* が多かった。

謝 辞

県内10か所の公的病院と4か所の富山県厚生センター、富山市保健所の検査担当各位に感謝いたします。

表2. 月別・菌種別病原微生物検出状況

1) 保健所・地衛研からの分離菌

菌種・群・型	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	合計
<i>Escherichia coli</i> 腸管出血性 (EHEC/VTEC)	0	0	0	1	4	3	2	1	1	2	2	0	16
<i>Salmonella</i> O4 Stanley	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
<i>Salmonella</i> O7 Othmarschen	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
<i>Salmonella</i> O8 Yovokome	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>Salmonella</i> O9 Not typed	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
<i>Campylobacter jejuni</i>	2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	3
<i>Legionella pneumophila</i>	2	0	0	0	2	1	1	0	1	0	0	1	8
合計	4	0	1	1	6	5	3	1	2	4	3	1	31

2) 医療機関からの分離菌

① 分離材料：糞便

菌種・群・型	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	合計
<i>Escherichia coli</i> 腸管出血性 (EHEC/VTEC)	0	0	0	1	2	1	0	3	0	0	0	0	7
<i>Escherichia coli</i> 病原大腸菌血清型 (EPEC)	12	8	5	11	12	9	9	7	16	21	10	10	130
<i>Escherichia coli</i> 他の下痢原性	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	2
<i>Salmonella</i> O4	2	2	2	1	0	0	1	1	1	2	3	2	17
<i>Salmonella</i> O7	0	0	0	0	4	2	0	0	0	0	2	3	11
<i>Salmonella</i> O8	0	0	0	0	0	0	0	3	1	0	0	0	4
<i>Salmonella</i> O9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
<i>Salmonella</i> O3,10	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
<i>Salmonella</i> O13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
<i>Salmonella</i> 群不明	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>Yersinia enterocolitica</i>	0	0	2	0	1	1	1	3	2	1	0	0	11
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>Aeromonas hydrophila</i>	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	3
<i>Aeromonas sobria</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
<i>Aeromonas hydrophila/sobria</i> 種別せず	0	1	0	2	2	0	1	2	0	0	1	1	10
<i>Campylobacter jejuni</i>	3	2	2	7	5	3	7	0	6	3	7	1	46
<i>Campylobacter coli</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	3
<i>Campylobacter jejuni/coli</i> 種別せず	9	2	5	7	4	3	10	6	5	2	10	5	68
MRSA	5	5	5	8	10	7	6	10	8	14	6	12	96
<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA以外)	11	7	7	9	11	14	12	8	14	15	15	7	130
<i>Clostridium perfringens</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	4
<i>Bacillus cereus</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
合計	43	29	29	47	53	41	48	44	56	60	55	44	549

② 分離材料：穿刺液（胸水、腹水、関節液など）

菌種・群・型	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	合計
<i>Escherichia coli</i>	8	3	2	5	3	7	8	6	5	6	6	5	64
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	3	4	3	3	3	3	6	1	1	3	1	32
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2	1	3	1	1	5	2	2	4	9	3	3	36
MRSA	1	0	2	2	0	2	3	3	3	3	1	2	22
<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA以外)	3	2	2	5	4	5	8	4	8	5	3	2	51
<i>Staphylococcus</i> コアグラゼ陰性	2	3	8	1	6	8	3	8	4	4	9	7	63
<i>Streptococcus pneumoniae</i> (PRSP/PISP以外)	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
<i>Anaerobes</i>	10	6	7	11	8	17	11	11	10	20	11	13	135
合計	27	18	28	28	25	47	38	40	36	48	36	33	404

③ 分離材料：髄液

菌種・群・型	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	合計
<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA以外)	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
合計	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1

④ 分離材料：血液

菌種・群・型	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	合計
<i>Escherichia coli</i>	82	63	81	79	73	83	97	81	87	86	76	73	961
<i>Salmonella spp.</i>	1	0	0	0	1	0	0	2	0	0	0	0	4
<i>Haemophilus influenzae</i>	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	5
<i>Listeria monocytogenes</i>	3	0	2	0	1	1	0	0	0	1	0	0	8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5	5	2	2	3	5	10	10	7	4	9	7	69
MRSA	6	11	10	15	9	10	11	18	13	12	20	19	154
<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA以外)	25	26	14	24	18	19	14	22	25	15	22	25	249
<i>Staphylococcus</i> , コアグラールゼ陰性	63	50	68	46	78	52	85	92	89	83	88	71	865
<i>Streptococcus B</i>	6	2	7	5	5	3	3	3	5	5	1	3	48
PRSP/PISP	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
<i>Streptococcus pneumoniae</i> (PRSP/PISP以外)	0	1	1	3	1	0	0	3	0	1	1	3	14
<i>Anaerobes</i>	26	17	14	16	10	8	18	14	20	9	11	5	168
合計	218	175	199	191	200	182	240	245	246	216	228	206	2,546

⑤ 分離材料：咽頭および鼻咽頭からの材料

菌種・群・型	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	合計
<i>Haemophilus influenzae</i>	26	17	15	11	4	6	4	5	1	8	16	28	141
<i>Streptococcus A</i> 型別せず	3	2	3	2	7	3	2	1	0	1	4	1	29
PRSP/PISP	0	0	0	0	1	2	1	2	0	1	4	3	14
<i>Streptococcus pneumoniae</i> (PRSP/PISP以外)	18	16	15	5	17	12	5	7	7	12	17	17	148
合計	47	35	33	18	29	23	12	15	8	22	41	49	332

⑥ 分離材料：喀痰、気管吸引液および下気道の材料

菌種・群・型	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	合計
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	3	0	2	2	3	2	2	4	1	5	3	0	27
<i>Mycobacterium avium - intracellulare complex</i>	8	7	4	10	11	11	12	11	8	14	7	8	111
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	50	26	46	46	46	41	41	52	52	48	48	51	547
<i>Haemophilus influenzae</i>	15	15	17	15	14	10	16	14	7	13	27	24	187
<i>Legionella pneumophila</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	40	40	49	34	45	45	57	53	77	59	64	61	624
MRSA	62	73	75	59	58	52	69	72	78	73	87	83	841
<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA以外)	82	80	75	62	61	73	73	87	94	68	74	79	908
<i>Streptococcus A</i> 型別せず	2	2	2	1	1	0	1	3	2	2	0	1	17
<i>Streptococcus B</i>	20	18	24	20	13	12	10	12	26	18	22	12	207
PRSP/PISP	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	3	0	6
<i>Streptococcus pneumoniae</i> (PRSP/PISP以外)	10	16	11	13	12	11	6	8	7	14	23	10	141
<i>Anaerobes</i>	9	6	7	2	1	1	2	5	4	0	4	6	47
合計	301	283	312	265	265	259	291	321	356	315	363	335	3,666

⑦ 分離材料：尿

菌種・群・型	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	合計
<i>Escherichia coli</i>	275	242	303	282	296	273	286	315	304	300	291	292	3,459
<i>Enterobacter spp.</i>	18	17	27	15	9	18	25	28	26	29	26	18	256
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	54	49	65	46	54	53	62	43	55	72	56	64	678
<i>Acinetobacter spp.</i>	1	0	2	1	5	9	3	6	7	2	3	3	42
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	25	27	32	28	34	53	57	45	51	48	50	60	510
MRSA	14	14	15	21	20	13	14	13	15	18	14	17	188
<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA以外)	20	13	12	28	16	20	21	8	27	12	16	14	207
<i>Staphylococcus</i> , コアグラールゼ陰性	58	37	55	55	56	49	63	77	71	64	64	53	702
<i>Enterococcus spp.</i>	84	94	114	102	110	89	104	105	91	99	102	105	1,199
<i>Candida albicans</i>	9	14	20	15	18	16	17	35	16	15	15	15	205
合計	558	507	645	593	618	593	652	680	663	659	637	641	7,446

⑧ 分離材料：陰部尿道頸管擦過（分泌）物

菌種・群・型	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	合計
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	3
<i>Streptococcus B</i>	55	44	40	51	43	56	37	55	53	53	43	54	584
<i>Chlamydia trachomatis</i>	1	2	1	1	6	2	0	0	3	0	0	1	17
<i>Candida albicans</i>	33	34	33	33	38	31	34	37	45	38	41	38	435
<i>Trichomonas vaginalis</i>	0	0	0	0	0	7	0	0	0	0	0	0	7
合計	89	80	74	86	88	96	71	92	102	91	84	93	1,046

表3. 材料別の *Staphylococcus aureus* の内訳 (医療機関分離株)

		1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	合計
糞便	MRSA	5	5	5	8	10	7	6	10	8	14	6	12	96
	MRSA以外	11	7	7	9	11	14	12	8	14	15	15	7	130
	合計	16	12	12	17	21	21	18	18	22	29	21	19	226
穿刺液	MRSA	1	0	2	2	0	2	3	3	3	3	1	2	22
	MRSA以外	3	2	2	5	4	5	8	4	8	5	3	2	51
	コアグラーゼ陰性	2	3	8	1	6	8	3	8	4	4	9	7	63
	合計	6	5	12	8	10	15	14	15	15	12	13	11	136
髄液	MRSA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	MRSA以外	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	合計	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
血液	MRSA	6	11	10	15	9	10	11	18	13	12	20	19	154
	MRSA以外	25	26	14	24	18	19	14	22	25	15	22	25	249
	コアグラーゼ陰性	63	50	68	46	78	52	85	92	89	83	88	71	865
	合計	94	87	92	85	105	81	110	132	38	27	42	44	937
喀痰	MRSA	62	73	75	59	58	52	69	72	78	73	87	83	841
	MSSA	82	80	75	62	61	73	73	87	94	68	74	79	908
	合計	144	153	150	121	119	125	142	159	172	141	161	162	1,749
尿	MRSA	14	14	15	21	20	13	14	13	15	18	14	17	188
	MRSA以外	20	13	12	28	16	20	21	8	27	12	16	14	207
	コアグラーゼ陰性	58	37	55	55	56	49	63	77	71	64	64	53	702
	合計	92	64	82	104	92	82	98	98	113	94	94	84	1,097

富山県内で分離された溶レン菌の血清型および薬剤感受性 (2022年)

磯部 順子 前西 絵美 綿引 正則 小坂 真紀
金谷 潤一 木全 恵子 柴山 直美¹ 野口 範子¹
堀江 妙子¹ 竹島 亜実¹ 池辺 忠義² 大石 和徳

Serotypes and Antibiotic Susceptibilities of Clinical Hemolytic Streptococcal Isolates in Toyama Prefecture in 2022

Junko ISOBE, Emi MAENISHI, Masanori WATAHIKI, Maki KOSAKA,
Jun-ichi KANATANI, Keiko KIMATA, Naomi SHIBAYAMA, Noriko NOGUCHI,
Taeko HORIE, Ami TAKESHIMA, Tadayoshi IKEBE, and Kazunori OISHI

目的：A群溶血性レンサ球菌（溶レン菌）は、急性咽頭炎、扁桃炎、膿痂疹など様々な感染症を引き起こすだけでなく、時には進行が早く、致死率の高い劇症型の疾患を引き起こすことが知られている。感染症法では、本菌による咽頭炎は5類感染症小児科定点把握疾患に、また、劇症型溶レン菌感染症は、5類感染症全数報告疾患に位置付けられる。全国の劇症型溶レン菌感染症の患者から分離され、レファレンスセンターで検査された溶レン菌は、昨年に続きA群（59株）よりG群（116株）が多かった。しかしながら、劇症型となる要因や発生機序は未だ明らかではないため、流行株の調査を実施することは重要である。

当所では、衛生微生物技術協議会溶レン菌レファレンスセンターの東海・北陸支部センターとして、A群溶レン菌の血清型別や劇症型溶レン菌感染症由来株の収集および疫学調査を実施している。ここでは、2022年に富山県内で分離されたA群溶レン菌の血清型別結果および劇症型溶レン菌感染症の病原体サーベイランス結果について報告する。

材料と方法：

(1) 感染症発生動向調査による患者数

2022年1～12月に富山県で報告されたA群溶レン菌咽頭炎および劇症型溶レン菌感染症の届出数を集計した。

(2) A群溶レン菌の血清型別

供試菌株は、2022年に富山県内の1医療機関で患者から分離されたA群溶レン菌9株について、

T血清型別を実施した。型別は「T型別用免疫血清」（デンカ）を用いてスライド凝集反応にて行った。

(3) 劇症型溶レン菌感染症患者分離株の病原体サーベイランス

2022年に富山県内で届出された劇症型溶レン菌感染症は21件であった。これらのうち、収集された9株について、群別、T血清型別、菌種同定、emm遺伝子型別、薬剤感受性試験を実施した。群別試験は、「ストレプトLA NX」（デンカ）を用いた。T血清型別は、上記の(2)A群溶レン菌の血清型別と同様に行った。菌種同定は、「API 20 STREP」（バイオメリュー）を用いた。emm遺伝子型別および薬剤感受性試験は、国立感染症研究所細菌第一部にて実施した。調べた薬剤は、ペニシリンG (PCG)、アンピシリン (ABPC)、セファゾリン (CEZ)、セフトキシム (CTX)、メロペネム (MEPM)、バンコマイシン (VCM)、ダプトマイシン (DAP)、エリスロマイシン (EM)、クリンダマイシン (CLDM)、EM/CLDM、リネゾリド (LZD)、シプロフロキサシン (CPFX)、ミノサイクリン (MINO) の13薬剤である。

結果と考察：

(1) 感染症発生動向調査による患者数

富山県における2022年のA群溶レン菌咽頭炎の患者報告数は515人（定点あたり17.76人）で、定点報告数をこれまでと比較すると、2021年の38.71人に比べ45.9%、COVID-19流行前の2019

1. 富山市民病院, 2. 国立感染症研究所細菌第一部

年の115.1人に比べると15.4%と大きく減少した[1]。COVID-19に対する感染対策が少なからず影響したものと考えられるが、理由は明らかではない。

一方、2022年の劇症型溶レン菌感染症の患者報告数は21人で、2018年の20人を超え、この6年間でもっとも多かった(図1)。今後、報告数の推移について、監視が必要である。

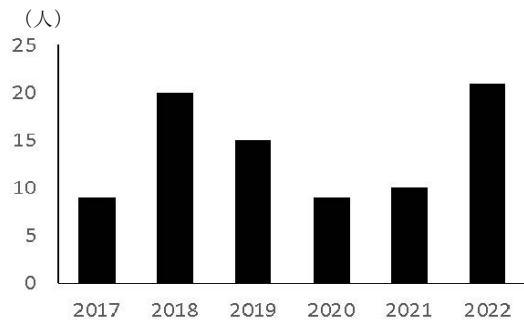


図1. 劇症型溶血性レンサ球菌感染症患者報告数の推移(富山県)

(2) A群溶レン菌のT血清型別

2022年に収集されたA群溶レン菌9株で、うち6株は1～4月に分離された。9株のT血清型は1株がT-3型であったが、これ以外の8株はすべて型別不能(UT)であった。このUT株は、2016年には分離割合は6.7%であったのに対し、2020年は57.1%、2021年は100%と増加傾向を示し、本年も88.9%と高い割合が継続中である(図2)。これらUT株について、1クローンが県内に広がっている可能性など、更なる解析が必要である。全国ではT-1型の分離割合が17%程度と高いが、富山県では、2020～2022年の3年間にT-1に型別された株は認められなかった。

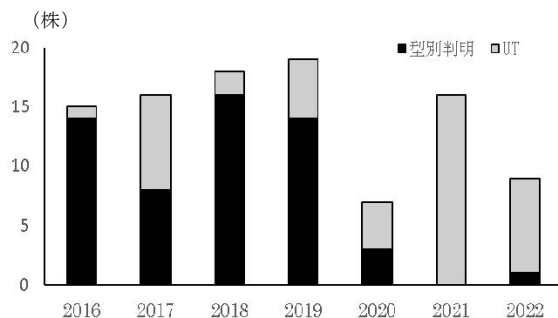


図2. A群溶血性レンサ球菌のT血清型別結果(富山県)

(3) 劇症型溶レン菌感染症患者分離株の病原体サーベイランス

収集した劇症型溶レン菌感染症患者から分離された溶レン菌9株について、検査結果を表1に示した。血清群別の結果、6株(66.7%)がA群で、2株はG群、1株がB群であった。A群6株はすべてが*S. pyogenes*でT型、M型共に型別不能(UT)、*emm*81.0型であった。G群は2株ともに*S. dysgalactiae subsp. equisimilis*で、*emm*型は*stG6792.3*および*stG840.0*であった。

薬剤感受性については、MINO耐性が7株で、うち1株はEM、CLDM耐性も示した。2020年には2/7株(28.6%)に耐性が見られただけであったが、2021年には8/11株(72.7%)、2022年は7/9株(77.8%)に何らかの薬剤に耐性を示していることから、今後、耐性率の動向に注目したい。

謝 辞

本調査の実施にあたり、菌株を分与いただきました県内医療機関の関係各位に深謝いたします。また、菌株の収集にご協力いただきました県内厚生センター、富山市保健所に深謝いたします。

文 献

1. 国立感染症研究所 IDWR 速報データ 2022 第52週
<https://www.niid.go.jp/niid/ja/data/11740-idwr-sokuho-data-j-2252.html>
 (2023年5月30日アクセス可能)

表 1. 劇症型溶血性レンサ球菌感染症患者からの分離菌の解析結果 (2022 富山県)

	発症年月	性別	年代	菌種	血清型別			emm遺伝子型	spe	薬剤感受性
					群	T血清	M血清			
1	2022年2月	男	80	<i>S.pyogenes</i>	A	UT	UT	emm81.0	B,F	MINO耐性
2	2022年3月	男	60	<i>S.pyogenes</i>	A	UT	UT	emm81.0	B,F	MINO耐性
3	2022年3月	男	60	<i>S.pyogenes</i>	A	UT	UT	emm81.0	B,F	MINO耐性
4	2022年5月	男	80	<i>S.pyogenes</i>	A	UT	UT	emm81.0	B,F	MINO耐性
5	2022年5月	男	80	<i>S.agalactiae</i>	B	l	b			EM,CLDM,MINO耐性
6	2022年8月	男	70	<i>S.dysgalactiae subsp equisimilis</i>	G			stG6792.3		
7	2022年10月	男	80	<i>S.pyogenes</i>	A	UT	UT	emm81.0	B,F	
8	2022年10月	男	80	<i>S.pyogenes</i>	A	UT	UT	emm81.0	B,F	MINO耐性
9	2022年10月	男	80	<i>S.dysgalactiae subsp equisimilis</i>	G			stG840.0		MINO耐性

令和4年度富山県食品衛生検査の精度管理調査(2022年度) －微生物学的検査－

金谷 潤一 綿引 正則 磯部 順子 小坂 真紀
前西 絵美 木全 恵子 大石 和徳

Quality Control of the Bacterial Testing of Foods for Good Laboratory Practice in Toyama Prefecture in the Fiscal Year 2022

Jun-ichi KANATANI, Masanori WATAHIKI, Junko ISOBE, Maki KOSAKA,
Emi MAENISHI, Keiko KIMATA, and Kazunori OISHI

目的：本県では、富山県食品衛生検査業務管理要綱に基づき、平成11年から県内の食品衛生検査機関に対して検査水準の維持、向上を目的として精度管理調査を実施している[1]。本年の微生物学的検査の精度管理調査は、牛乳中に添加した生菌数測定および模擬食品（加熱食肉製品 加熱殺菌後包装）中の大腸菌検査（成分規格 陰性）とした。検査用試料は、衛生研究所で調製後、各検査機関に配布し、各々の検査結果の報告を集計・解析した。

材料と方法：新川厚生センター、中部厚生センター、高岡厚生センター、砺波厚生センター、食肉検査所および衛生研究所の6機関を対象とし、令和5年1月24日～令和5年2月9日に実施した。

生菌数測定用の検体（牛乳10 ml）は、2検体の菌数がそれぞれ 1.3×10^4 CFU/ml（牛乳A）、 1.3×10^3 CFU/ml（牛乳B）となるよう枯草菌（栄研化学）を調製し、市販品牛乳（常温保存可）に添加し作製した。なお、牛乳原液の生菌数は0 CFU/mlであった。菌数測定は各機関の検査実施標準作業書（SOP）に準拠して行うこととした。各機関で測定した値を用いて、標準偏差（SD）、変動係数、標準測定（Zスコア）を算出した。Zスコアは、「 $Z = (\text{測定値} - \text{測定値平均}) / \text{測定値標準偏差}$ 」の計算式で求められ、その絶対値によって各機関の測定した値を評価できる。判断基準は、 $|Z| \leq 2$ のとき「良好」、 $2 < |Z| < 3$ のとき「改善が必要かどうかの検討必要」、 $3 \leq |Z|$ のとき「改善措置を要する」となっている。

大腸菌検査用の模擬食品は、市販のコンビーフに大腸菌およびアルベルティイ菌の培養液を表1

の通り接種して作製した。なお、コンビーフから大腸菌は検出されなかった。検査法は、各機関の検査実施標準作業書（SOP）に準拠して行うこととした。

結果：牛乳中の生菌数は表2に示した。牛乳Aについては、報告された測定値（各機関の実測値2回を平均した値）の平均は 1.23×10^4 CFU/ml、最大値 1.48×10^4 CFU/ml、最小値 1.02×10^4 CFU/mlであった。SDは1498.0となり、すべて平均値 $\pm 2SD$ ($9.25 \times 10^3 \sim 1.52 \times 10^4$) の範囲内であった。Zスコアの絶対値もすべて2以下で、ばらつき度合いは良好と判断された。実測値のZスコアの絶対値もすべて2以下で、ばらつき度合いは良好と判断された。

牛乳Bについては、報告された測定値の平均は 1.35×10^3 CFU/ml、最大値 1.48×10^3 CFU/ml、最小値 1.25×10^3 CFU/mlであった。SDは85.4となり、すべて平均値 $\pm 2SD$ ($1.18 \times 10^3 \sim 1.52 \times 10^3$) の範囲内であった。Zスコアの絶対値もすべて2以下で、ばらつき度合いは良好と判断された。実測値のZスコアの絶対値もすべて2以下で、ばらつき度合いは良好と判断された。

平成30～令和4年度において、生菌数の測定値および実測値のZスコアを示した（図1, 2）。測定値については、機関No. 2の1回の値が $2 < |Z| < 3$ であった。実測値については、機関No. 1の1回の値、機関No. 2の1回の値、機関No. 6の1回の値が $2 < |Z| < 3$ であった。

大腸菌検査については、すべての機関が食品Cから大腸菌を検出できた。一方、乳糖非発酵であるアルベルティイ菌を接種した食品Dからは、すべての機関で大腸菌は検出されなかった（表3）。

表 1. 模擬食品における添加細菌と菌数

試料名	添加細菌	菌数
模擬食品 C	大腸菌	約 7.6×10^4 CFU/g
模擬食品 D	アルベルティイ菌	約 9.2×10^4 CFU/g

表 2. 牛乳中の生菌数

A. 牛乳A

機関名	報告値	測定値			実測値		
			偏差	Zスコア		偏差	Zスコア
No. 1	1.22×10^4	12200	-50.0	-0.03	12300	50.0	0.03
					12100	-150.0	-0.10
No. 2	1.48×10^4	14750	2500.0	1.67	15200	2950.0	1.98
					14300	2050.0	1.38
No. 3	1.15×10^4	11450	-800.0	-0.53	11100	-1150.0	-0.77
					11800	-450.0	-0.30
No. 4	1.23×10^4	12300	50.0	0.03	12500	250.0	0.17
					12100	-150.0	-0.10
No. 5	1.26×10^4	12600	350.0	0.23	12300	50.0	0.03
					12900	650.0	0.44
No. 6	1.02×10^4	10200	-2050.0	-1.37	10900	-1350.0	-0.91
					9500	-2750.0	-1.85
平均値 ($\bar{X}$)	1.23×10^4	12250.0			12250.0		
標準偏差 (SD)		1498.0			1487.8		
X+2SD		15246.0			15225.7		
X-2SD		9254.0			9274.3		

B. 牛乳B

機関名	報告値	測定値			実測値		
			偏差	Zスコア		偏差	Zスコア
No. 1	1.36×10^3	1355	5.0	0.06	1320	-22.5	-0.26
					1390	47.5	0.54
No. 2	1.48×10^3	1475	125.0	1.46	1460	117.5	1.34
					1490	147.5	1.68
No. 3	1.36×10^3	1360	10.0	0.12	1330	-12.5	-0.14
					1390	47.5	0.54
No. 4	1.27×10^3	1265	-85.0	-0.99	1330	-12.5	-0.14
					1200	-142.5	-1.62
No. 5	1.36×10^3	1400	50.0	0.59	1310	-32.5	-0.37
					1400	57.5	0.66
No. 6	1.25×10^3	1245	-105.0	-1.23	1250	-92.5	-1.05
					1240	-102.5	-1.17
平均値 ($\bar{X}$)	1.35×10^3	1350.0			1342.5		
標準偏差 (SD)		85.4			87.7		
X+2SD		1520.9			1517.9		
X-2SD		1179.1			1167.1		

表 3. 模擬食品からの大腸菌検出

機関名	食品C	食品D
No. 1	陽性	陰性
No. 2	陽性	陰性
No. 3	陽性	陰性
No. 4	陽性	陰性
No. 5	陽性	陰性
No. 6	陽性	陰性

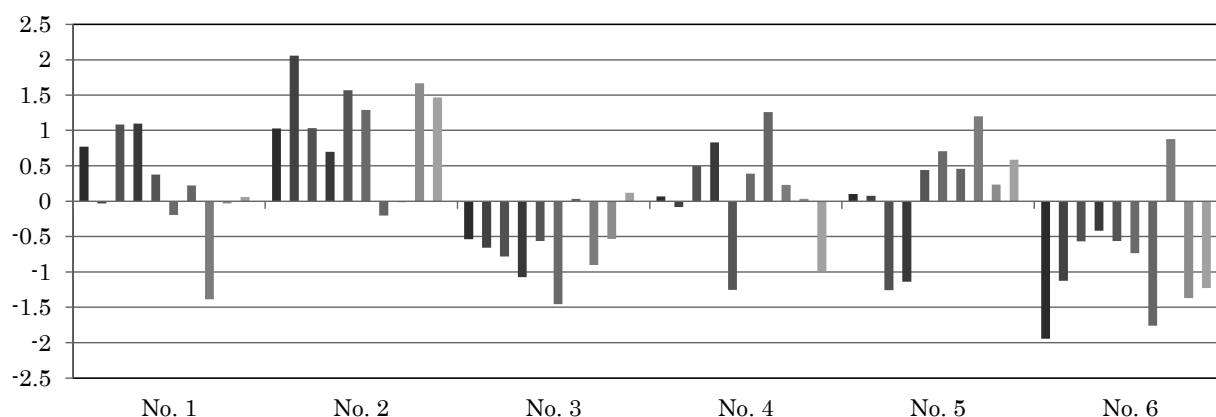


図 1. 各機関における生菌数の測定値のZスコア (H30～R04)

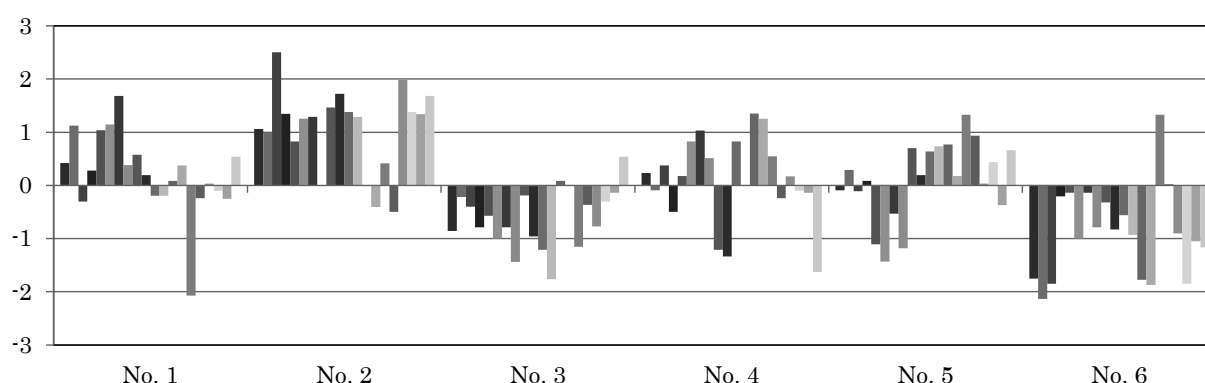


図 2. 各機関における生菌数の実測値のZスコア (H30～R04)

考察：平成30～令和4年度において、生菌数のZスコアをみると、測定値では1つの機関（計1回）、実測値では3つの機関（計3回）が $2 < |Z| < 3$ の範囲であった。Zスコアの絶対値が2を越えた場合、機関内でその原因を精査し、ばらつきが小さくなるよう改善する必要がある。しかし、この精度管理調査の参加機関は多くないため、全体的な測定値のばらつきが小さい場合、少しの変動がZスコアに大きく影響する場合があるので、本調査におけるZスコアだけでその測定方法等を否定できない。これらの機関については、民間機関が実施する外部精度管理にも参加し、適正な範囲に入る結果を得られるか検討することが望ましい。

大腸菌による食中毒は、日本の衛生管理水準が高くなってから減少してはいるが、厚生労働省の食中毒統計資料によると、令和元年に全国で2件（患者数200名）の病原大腸菌（腸管出血性大腸菌を除く）による食中毒が発生している。また、加熱食肉製品（加熱殺菌後包装）や乾燥食肉製品からは大腸菌が検出されてはならないこととなっ

ているため、この検査の必要性は高い。このような背景から、今回の精度管理では大腸菌の検出を検査項目として選定した。

本検査による大腸菌検出は、主に乳糖分解による酸とガスの産生を様々な培地（EC培地、EMB培地、乳糖ブイヨン培地）で確認することで判定する。今回、食品Dに添加したアルベルティイ菌は乳糖非発酵であるため、本検査に用いる培地で判別可能である。今年度は、全ての機関で食品Dから大腸菌は検出されなかった。また、全ての機関で食品Cからのみ大腸菌を検出することができ、検査精度に問題はなかった。収去検査で大腸菌を検出する機会は少ないことから、定期的に精度管理を実施し、使用する培地での陽性コントロールの発育を確認することが望ましい。

文 献

1. 富山県厚生部長通知，薬食1,229号，平成10年12月16日

令和4年度富山県水道水質検査精度管理事業 (細菌検査項目)について(2022年度)

綿引 正則 小坂 真紀 木全 恵子 前西 絵美
金谷 潤一 磯部 順子 大石 和徳

Quality Control Survey of Bacterial Testing of Drinking Water in Toyama in the Fiscal Year 2022

Masanori WATAHIKI, Maki KOSAKA, Keiko KIMATA, Emi MAENISHI,
Jun-ichi KANATANI, Junko ISOBE, and Kazunori OISHI

目的：富山県では県内の水質検査を実施する検査機関について試験分析技術の向上および検査精度の確保を図るため、「富山県水道水質検査精度管理実施要領」に基づく精度管理を実施している。当所はこの精度管理の細菌検査について検体調製および検査結果の解析を担当している。ここに、2022年度に実施した検査項目「一般細菌」の調査結果について報告する。

材料と方法：

- (1) 検査項目：一般細菌
- (2) 検体等の配付年月日：2022年11月8日
- (3) 参加機関：富山県内で水道水等の水質検査を実施している検査機関で水道事業者、水道用水供給事業者、水道法第20条に規定する登録検査機関および地方公共団体の21機関
- (4) 配付検体：検体配付当日に下記のとおり枯草菌添加液を調製した。

予備試験によりあらかじめ菌数を確認した市販の枯草菌芽胞液 (1.2×10^7 cfu/mL, 栄研化学) をリン酸緩衝希釈液で100倍希釈した。希釈した枯草菌芽胞液を滅菌水に添加し、最終菌数250 cfu/mLの枯草菌添加液4.5 Lを調製した。この枯草菌添加液を150 mLずつ採水ビンに分注し、各機関へ配付した。

また、移送中および検査開始時の検体の温度を確認するため、温度モニタリング用の滅菌脱イオン水を採水ビンに150 mLずつ分注し、枯草菌添加液とともに各機関へ配付した。

- (5) 検査方法：検査担当者が通常の検査業務と同様の方法を用いて行うこととした。

- (6) 集計項目と管理基準：下記の項目について集計および解析を行った。下記の解析方法において、

X, 各機関の測定値; X_1 , 全体の中央値; X_2 , 全体の平均値; σ , 全体の標準偏差を示す。

・棄却評価基準

中央値 (X_1) $\pm 20\%$ を採択とし、それ以外は外れ値として棄却した。

・変動係数 (CV%)

= 各機関の標準偏差 (σ) / $X_1 \times 100$

・範囲 (R) = | 最大値 - 最小値 |

・Xbar-R管理図における管理基準

細菌数、平均値 ($\bar{X}$) $\pm 2\sigma$ とした管理区 [下方管理限界 (LCL) から、上方管理限界 (UCL) まで], および範囲 (R), UCL までの管理区を指標とした。

・Zスコア (Z) = $(X - X_2) / \sigma$

・その他の集計項目

検査担当者の業務経験年数、各機関の検査に使用した培地の製造元、検体受取から開始までの保持時間、滅菌脱イオン水の機関到着時および検体検査時の温度

結果：

(1) 棄却評価

21機関の中央値は244であり、195以上、293以下の範囲から外れた機関aを棄却とした(表1 棄却評価1)。残りの20機関の結果について、再び棄却評価を行ったところ、棄却される機関はなかった(表1 棄却評価2)。

(2) 細菌数

20機関より報告された2回の実測値の平均値から、有効数字2桁の菌数を求め、これを測定値 (X) とした。数値の丸め方はJIS Z 8401に従った。各機関の菌数、標準偏差および変動係数

(%)を表2に、測定値(X)の度数分布(ヒストグラム)を図1に示した。

20機関全体では、菌数中央値245 cfu/mL、平均値242 cfu/mL、標準偏差は16 cfu/mL、および変動係数は1.17%(最小0.00%、最大2.92%)であった。

20機関の測定値(X)を用いてXbar-R管理図を作成した(図2)。評価の妥当な管理範囲として、菌数は平均値($\bar{X}$) $\pm 2\sigma$ から計算される、即ちLCL(210 cfu/mL)～UCL(274 cfu/mL)内に、20機関のうち18機関は収まったが、機関bについては、LCLより小さく、また、機関uについてはUCL値を超え、管理外となった。R管理図におけるUCL(上方管理限界)は18.6であり、20機関すべて管理範囲内であった(図2)。

20機関の測定値(X)についてZスコアを算出した(図3)。Zスコアの判断基準は $|Z| \leq 2$ のとき「良好」、 $2 < |Z| < 3$ のとき「改善が必要かどうかの検討必要」、 $|Z| \geq 3$ のとき「改善措置を要する」である。18機関における菌数のZスコアは $|Z| \leq 2$ であり、「良好」と判断された。しかし、機関b及びuは、 $2 < |Z| < 3$ であり「改善が必要かどうかの検討必要」となった。

(3) その他

滅菌脱イオン水の温度は、機関到着時の平均は10.6℃(最大20.2℃、最小5.0℃)、検査開始時の平均は、9.0℃(最大18.0℃、最小4.2℃)であった。機関毎に報告された滅菌脱イオン水の温度については、図4に示した。検体配付から検査開始に至る時間の平均は、4.3時間(最大8時間、最小35分)であった(図5)。全機関が、検査方法告示[1]で規定された時間内(採水から12時間以内)に検査を行った。検査に使用した標準寒天培地の製造元については、栄研化学および日水製薬が各9機関、残りが関東化学および日研生物が各1機関であった(図6)。担当者の業務経験年数については、最小0年、最大20年で、うち3年以内の担当者が8名であった(図7)。

考察：今回の精度管理に用いた枯草菌添加液は、市販の枯草菌芽胞標準液から、最終菌数250 cfu/mLを目標に調製したものである。参加した21機関から報告された菌数について、棄却評価を行っ

たところ、1機関が外れ値となり棄却された。従って、本年度は20機関からの報告された菌数に基づき、解析した。

棄却された機関aについては、棄却時点で改善策等の報告を求めた。提出された改善策等報告書によると、その原因は集落数を数える際に計数を分割して行い、合算せずに一部の計数値のみ記載し、誤りが生じていることに気がつかず報告したとのことであった。改善策として、計数にはカウンターを使用し、計数作業を分割しないことでミスを防ぐとのことであった。一方で本来の菌数の提供を受け、改めて棄却評価を実施したところ、外れ値とはならず、操作手順等には問題はないことが確認された。

本精度管理では、枯草菌添加液とは別に滅菌脱イオン水も配付している。本検体は、検体移送及び検査実施直前までのモニタリングのため、検査機関の機関到着時及び検査実施時の検体の温度を測定し、報告を求めている。細菌検査の検体は、低温輸送、低温保管が基本である。今回、報告された滅菌脱イオン水の温度については、機関到着時では、最大20.2℃、最小5.0℃、検査実施時では、最大18.0℃、最小4.2℃であった(図4)。この温度については、検体受領後の検体の輸送状況(検体の保冷状態、輸送距離・時間)および検査開始までの機関での検体保管状況に依存している。今回、配付した検体については、約20℃の検体を配付した。このため、距離的に近い機関については検体輸送時間や輸送中の保冷時間も短く、検体到着時の温度は高くなる傾向であったと思われる(図4)。

精度管理は、検体の受け入れから検査結果の報告までのすべての工程の信頼性を担保することを目的に行われるものである。Xbar-R管理図とZスコアで管理区域から外れた機関を含めて、今回の結果を全機関で共有し、今後とも各機関においては適切な内部精度管理等を実施し、精度と検査技術の確認を行い、精度を維持することが望まれる。

文 献

1. 厚生労働省(2003).平成15年7月22日厚生労働省告示第261号

表1 令和4年水道水質検査精度管理：一般細菌 棄却評価

機関ID	測定1 n1	測定2 n2	測定値	棄却評価1* 195<<293	棄却評価2* 196<<294
a	109	106	108	棄却	—
b	197	204	201	採択	採択
c	217	221	219	採択	採択
d	221	221	221	採択	採択
e	227	239	233	採択	採択
f	233	234	234	採択	採択
g	232	242	237	採択	採択
h	237	239	238	採択	採択
i	241	243	242	採択	採択
j	242	246	244	採択	採択
k	251	237	244	採択	採択
l	247	245	246	採択	採択
m	243	251	247	採択	採択
n	247	249	248	採択	採択
o	247	250	249	採択	採択
p	255	243	249	採択	採択
q	247	250	249	採択	採択
r	250	249	250	採択	採択
s	254	248	251	採択	採択
t	262	248	255	採択	採択
u	277	284	281	採択	採択
			機関数	21	20
			中央値	244	245
			平均値	235	242

表2 一般細菌 結果

機関ID	実測値 n1	実測値 n2	測定値	測定値(X)	各機関内 標準偏差	各機関 変動係数(%)
b	197	204	201	200	3.5	1.75
c	217	221	219	220	2.0	0.91
d	221	221	221	220	0.0	0.00
e	227	239	233	230	6.0	2.61
f	233	234	234	230	0.5	0.22
g	232	242	237	240	5.0	2.08
h	237	239	238	240	1.0	0.42
i	241	243	242	240	1.0	0.42
j	242	246	244	240	2.0	0.83
k	251	237	244	240	7.0	2.92
l	247	245	246	250	1.0	0.40
m	243	251	247	250	4.0	1.60
n	247	249	248	250	1.0	0.40
o	247	250	249	250	1.5	0.60
p	255	243	249	250	6.0	2.40
q	247	250	249	250	1.5	0.60
r	250	249	250	250	0.5	0.20
s	254	248	251	250	3.0	1.20
t	262	248	255	260	7.0	2.69
u	277	284	281	280	3.5	1.25
			機関数	20		
			中央値 (cfu/mL)	245		
			平均 (Xbar, cfu/mL)	242		
			標準偏差 (σ, cfu/mL)	16		
			全機関変動係数(%)	1.17		

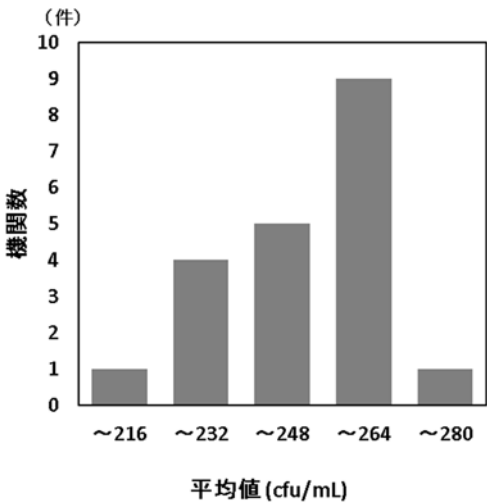


図1 一般細菌数〔測定値 (X)〕の度数分布

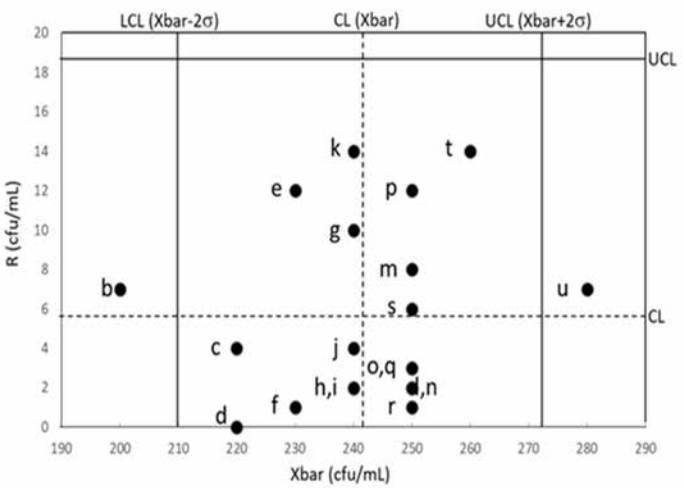


表2 一般細菌 Xbar-R 管理図

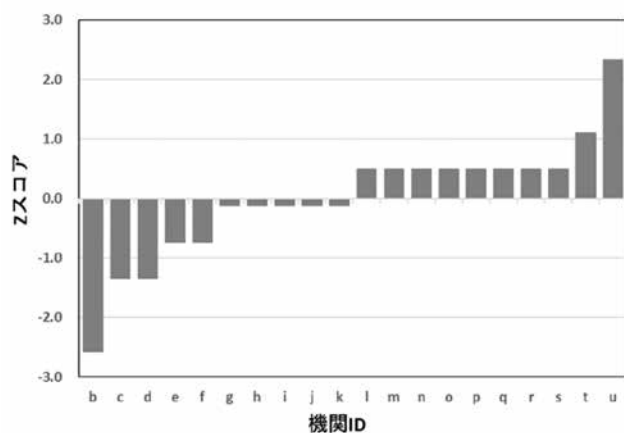


図3 Zスコアによる機関順位

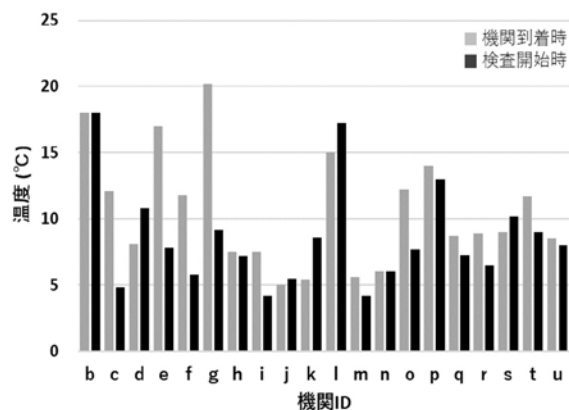


図4 機関到着時および検査開始時の検体4の温度

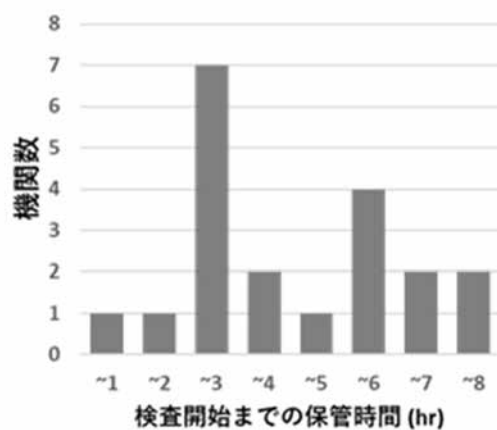


図5 検体受け取りから検査開始までの保管時間

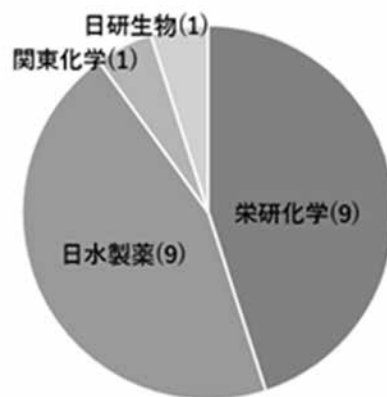


図6 使用した寒天培地の製造元

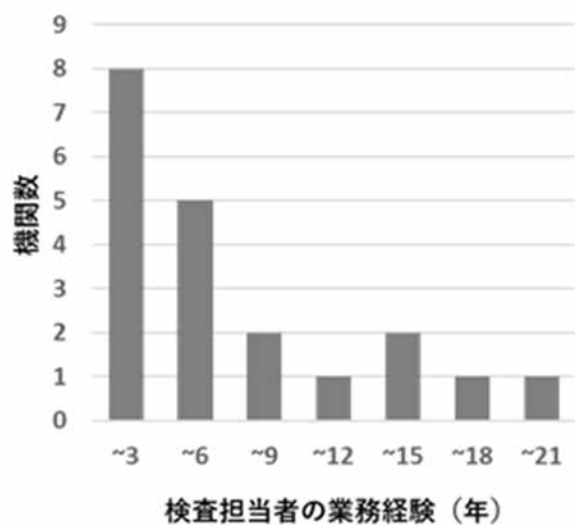


図7 検査担当者の業務経験年数の分布

令和4年度富山県病原体等検査の精度管理調査(2022年度) －浴槽水を想定した試料水におけるレジオネラ属菌検査－

磯部 順子 金谷 潤一 前西 絵美 綿引 正則
小坂 真紀 木全 恵子 大石 和徳

Quality Control of the Bacterial Testing of Pathogen in Toyama Prefecture in the Fiscal Year 2022 – Test of *Legionella* spp. in Sample Water Assuming Bath Water –

Junko ISOBE, Jun-ichi KANATANI, Emi MAENISHI, Masanori WATAHIKI,
Maki KOSAKA, Keiko KIMATA, and Kazunori OISHI

目的：本県では、富山県病原体等検査業務管理要綱に基づき、県内の病原体等検査施設に対する検査水準の維持、向上を目的として精度管理調査を平成28年度より実施している。令和4年度の調査は、四類感染症（全数報告疾患）に位置づけられているレジオネラ症について、積極的疫学調査として実施される浴槽水のレジオネラ属菌検査とした。検査手順だけでなく、報告（数値）に対する考え方について協議することも目的とした。

材料と方法：対象の施設は新川厚生センター、中部厚生センター、高岡厚生センター、砺波厚生センターおよび衛生研究所の5機関である。検査試料は衛生研究所で作製し、令和5年1月24日に概要説明の後、担当者に配布した。結果は2月24日までの報告とし、各々の報告書・検査記録などから集計・解析した。

試料は、当所保管株（表1）を30℃3日間平板培養し、異なる濃度となるよう2本の生理食塩水に接種し、検体A、検体Bとして配布した。検査は各機関の検査方法で行う。ただし、本調査においては、日常的に使用する選択分離培地（選択培地）の他に非選択分離培地（非選択培地）の菌数も測定することとした。結果は、通常の浴用水検査と同様、100 µl中のレジオネラ属菌の菌数を測定し、100 ml中の菌数に換算して報告する。結果の解析は、各機関の検査記録に基づきまとめた。加えて、非選択培地における発育菌数に対して、選択培地での発育菌数から、その選択培地におけるレジオネラ属菌発育抑制率を求めた。

表1. 配布試料と接種菌名

試料名	接種菌名(選択培地による推定値)
検体A	<i>Legionella pneumophila</i> 血清群1 (795cfu/100ml) *
検体B	<i>Legionella pneumophila</i> 血清群1 (1,490cfu/100ml)

*添加菌を選択分離培地2枚で測定した平均値から推定される菌数

結果：

(1) 結果の良好範囲

良好範囲は、レジオネラ属菌検査の外部精度管理調査（日水製薬株式会社）で参考としている一般財団法人食品薬品安全センターの考え方「全体の平均値の30％、300％」を採用し、非濃縮の場合は下限値、上限値を全機関の結果の平均値の30％、300％とした（表2：a）。また、濃縮法で得られた菌数の平均値（b）、および推定値（c）から求めた良好範囲も示した。濃縮操作による回収率は、非選択培地、選択培地別にそれぞれ濃縮後の菌数を濃縮前（非濃縮）の菌数と比較して求めた。回収率の良好範囲は前述の外部精度管理に倣い、20～100％とした。

(2) 結果

各機関の記録から得られた測定値を解析に用いた。すべての結果を表3に示す。機関Eを除き、各培地1枚を使用していた。

① 非濃縮法による結果

はじめに選択培地での結果について述べる。機関Eは3枚の培地で測定した結果の平均値である。検体A：1機関（機関D）でコロニーを認めなかった（0 cfu/100 ml）と回答した。その他の機関は1,000～2,000 cfu/100 mlと回答し、平均値は

1,340 cfu/100 mlであった。機関Dを除き、良好範囲（402～4,020 cfu/100 ml）であった。

検体B：菌数は2,000～4,000 cfu/100 ml、平均2,940 cfu/100 mlで、いずれも良好範囲内であった。

次に非選択培地の結果について述べる。

検体A：1機関（機関B）がコロニーを認めなかった（0 cfu/100 ml）と回答した。3機関は2,000 cfu/100 ml、1機関は4,000 cfu/100 mlと回答した。機関Bを除き、菌数は良好範囲内であった。

検体B：菌数は1,000～6,000 cfu/100 ml、平均は3,340 cfu/100 mlであった。すべての機関の菌数が良好範囲内であった。

選択培地のレジオネラ属菌発育抑制率は、3機関では0～15%と大きく抑制されることなく菌が発育したが、1機関では選択培地で菌の発育が認められなかった。逆に、非選択培地で菌の発育が認められなかったが、選択培地に菌を認めた機関もあった。

② 濃縮法による結果の解析

全ての機関がろ過法によって濃縮操作を実施していた。機関Eは5枚の培地で測定した結果の平均値である。はじめに選択培地での結果について述べる。

検体A：菌数は24～320 cfu/100 ml、平均98.8 cfu/100 mlで、機関Eが下限値30 cfu/100 mlからわずかに外れ、機関Dは上限値297 cfu/100 mlを外れた。

検体B：菌数は42～1,090 cfu/100 mlで、平均452 cfu/100 ml、機関Eは下限値（136 cfu/100 ml）を外れた。次に非選択培地について述べる。
検体A：菌数は70～510 cfu/100 ml、平均218 cfu/100 mlで、すべてが良好範囲内であった。

検体B：菌数は270～1,560 cfu/100 ml、平均774 cfu/100 mlで、すべてが良好範囲内であった。

選択培地におけるレジオネラ属菌発育抑制率は、

検体Aで平均54.7%、検体Bで41.6%とおおよそ5割が発育抑制されていた。

③ 回収率

選択培地における回収率は、検体Aで1.4～3.5%（平均2.6%）、検体Bで1.6～27.3%（平均15.4%）、非選択培地では検体Aで3.5～12.8%（平均9.5%）、検体Bで7.9～78.0%（平均23.2%）で、全体的に低かった。検体Aでは培地の選択性に関わらずすべての機関が良好範囲を外れ、検体Bでは選択培地で機関A、Dが、非選択培地では機関A、C、Dの3機関が良好範囲内の回収率であった。

④ 夾雑菌抑制処理によるレジオネラ属菌数の変動

表3(b)に夾雑菌の発育を抑制するための酸処理、加熱処理、加熱後酸処理を実施した後の菌数を示した。酸処理では、検体Aで2機関が、検体Bでは4機関がレジオネラ属菌を検出した。機関Aの菌数は未処理濃縮検体と比べて、選択培地でおおよそ70%、非選択培地でおおよそ40%と、酸処理後にも発育した菌が多かった。機関Aでは使用した酸処理液が他の機関と異なるメーカーであった点が要因の一つとして考えられるが、明らかではない。加熱処理については、非選択培地で3機関、選択培地で1機関のみ、菌の発育を確認したが、その菌数（10～30 cfu/100 ml）は少なかった。

⑤ 最終報告数

各機関の最終報告数を表4に示す。ろ過濃縮法の結果を報告した機関は少なく、検体Aでは機関A（70 cfu/100 ml）とD（320 cfu/100 ml）、検体Bでは機関A（610 cfu/100 ml）のみであった。その他の機関は非濃縮法の結果を報告し、それらのレジオネラ属菌数は、検体Aで1,000～2,000 cfu/100 ml、検体Bで2,000～4,000 cfu/100 mlであった。ろ過濃縮法に比べ非濃縮法で菌数が多く、

表2. 本調査におけるレジオネラ属菌数の良好範囲

(a) 非濃縮検体

選択培地 平均値		レジオネラ属菌数 cfu/100ml		非選択培地 平均値		レジオネラ属菌数 cfu/100ml	
A	1,340	下限値	402	2,000		下限値	600
		上限値	4,020			上限値	6,000
B	2,940	下限値	882	3,340		下限値	1,002
		上限値	8,820			上限値	10,020

(b) 濃縮検体

選択培地 平均値		レジオネラ属菌数 cfu/100ml	非選択培地 平均値		レジオネラ属菌数 cfu/100ml
A	99	下限値 29.7	218		下限値 65.4
		上限値 297			上限値 654
B	452	下限値 136	774		下限値 232
		上限値 1,357			上限値 2,320

(c) 推定値を基本とした良好範囲

選択培地 平均値		レジオネラ属菌数 cfu/100ml	非選択培地 平均値		レジオネラ属菌数 cfu/100ml
A	794	下限値 239	975		下限値 293
		上限値 2,385			上限値 2,930
B	1,490	下限値 447	2,190		下限値 657
		上限値 4,470			上限値 6,570

表 3. 機関別の報告数

(a) 機関別レジオネラ属菌報告数

検体名	機関名	レジオネラ属菌数(非濃縮法) cfu/100ml		レジオネラ属菌 発育抑制率(%)*	レジオネラ属菌数(濃縮法) cfu/100ml		レジオネラ属菌 発育抑制率(%)*	回収率***(%)	
		選択培地	非選択培地		選択培地	非選択培地		選択培地	非選択培地
A	A	2,000	2,000	0.0	70**	250	72.0	3.5	12.5
	B	1,000	0		30	80	62.5	3	UT
	C	2,000	2,000	0.0	50	70	28.6	2.5	3.5
	D	0	4,000	100.0	320	510	37.3	UT	12.8
	E	1,700	2,000	15.0	24	180	86.7	1.4	9.0
平均		1,340	2,000	33.0	98.8	218	54.7	2.6	10.9
推定値		795	975						
B	A	3,000	6,000	50	610	1,220	50.0	20.3	20.3
	B	2,000	3,000	33.3	150	270	44.4	7.5	9.0
	C	3,000	1,000	-200	370	450	17.8	12.3	45.0
	D	4,000	2,000	-100	1,090	1,560	30.1	27.3	78.0
	E	2,700	4,700	42.6	42	370	88.6	1.6	7.9
平均		2,940	3,340	12.0	452.4	774	41.6	15.4	23.2
推定値		1,490	2,190						

*コロニー抑制率：(非選択培地菌数－選択培地菌数) / 非選択分離培地 × 100

**太字：最終報告数とした菌数

***回収率：濃縮法菌数/非濃縮菌数 × 10

(b) 機関別夾雑菌処理後のレジオネラ属菌報告数

検体名	機関名	未処理濃縮検体		酸処理		加熱処理		加熱後酸処理	
		選択培地	非選択培地	選択培地	非選択培地	選択培地	非選択培地	選択培地	非選択培地
A	A	70	250	50	80	0	0	0	10
	B	30	80	10	10	0	0	NT	NT
	C	50	70	0	0	0	0	NT	NT
	D	320	510	0	0	0	30	NT	NT
	E	24	180	0	0	0	0	NT	NT
B	A	610	1220	400	440	0	0	0	0
	B	150	270	30	30	0	0	NT	NT
	C	370	450	0	10	0	0	NT	NT
	D	1090	1560	10	10	10	20	NT	NT
	E	42	370	0	0	0	10	NT	NT

例えば、検体 A では、機関 C (2,000 cfu/100 ml) の菌数が機関 A の菌数 (70 cfu/100 ml) のおよそ 30 倍の結果となっている。全体的に非濃縮法による結果は推定値よりも多い傾向を示した。機関 E は 5 枚の培地の平均値の結果である。

考察：富山県におけるレジオネラ症患者報告数は令和元年に 54 名で、その後、コロナ禍で令和 2 年に 36 名に減少したものの、その後 41 名、44 名と再び増加傾向を示している。令和 4 年の人口 10 万人当たりの患者数（罹患率 4.25）は全国でもっとも高い状況が続いている。このような背景の中、富山県において、患者発生時に感染源調査の一環として浴用水検査がしばしば求められる。この検査については、いわゆる公定法はなく、検査機関がそれぞれ自施設の標準作業書に従って実施するのが現状である。浴用水中のレジオネラ属菌は、公衆浴場における衛生等管理要領 [1] の水質基準の中で検出されてはならないとされ、具体的には 10 cfu/100 ml 未満となっている。これは、レジオネラ属菌の増菌（液体）培地がないため、浴用水を 100 倍濃縮して、その 100 μ l 中のレジオネラ属菌を数え、100 ml 中の菌数で表示する方法の

検出限界の数値とされている。検出限界が平板上の 1 コロニー、すなわち 100 ml 中に 10 コロニーと換算される数値が示されているが、あくまで検出されてはならないというのが本来の考え方である。

令和元年にレジオネラ属菌検査手順について、「公衆浴場における浴槽水等のレジオネラ属菌検査方法について」（令和元年 9 月 19 日薬生衛発 0919 第 1 号厚生労働省医薬・生活衛生局生活衛生課長通知）を参照することという通知が発出され、推奨される標準検査法が示された。これは ISO11731 の改訂を踏まえ、その基本的な考え方を取り入れた方法となっている。この中では濃縮法、非濃縮法の両方について検査するよう推奨しているが、消毒後の陰性化確認のための検査など、レジオネラ属菌が極めて少ないことが予想される検体については非濃縮検査を省略してもよいと示されている。今回の調査で、機関 A は日常の検査では ATP の数値により非濃縮検査を省略すると言及しているが、これは標準検査法の考え方と合致しており、有用な選択であると思われる。この場合、基準となる ATP の数値について根拠となるデータがあることが望ましい。

表 4. 機関別の最終報告数

検体名	機関名	レジオネラ 属菌数 cfu/100ml		検体名	機関名	レジオネラ 属菌数 cfu/100ml	
	A	70	濃縮検体		A	610	濃縮検体
	B	1,000	非濃縮検体		B	2,000	非濃縮検体
A	C	2,000	非濃縮検体	B	C	3,000	非濃縮検体
	D	320	濃縮検体		D	4,000	非濃縮検体
	E	1,700	非濃縮検体		E	2,700	非濃縮検体

一方、報告する結果は、濃縮、非濃縮、培地の種類、夾雑菌の処理方法にかかわらず、100 ml あたりでもっとも多い菌数とすることになっている。ただし、前述の標準検査法には使用する培地の種類や枚数までには言及されていないため、それぞれの機関でそれらを定めた標準作業書を作成する必要がある。本調査では、非濃縮法と濃縮法の菌数が大きく違っていたが、いずれも10 cfu/100 ml という基準値を大きく超えていたため、浴用水の衛生管理の監視指導の根拠となるデータを示すことができる結果であった。しかしながら、回収率という点で見ると、本調査では良好範囲以下の結果が多く、今後の検討課題であることが明確になった。とりわけレジオネラ菌数の少ない検体の場合、ろ過濃縮法で確実にレジオネラ属菌が検出できるか、内部精度管理などで確認、検証すべきである。レジオネラ属菌の濃縮法による回収率については、前述の外部精度管理の報告書において、0.0～183.3%と幅広く、中央値は45%程度と報告されている。また、「厚生労働科学研究費補助金健康安全・危機管理対策総合研究事業公衆浴場におけるレジオネラ症対策に資する検査・消毒方法等の衛生管理手法の開発のための研究」の報告書においても、施設における内部精度管理として実施した添加回収試験の回収率は3.1～97.0%、平均52.3%と報告され、多くの機関が半数程度の回収率となっており、レジオネラ属菌検査の難しさを示している。レジオネラ属菌の検査は、培地にコンラージ棒で広く塗抹する方法であるが、レジオネラ属菌は乾燥にきわめて弱く、塗抹時にも細心の注意が必要であることが報告され、培養そ

のものが難しいことは周知されている。今回の結果では非選択培地でレジオネラ属菌が良好に発育しているので、コンラージ棒による塗抹操作に問題はないものと思われるが、ろ過濃縮することで大幅に発育菌数が減少するのは、ろ過作業の中でフィルター孔にトラップされるだけでなく、陰圧がかかることやボルテックス操作により、菌がダメージを受けることも要因の一つかもしれない。今回の調査の中で、夾雑菌の抑制処理法により、レジオネラ属菌数もかなり減少することが明らかとなった。実際の検体では夾雑菌が発育抑制されるので、これらの処理法によりレジオネラ属菌が選択的に発育する場合もあるが、一部のレジオネラ属菌は発育を抑制されているものと考えべきである。この発育抑制は保存株を使用した添加回収試験の時にとりわけ顕著に見られる。添加回収試験を行う場合の菌株の選択、培養法など、精度管理の方法における検討課題も明らかとなった。

レジオネラ属菌検査は、菌の培養そのものに特徴があり、困難さも伴う。これを踏まえ、それぞれの過程について、できる限り検証し、改善していく努力が必要である。加えて、厚労科研の内部精度管理に関する報告書を参考に、内部精度管理を実施することが望ましい。

文 献

1. 平成12年12月15日 生衛発第1,811号各都道府県知事・各政令市市長・各特別区区长宛 厚生省生活衛生局長通知 別添1 公衆浴場における水質基準等に関する指針

GC-MS/MSによる農産物中多成分残留農薬一斉分析法の検討

中山恵理子 安川 和志 遊道 梓 有沢 拓也
堀井 裕子

Simultaneous Analysis Method of Pesticide Residues by GC-MS/MS
in Agricultural Products

Eriko NAKAYAMA, Kazuyuki YASUKAWA, Azusa YUDO, Takuya ARISAWA,
and Yuko HORII

目的：ガスクロマトグラフ質量分析装置（GC-MS/MS）による食品中の残留農薬一斉分析では、測定溶液中に残存する試料成分（マトリックス）の影響で農薬の回収率異常がみられることがあり、このマトリックス効果を抑制することが測定精度の向上につながる。

当所ではこれまで、マトリックス効果抑制のために試験対象と同種で農薬不検出の食品から調製したマトリックス含有標準溶液（以下、マトリックス標準液）を用いて測定してきた。しかし、この方法では食品の種類ごとにマトリックス標準液を調製する必要があるため作業量が多くなることや、測定対象の農薬を含まない食品を準備することが困難な場合もある。それに代わる方法として食品成分の代わりに特定の化学物質を疑似マトリックスとして共注入する方法が知られており、特に近年、飽和脂肪酸（SFA）混合物が疑似マトリックスとして有用であるという報告がなされた[1]。そこで今回、当所で採用している大量注入方式のGC-MS/MS分析においてSFA混合物の共注入がマトリックス効果の抑制に有用であるか検討を行った。併せて、簡便で迅速として報告のある多層固相カラム[2]を用いた測定溶液調製法についても検討し、試験法の妥当性評価を行ったので、その結果を報告する。

材料及び方法：

1. **試料：**野菜（ほうれんそう、キャベツ、さといも、トマト、にんじん）、玄米、果物（りんご）

2. **標準品及び試薬等**

標準品：林純薬(株)製 PL2005 農薬 GC/MS Mix I～VI, 7, PL 農薬混合標準溶液（第一種特定化学物質）II 及び（第一種特定化学物質関連）計 385 成分

混合標準原液（2 mg/L）：各標準品 1 mL をメスフラスコに採取し、アセトンを加えて 10 mL とした。

添加回収試験用混合標準液（200 ng/mL）：混合標準原液 1 mL をメスフラスコに採取し、アセトンを加えて 10 mL とした。

検量線用混合標準原液（200 ng/mL）：混合標準原液 1 mL をメスフラスコに採取し、ヘキサン 1 mL 及びアセトン/ヘキサン（1:1）混合溶媒を加えて 10 mL とした。

検量線用標準液：検量線用混合標準原液を適宜アセトン/ヘキサン（1:1）混合溶媒で希釈し、各 0.3125～12.5 ng/mL の濃度に調製した。

疑似マトリックス：林純薬(株)製 SFA10mix（10 種類混合、各 200 µg/mL）をアセトン/ヘキサン（1:1）混合溶媒で希釈して 10 µg/mL とし、共注用疑似マトリックス溶液（以下 SFA とする）とした。

その他の試薬：1 M リン酸緩衝液（pH = 7.0）：リン酸水素二カリウム（特級、富士フィルム和光純薬(株)製）10.6 g 及びリン酸二水素カリウム（特級、和光純薬工業(株)製）6 g を精製水で溶解し、100 mL とした。

その他、塩化ナトリウム、硫酸ナトリウム（無水）は残留農薬試験用を使用し、予め 250℃ で 2 時間乾燥して使用した。また、アセトン、ヘキサン、及びアセトニトリルは残留農薬試験用を用いた。精製水は日本ミリポア(株)製の超純水装置 Milli-Q Direct 8 で精製した水を使用した。

多層固相精製カラム：InertSep C18/SAX/PSA（200/100/100 mg/ 1 mL, GL サイエンス(株)製、以下 3LC）、及び InertSep AL-N/C18/SAX/PSA（100/200/100/100 mg/ 1 mL, GL サイエンス(株)製、以下 4LC）

3. 装置及び測定条件

(1) 装置

GC-MS/MS装置：Agilent Technologies社製 8890B/7000

大量注入装置：アイスティサイエンス(株)製 LVI-S 250

水素ガス発生装置：ピークサイエンティフィック製 Precision Hydrogen Trace

ホモジナイザー：(株)日音医理化学機械製作所製 ヒスコトロン

(2) 測定条件

分析カラム：Agilent Technologies社製 VF-5

MS (φ 0.25 mm × 30 m, 0.25 μm)

カラム温度：60℃ (4 min) → 25℃/min → 150℃ → 3℃/min → 200℃ → 8℃/min → 310℃ (5 min)

Total 43.017 min

キャリアーガス：He (リテンションタイムロッキング機能を使用しクロロピリホスメチルの保持時間が20.40分になるように設定)

注入方式：溶媒ベント

注入量：試料16 μL + SFA 5 μL (サンドイッチ注入)

注入口温度：70℃ (0.22 min) → 120℃/min → 250℃ → 50℃/min → 290℃ (39 min)

イオン源温度：320℃

四重極温度：150℃

イオン化法：EI

イオン化電圧：70 eV

イオン源クリーニング：水素流量 0.4 mL/min

4. 測定溶液調製法

測定溶液調製法の概要を図1に示した。予め均質化した試料5 gに精製水5 mLを加えた(玄米については精製水10 mLを加え、15分放置)。アセトニトリル20 mLを加えてホモジナイズし、塩化ナトリウム5 g及び1 Mリン酸緩衝液5 mLを入れ1分間激しく振とう後、遠心分離(6,000 rpm, 5 min)し、上層のアセトニトリル層を採取して抽出液とした。分取した抽出液2 mLに硫酸ナトリウム0.5 gを加えて脱水後、0.5 mLを採取し、予めアセトニトリル4 mLでコンディショニングした多層固相カラム(3LC又は4LC)に負荷し、アセトニトリル0.6 mLで溶出した。窒素気流下でこの溶出液の溶媒を除去(40℃加温)し、アセトン/ヘキサン(1:1)混合溶媒に転溶して2 mLとした。

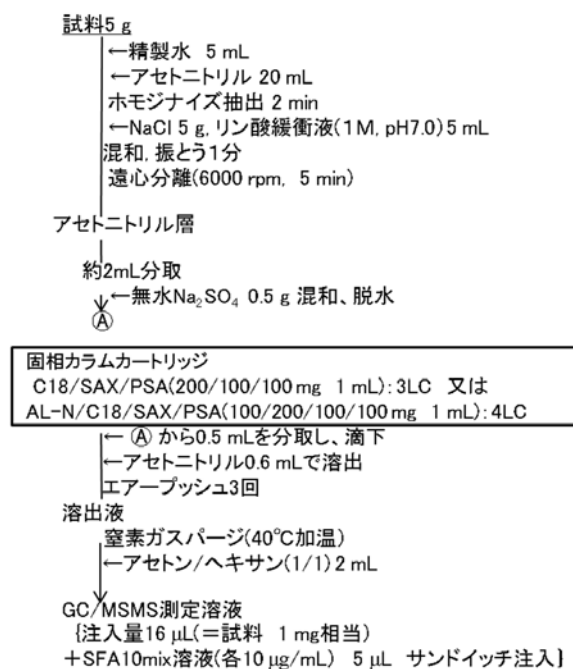


図1. 測定溶液の調製法

5. 定量

検量線用標準液(各0.3125 ~ 12.5 ng/mL) 16 μLとSFA 5 μLをGC-MS/MSに共注入し、得られたクロマトグラムのピーク面積により検量線を作成した。試料測定溶液についてもSFA 5 μLと共注入し、検量線に基づいて各農薬濃度を定量し回収率を算出した。

6. 妥当性評価

妥当性評価ガイドライン[4]に従い、試料5 gに対し、添加回収試験用混合標準液(200 ng/mL)、混合標準原液(2 mg/L)を各々250 μL添加(試料濃度:0.01 ppm, 0.1 ppm)し、検査者3名、2併行、2日間分析を行い、真度、精度(併行精度、室内精度)の確認を行った。目標値は添加濃度0.01 ppmでは回収率70 ~ 120%、併行精度25%未満、室内精度30%未満、添加濃度0.1 ppmでは回収率70 ~ 120%、併行精度15%未満、室内精度20%未満とした。

結果と考察：

1. 疑似マトリックスの検討

添加する疑似マトリックスの種類については、SFAの他にPEG(ポリエチレングリコール)300やグロノラクトン/ソルビトール混合物[5]を候補としたが、そのうちPEG300については、当所GC-MS/MS装置のイオン源クリーニング機能を使用できないため除外した。

りんごまたはキャベツに混合標準液を0.1 ppm相当添加した試料から測定溶液調製法に従い測定溶液を調製し、グルノラクトン/ソルビトール混合物又はSFAを添加して測定して農薬回収率を確認した。GC-MS/MSへの注入容量は、従来使用している測定法の試料相当量（2.5 mg）と同じになるように40 μ Lとし、疑似マトリックスはグルノラクトン 500 ng/ソルビトール 250 ng、SFAは10成分各 50 ngが注入されるように測定溶液に添加した。その結果、回収率が70～120%の範囲に入る農薬化合物の種類に違いはあるものの、農薬数に大きな差はなかった（表1）、しかし、グルノラクトン/ソルビトール混合物の場合、試薬調製溶媒及び注入シリンジの洗浄溶媒に水を混合する必要がある、装置性能に影響を及ぼす懸念があった。そこで、疑似マトリックスとしてはSFAを採用するものとした。

表 1. 疑似マトリックスの比較

試料	疑似マトリックス	回収率70～120%となる農薬化合物数
キャベツ	グルノラクトン/ ソルビトール	283
	SFA10mix	315
りんご	グルノラクトン/ ソルビトール	314
	SFA10mix	307

次に注入する試料量を検討した。トマトに混合標準液を0.1 ppm相当添加した試料を抽出・精製し、注入容量 40 μ L 中に試料が2.5 mg または1 mg 含まれるように測定溶液を調製した。これらにSFAを添加（注入容量 40 μ Lにつき10成分各 50 ng）して測定し、回収率を比較した。その結果、回収率は、試料 2.5 mg 相当では120%を超過する農薬の割合が多く、70～120%範囲に入る農薬化合物数の割合は、測定対象数の63%であったが、1 mg 相当では76%であった（図2）。そこで、注入する試料相当量が1 mg となるように注入容量を16 μ Lとした。SFAについては10成分が各 50 ng 注入できるように、その濃度を各成分 10 μ L/mL、注入容量を5 μ Lとして装置上で自動添加できるようにした。これにより、手動で測定溶液にSFAを添加する必要がなくなったため、添加操作に起因する誤差を削減できた。

2. 測定溶液調製法の検討

測定溶液の調製について、抽出までは当所の従

来法と同様に行い、固相カラムを使用した精製法は新貝ら[2]を参考に行った。

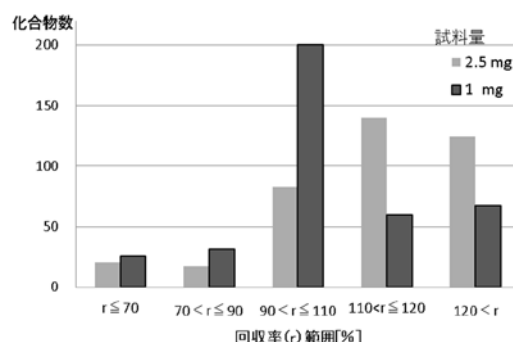


図 2. 試料注入量の比較
(試料：トマト 固相カラム 3LC 使用)

当所では従来、測定溶液調製法に示した方法に従いアセトニトリルで抽出し、その抽出液にトルエンを加えてENVI-Carb II /PSA (500 mg/ 500 mg supelco 製)で精製していた。トルエンは人体に有害であるため、この溶媒を使用せずに試料精製が可能で農薬類の回収可能な多層固相の使用を検討した。多層固相には3層固相 (3LC) とこれに色素成分などの高極性成分の除去の効果があるAL-Nがさらに積層された4層固相 (4LC) の2種類があり、まず、3LCを使用して検討した。

トマトに混合標準液を0.1 ppm相当添加した試料を測定溶液調製法に従って調製し、疑似マトリックス SFA を使用した測定法で定量して回収率を求めた（検討法）。また、同じ試料について従来法（固相カラム ENVI-Carb II /PSA で精製し、マトリックス検量線法で定量）でも測定した。検討法と従来法で回収率を比較したところ、回収率が70～120%に入る農薬数に大きな差は無かった（図3）。試験操作について検討法では、マトリックス標準液の調製が不要となり省力化できた。また、固相精製で使用する溶媒の種類・量が少なく、操作も容易で精製処理に要する時間も短縮された。

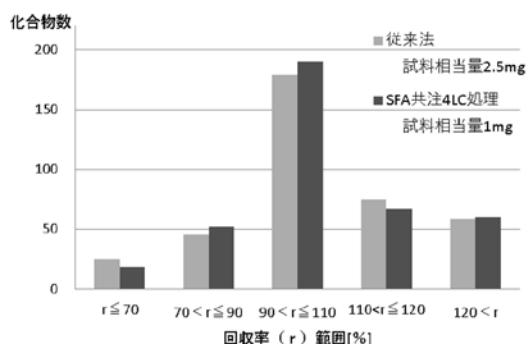


図 3. 従来法と検討法の農薬回収率の比較

次に2種の多層固相カラムで数種の野菜・果物に混合標準液を0.1 ppm相当添加した試料の抽出液を精製し、回収率を比較したところ、にんじん等の色の濃い野菜については、4LCを用いて精製した方が回収率70～120%範囲に入る農薬数が多い傾向が見られた(図4)。一方、その他の野菜・果物については回収率に3LC, 4LCの差は無かったことから、色の濃い野菜には4LCを、その他の野菜・果物には3LCを精製固相として採用するものとした。また、玄米については、4LCで回収率が良好な傾向が見られたが、再現性が悪く再度条件の確認が必要と考えている。

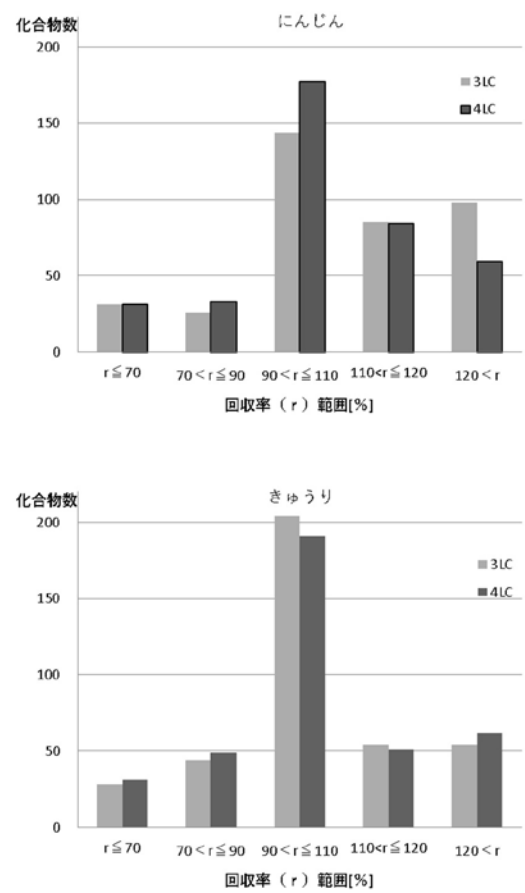


図 4. 多層固相精製による農薬添加回収結果
(回収率範囲別の農薬数の比較)

3. 妥当性評価結果

検討法について、ほうれんそう（色素成分を多く含むもの）、玄米（穀類）、さといも（でんぷんを多く含むもの）、りんご（果物）、キャベツ（硫黄成分を多く含むもの、その他）を対象とし、妥当性評価（添加濃度0.01 ppm相当、及び0.1 ppm相当）を行った（表2, 3）。精製固相は、ほうれんそう、玄米は4LC、さといも、キャベツ、りんごは3LCを使用した。妥当性評価ガイドライン[4]に従い、真度、精度（併行、室内）を確認したところ、測定対象362化合物（全成分数385）のうち282～297化合物が妥当性評価ガイドラインの目標値を満たしており、本分析法の有用性が確認された。

表 2. 妥当性評価結果まとめ
評価対象農薬化合物数：362

評価作物	ほうれんそう	玄米	さといも	りんご	キャベツ
妥当性確認数(真度・精度の目標を満たすもの)	297	282	285	295	284

文 献

1. Akutsu K, Kitagawa Y, Yoshimitsu M, et al. (2018) Anal. Bioanal. Chem, 410 (13), 3145-3160.
2. 新貝達成, 大内亜沙子, 阿部美和, 他. (2020) 宮城県保健環境センター年報 第38号, 64-68
3. 永井雄太郎, HPC News 50, 1-7 (2018)
4. 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知 食安発第1115001号（最終改正：平成22年12月24日付け食安発第1224第1号）
5. Agilent Technologies, Inc. Pesticide Analysis Reference Guide, Publication number 5991-2389EN ; 2013.

表 3. 化合物別妥当性評価結果一覧

(0.01 ppm, 0.1 ppm 相当濃度添加し, 真度, 精度ともに目標値を満たす場合を○としている)

測定化合物	精製固相		4LC		3LC	
	ほうれんそう	玄米	さといも	りんご	キャベツ	
BHC (α)	○	○	○	○	○	
BHC (β)	○	○	○	○	○	
BHC (γ)	○	○	○	○	○	
BHC (δ)	○	○	○	○	○	
BHC (γ)	○	○	○	○	○	
DCIP	×	×	×	×	×	
DDD (4,4')	○	○	○	○	○	
DDE (4,4')	○	○	○	○	○	
DDT (2,4')	○	○	○	○	○	
DDT (4,4')	○	○	○	○	○	
EPN	○	○	○	○	○	
EPTC	-----定		量	不	能 ^{c)} -----	
MCPB	○	○	○	○	○	
TCMTB	×	×	×	○	×	
XMC	-----定		量	不	能 ^{c)} -----	
アクリナトリン	○	○	○	○	○	
アザコナゾール	○	○	○	○	○	
アザメチホス	-----定		量	不	能 ^{d)} -----	
アジンホスエチル	○	○	○	○	○	
アジンホスメチル	○	○	○	○	○	
アセタミプリド	×	×	×	×	×	
アセトクロール	○	○	○	○	○	
アゾキシストロビン	○	○	○	○	○	
アトラジン	○	○	○	○	○	
アニロホス	○	○	○	○	○	
アミトラズ	○	×	×	×	○	
アメトリン	○	○	○	○	○	
アラクロール	○	○	○	○	○	
アリドクロール	○	○	○	○	○	
アルドリル	×	×	○	○	○	
ディルドリン	○	○	○	○	○	
アレスリン ^{a)}	○	×	×	○	○	
イサゾホス	○	○	○	○	○	
イソカルボホス	○	○	○	○	○	
イソキサジフェンエチル	○	○	○	○	○	
イソキサチオン	○	○	○	○	○	
イソフェンホス	○	○	○	○	○	
イソフェンホスオキシソ	○	○	○	○	○	
イソプロカルブ	○	○	○	○	○	
イソプロチオラン	○	○	○	○	○	
イプロジオン	○	○	○	○	○	
イプロジオン代謝物	×	×	×	○	×	
イプロベンホス	○	○	○	○	○	
イマザメタベンズメチルエステル ^{a)}	○	○	○	○	○	
イミベンコナゾール	○	○	○	○	○	
イミベンコナゾール脱ベンジル体	×	○	×	×	×	
インダノファン	○	○	○	○	○	
インドキサカルブ	○	○	○	○	○	
ウニコナゾール p	-----定		量	不	能 ^{d)} -----	
エスプロカルブ	○	○	○	○	○	
エタルフルラリン	○	○	○	○	○	
エチオン	○	○	○	○	○	
エチクロゼート	×	○	×	×	×	
エディフェンホス	○	○	○	○	○	
エトキサゾール	○	○	○	○	○	
エトキサゾール代謝物	×	×	×	×	×	
エトフェンプロックス	○	○	○	○	○	
エトフメセート	○	○	○	○	○	
エトプロホス	○	○	○	○	○	
エトベンザニド	○	○	○	○	○	
エトリジアゾール	×	×	×	×	×	
エトリムホス	○	○	○	○	○	
エボキシコナゾール	○	○	○	○	○	
エンドスルファン (α)	○	○	○	○	○	
エンドスルファン (β)	○	○	○	○	○	
エンドスルファンサルフェート	○	○	○	○	○	
エンドリン	○	○	○	○	○	

精製固相	4LC		3LC		
	測定化合物	ほうれんそう	玄米	さといも	りんご
オキサジアゾン	○	○	○	○	○
オキサジキシル	○	○	○	○	○
オキサベトリニル	×	×	×	○	○
オキシフルオルフェン	○	○	○	×	○
オキスポコナゾール	○	×	×	×	○
オキスポコナゾール代謝産物I(ホルミル体)	×	×	×	×	×
オメエート	○	○	×	○	×
オリザリン	×	×	×	×	×
オルトフェニルフェノール	○	○	×	×	×
カズサホス	○	○	○	○	○
カフェンストロール	○	○	×	○	○
カブタホール	×	×	×	×	×
カルフェントラゾンエチル	○	○	○	○	○
カルベタミド	×	×	×	×	×
カルボキシシン	×	×	×	×	×
カルボフェノチオン	○	○	○	○	○
カルボフラン	○	○	○	○	○
キザロホップエチル	○	○	○	○	○
キシリルカルブ	○	○	○	○	○
キナルホス	○	○	○	○	○
キノキシフェン	○	○	○	○	○
キノクラミン	○	○	○	○	×
キノメチオネート	×	×	×	×	×
キャブタン	×	×	○	— ^{b)}	×
キントゼン	○	○	○	○	○
クリミジン	○	○	○	○	○
クレソキシムメチル	○	○	○	○	○
クロゾリネート	○	○	○	○	○
クロフェンテジン(分解物)	×	○	×	○	×
クロマゾン	○	○	○	○	○
クロメトキシニル	○	○	○	○	○
クロメブロップ	○	○	○	○	○
クロリダゾン	×	×	×	×	×
クロルエトキシホス	○	○	○	○	○
クロルタールジメチル	○	○	○	○	○
クロルチオホス ^{a)}	○	○	○	○	○
クロルニトロフェン	○	○	○	○	○
クロルピリホス	○	○	○	○	○
クロルピリホスメチル	○	○	○	○	○
クロルフェナピル	○	×	○	○	×
クロルフェンソン	○	○	○	○	○
クロルフェンビンホス(α)(E)	○	○	○	○	○
クロルフェンビンホス(β)(Z)	○	○	○	○	○
クロルブファム	○	○	○	○	○
クロルプロピレート	-----定		量	不	能 ^{e)} -----
クロルプロファム	○	○	○	○	○
クロルベンシド	○	○	○	○	○
クロルメホス	○	×	×	×	×
クロロタロニル	-----定		量	不	能 ^{d)} -----
クロロネブ	○	○	○	○	○
クロロベンジレート	-----定		量	不	能 ^{e)} -----
シアナジン	○	○	○	○	○
シアノフェンホス	○	○	○	○	○
シアノホス	○	○	○	○	○
ジアリホス	○	○	○	○	○
ジエトフェンカルブ	○	○	○	○	○
ジオキサチオン	○	○	○	○	○
ジオキサベンゾホス	○	○	○	○	○
ジクロシメット ^{a)}	○	○	○	○	○
ジクロトホス	○	○	○	○	○
ジクロフェンチオン	○	○	○	○	○
ジクロブトラゾール	○	○	×	×	×
ジクロフルアニド	×	×	×	×	×
ジクロフルアニド代謝物	×	×	○	×	×
ジクロベニル	×	×	×	×	×
2,6-ジクロロベンザミド	○	○	○	○	○
ジクロホップメチル	○	○	○	○	○
ジクロラン	○	○	○	○	○
ジクロルボス	×	×	×	×	×
ナレド	×	×	×	×	×
ジコホール	-----定		量	不	能 ^{d)} -----
ジコホール(分解物)	○	○	○	○	○

精製固相	4LC		3LC		
	ほうれんそう	玄米	さといも	りんご	キャベツ
測定化合物					
ジスルホトン	○	○	○	○	○
ジスルホトンスルホン	○	○	○	○	○
ジタリムホス	×	×	×	×	×
ジチオピル	○	○	○	○	○
ジニコナゾール	×	○	×	×	×
シニドンエチル	○	○	○	○	○
シハロトリン ^{a)}	○	○	○	○	○
シハロホップブチル	○	○	○	○	○
ジフェナミド	○	○	○	○	○
ジフェニルアミン	○	○	○	○	○
ジフェノコナゾールⅠⅡ	○	○	○	○	○
シフルトリンⅠⅡⅢⅣ	○	○	○	○	○
シフルフェナミド	○	○	○	○	○
ジフルフェニカン	○	○	○	○	○
シプロコナゾール	○	○	○	○	○
シプロジニル	○	○	○	×	○
シベルメトリンⅠⅡⅢⅣ	○	○	○	○	○
シマジン	○	○	○	○	○
シメコナゾール	○	○	○	○	○
ジメタメトリン	○	○	○	○	○
ジメチピン	○	○	×	○	○
ジメチルビンホス(E)	○	○	○	○	○
ジメチルビンホス(Z)	○	○	○	○	○
ジメテナミド	○	○	○	○	○
ジメトエート	○	×	×	×	×
ジメトモルフ ^{a)}	○	○	○	○	○
シメトリン	○	○	○	○	○
ジメピペレート	○	○	○	○	○
シラフルオフエン	×	×	○	○	○
シンメチリン	○	×	○	○	○
スウエップ	○	○	○	○	○
スピロキサミン ^{a)}	×	×	×	×	×
スピロジクロフェン	○	×	○	○	○
スルプロホス	○	○	○	○	○
スルホテップ	○	○	○	○	○
ゾキサミド	○	×	×	×	×
ゾキサミド(分解物)	○	×	×	×	×
ターバシル	○	○	○	○	○
ダイアジノン	○	○	○	○	○
ダイアレート ^{a)}	○	○	○	○	○
チアベンダゾール	-----定		量	不	能 ^{d)} -----
チアメトキサム	○	○	○	○	×
チオシクラム	○	×	○	○	×
ネライストキシシ	○	×	×	×	×
チオベンカルブ	○	○	○	○	○
チオメトン	○	○	○	○	○
チフルザミド	○	○	○	○	○
テクナゼン	○	×	○	○	○
デスメディファム	-----定		量	不	能 ^{d)} -----
テトラクロロビンホス	○	○	○	○	○
テトラコナゾール	○	○	○	○	○
テトラジホン	○	○	○	○	○
テトラメトリン ^{a)}	○	○	○	○	○
テニルクロール	○	○	○	○	○
テブコナゾール	○	○	○	○	○
テブピリミホス	○	○	○	○	○
テブフェンピラド	○	○	○	○	○
テフルトリン	○	○	○	○	○
デメトン-S-メチル	○	×	○	○	○
デルタメトリン	○	○	○	○	○
テルブカルブ	○	○	○	○	○
テルブトリン	○	○	○	○	○
テルブホス	○	○	○	○	○
トリアジメノール ^{a)}	-----定		量	不	能 ^{d)} -----
トリアジメホン	○	○	○	○	○
トリアゾホス	○	○	○	○	○
トリアレート	○	○	○	○	○
トリクラミド	×	×	×	×	×
トリシクラゾール	○	×	×	○	×
トリブホス	○	○	○	○	○
トリフルラリン	○	○	○	○	○
トリフロキシストロビン	○	×	○	— ^{b)}	○

精製固相	4LC		3LC		
	ほうれんそう	玄米	さといも	りんご	キャベツ
トリルフルアニド	×	×	×	×	×
トリルフルアニド代謝物	×	×	×	○	×
トルクロホスメチル	○	○	○	○	○
トルフェンピラド	○	○	○	○	○
ナフタレンアセタミド	○	○	○	○	×
ナプロバミド	○	○	○	○	○
ニトラリン	×	○	×	○	×
ニトロタールイソプロピル	○	○	○	○	○
ニトロフェン	○	○	○	○	○
ノルフルラゾン	○	○	○	○	○
パクロブトラゾール	×	×	×	×	×
パラチオン	○	○	○	○	○
パラチオンメチル	○	○	○	○	○
ハルフェンブロックス	○	○	○	○	○
ピコリナフェン	○	○	○	○	○
ピテルタノール ^{a)}	-----定		量	不	能 ^{d)} -----
ビフェナゼート	×	×	×	×	×
ビフェニル	×	×	×	×	×
ビフェノックス	○	○	○	○	○
ビフェントリン	○	○	○	○	○
ビペロニルプトキシド	○	○	○	○	○
ビペロホス	○	○	○	○	○
ビラクロストロビン	×	○	×	○	×
ビラクロホス	○	○	○	○	○
ビラゾキシフェン	×	×	×	×	×
ビラゾホス	○	○	○	○	○
ビラフルフェンエチル	○	○	○	○	○
ピリダフェンチオン	○	○	×	○	×
ピリダベン	○	○	○	○	○
ピリフェノックス ^{a)}	○	○	○	○	○
ピリプチカルブ	○	○	○	×	○
ピリプロキシフェン	○	○	○	○	○
ピリミジフェン	○	○	○	○	○
ピリミノバックメチル (E)	○	○	○	○	○
ピリミノバックメチル (Z)	○	○	○	○	○
ピリミホスメチル	○	○	○	○	○
ピリメタニル	○	○	○	○	○
ピロキロン	○	○	○	○	○
ピンクロソリン	○	○	○	○	○
ファモキサドン	○	○	○	○	○
フィプロニル	○	○	○	○	○
フェナミホス	○	×	○	○	○
フェナリモル	○	○	○	○	○
フェントロチオン	○	○	○	○	○
フェノキサニル	○	○	○	○	○
フェノキサプロップエチル	○	○	○	○	○
フェノキシカルブ	○	○	○	○	○
フェノチオール	○	○	○	○	○
フェノチオカルブ	○	○	○	○	○
フェントリン ^{a)}	○	×	○	×	○
フェリムゾン ^{a)}	-----定		量	不	能 ^{d)} -----
フェンアミドン	○	○	○	○	○
フェンクロルホス	○	○	○	○	○
フェンスルホチオン	○	○	○	○	○
フェンチオン	○	○	○	○	○
フェントエート	○	○	○	○	○
フェンバレレート ^{a)}	○	○	○	○	○
エスフェンバレレート	○	○	○	○	○
フェンブコナゾール	○	○	○	○	○
フェンプロパトリン	○	○	○	○	○
フェンプロビモルフ	×	×	×	×	×
フェンメディファム	×	×	×	×	×
フサライド	○	○	○	○	○
ブタクロール	○	○	○	○	○
ブタフェナシル	○	○	○	○	○
ブタミホス	○	○	○	○	○
ブチレート	○	×	×	○	×
ブピリメート	○	○	○	○	○
ブプロフェジン	×	×	○	○	○
フラムプロップメチル	○	○	○	○	○
フラメトピル	○	○	○	○	○
フラメトピル代謝物	×	×	×	×	○

精製固相	4LC		3LC		
	測定化合物	ほうれんそう	玄米	さといも	りんご
フリラゾール	○	○	○	○	×
フルアクリピリム	○	○	○	○	○
フルキンコナゾール	○	○	○	○	○
フルジオキシニル	○	○	○	○	○
フルシトリネート ^{a)}	○	○	○	○	○
フルシラゾール	○	○	○	○	○
フルシラゾール代謝物	-----定	量	不	能 ^{d)} -----	
フルチアセツメチル	○	○	○	○	○
フルトラニル	○	○	○	○	○
フルトリアホール	○	○	×	○	○
フルバリネート ^{a)}	○	○	○	○	○
フルフェンピルエチル	×	×	○	○	○
フルミオキサジン	○	○	○	○	○
フルミクロラックベンチル	○	○	○	○	○
フルリドン	○	○	○	○	×
ブレチラクロール	○	○	○	○	○
プロシミドン	○	○	○	○	○
プロチオホス	○	○	○	○	○
プロバクロール	○	○	○	○	○
プロバジン	×	○	○	○	○
プロパニル	×	×	×	○	×
プロパホス	○	○	○	○	○
プロバルギット	○	○	○	○	○
プロピコナゾール ^{a)}	○	○	○	○	○
プロビザミド	○	○	○	○	○
プロヒドロジャスモン ^{a)}	○	○	○	○	○
プロフェノホス	○	○	○	○	○
プロポキシル	○	○	○	○	○
プロマシル	○	×	×	○	○
プロムコナゾール ^{a)}	○	○	○	○	○
プロメトリン	○	○	○	○	○
プロモブチド	○	×	○	○	○
プロモプロピレート	○	○	○	○	○
プロモホス	○	○	○	○	○
プロモホスエチル	○	○	○	○	○
ヘキサクロロベンゼン	×	×	×	×	×
ヘキサコナゾール	×	○	×	×	×
ヘキサジノン	-----定	量	不	能 ^{c)} -----	
ベナラキシル	○	○	○	○	○
ベノキサコール	○	○	○	○	○
ヘブタクロル	○	○	○	○	○
ヘブタクロルEpo(cis)	○	○	○	○	○
ヘブタクロルEpo(trans)	○	○	○	○	○
ペルタン	○	○	○	×	○
ペルメトリン ^{a)}	○	○	○	○	○
ベンコナゾール	○	○	○	○	○
ペンディメタリン	○	○	○	○	○
ベントキサゾン	○	○	○	○	○
ベンフルラリン	○	○	○	○	○
ベンフレセート	○	○	○	○	○
ホサロン	○	○	○	○	○
ホスチアゼート I II	○	○	○	○	○
ホスファミドン ^{a)}	○	○	○	○	○
ホスメット	○	○	○	○	○
ホノホス	○	○	○	○	○
ホルベット	×	×	×	×	×
ホルモチオン	○	×	×	×	○
ホレート	○	○	○	○	○
マラチオン	○	○	○	○	○
ミクロブタニル	○	○	○	○	○
メカルバム	×	×	×	×	×
メタクリホス	○	○	○	○	○
メタラキシル	○	○	○	○	○
メチダチオン	○	○	○	○	○
メトキシクロール	○	○	○	○	○
メトプレン ^{a)}	-----定	量	不	能 ^{d)} -----	
メトミノストロビン (E)	○	○	○	○	○
メトミノストロビン (Z)	○	○	○	○	○
メトラクロール	○	○	○	○	○
メトリブジン	○	○	○	○	○
メビンホス	○	○	○	○	○

精製固相 測定化合物	4LC		3LC		
	ほうれんそう	玄米	さといも	りんご	キャベツ
メフェナセット	○	○	○	○	○
メフェンピルジエチル	○	○	○	○	○
メプロニル	○	○	○	○	○
モノクロトホス	○	×	×	×	×
モリネート	○	○	○	○	○
レスメトリン ^{a)}	×	×	○	○	×
ジオレスメトリン	×	○	○	○	×
レナシル	○	○	○	○	○
レプトホス	○	○	○	○	○

- a) 異性体含む
b) 添加試料より農薬検出したため、定量せず
c) SFA10mixのピークと重なるため、定量不可
d) 検量線不可
e) ピーク分離できず定量不可

LC-MS/MSによる調理食品中の植物性自然毒一斉分析法の検討

堀井 裕子

Validation of Simultaneous Analysis Method
for Phytotoxins in Processed Foods by LC-MS/MS

Yuko HORII

目的：植物性自然毒による食中毒は、発生件数は少ないものの過去10年間（2013～2022年）で毎年死亡例が確認されており[1]、重大な健康被害をもたらしている。富山県においては、2021年にトリカブトによる食中毒が発生し2名が救急搬送された。これは富山県の食中毒統計が残っている1956年以来初めての事例であり、今後も予期せぬ健康被害の発生時に備えて検査体制を整備することが重要である。そこで、食中毒の発生頻度が高い有毒植物に含まれる自然毒成分を対象に高速液体クロマトグラフトアンデム質量分析装置（LC-MS/MS）を用いた多成分一斉分析法を検討し、検査対象が調理食品となる場合を想定して本法の性能評価をしたのでその結果を報告する。

方法：

1. **試料：**単一植物試料として茹でたほうれん草、生しいたけ、複数の食材を使用して調理された食品（以下、調理食品）として市販のそうざい：きのこ野菜の寄せ鍋（寄せ鍋）、レバニラの合計4種類を使用した。

2. **分析対象植物および自然毒成分：**分析対象は食中毒発生頻度が高い有毒植物8種類が含有する自然毒16成分とした（表1）。

3. **標準品および試薬等：**標準品は、リコリン：medchemexpress製、ガラントアミン：Adooq Bioscience製、コルヒチン：Focus biomolecules製、デメコルシン、アトロピン、ベラトラミン、ジェルビン、フプリフジン：Cyman chemical製、スコポラミン：Tronto Research Chemicals製、 α -ソラニン：ALDRICH製、 α -チャコニン：EXTRASYNTHESIS S.A.製を使用し、ベラトラミンとジェルビンはアセトニトリル、その他はメタノールで溶解し標準原液を調製した。アコニチン、ジェサコニチン、ヒパコニチン、メサコニチンは富士フィルム和光純薬（株）製ブシジエステ

表1. 分析対象植物および自然毒成分

植物種	自然毒成分名
スイセン、ヒガンバナ	リコリン
スノーフレーク、タマスダレ	ガラントアミン
イヌサフラン	コルヒチン
グロリオサ	デメコルシン
チョウセンアサガオ類	アトロピン
ハシリドコロ	スコポラミン
バイケイソウ類	ベラトラミン
	ジェルビン
アジサイ、アマチャ	フプリフジン
トリカブト類	アコニチン
	ジェサコニチン
	ヒパコニチン
	メサコニチン
ジャガイモ	α -ソラニン
	α -チャコニン
ツキヨタケ	イルジンS

ルアルカロイド混合標準物質（アコニチン 0.05 mg, ジェサコニチン 0.05 mg, ヒパコニチン 0.15 mg, メサコニチン 0.1 mg の混合物）を用い、アセトニトリル 2.5 mL で溶解し、標準原液とした（アコニチン 20 μ g/mL, ジェサコニチン 20 μ g/mL, ヒパコニチン 60 μ g/mL, メサコニチン 40 μ g/mL）。イルジンSは林純薬工業（株）製の1,000 μ g/mLメタノール溶液を標準原液として用いた。

上記の標準原液を用いて、リコリン、ガラントアミン、コルヒチン、デメコルシン、アトロピン、スコポラミン、ベラトラミン、ジェルビン、フプリフジン、アコニチン、ジェサコニチンは1 μ g/mL, ヒパコニチンは3 μ g/mL, メサコニチンは2 μ g/mL, α -ソラニン, α -チャコニン, イルジンSは10 μ g/mLとなるように混合し、混合標準液（メタノール溶液）を調製した。

10% (w/v) トリクロロ酢酸 (TCA): TCA 10 g を水に溶解し 100 mL とした.

固相抽出カラム: Agilent 社製 Captiva EMR Lipids 300 mg (以下 EMR Lipids), Waters 社製 Oasis PRiME HLB 150 mg (以下 PRiME HLB)

メタノールおよびアセトニトリルは LC/MS 用, その他の試薬は特級を用いた. 水は milliQ-Direct 8 で精製した超純水を使用した.

4. 装置及び測定条件

(1) 装置

LC-MS/MS: 高速液体クロマトグラフ: Waters ACQUITY UPLC H-Class, 質量分析計: Waters Xevo TQ-S micro

(2) LC-MS/MS 条件

・LC 条件

カラム: ACQUITY UPLC HSS T3 (2.1 mmL D. × 100 mm, 1.8 μ m), カラム温度: 40°C, 流速: 0.3 mL/min, 注入量: 5 μ L, 移動相 A: 5 mM ギ酸アンモニウム水溶液, 移動相 B: メタノール, グラジエント条件: A 液 99% (0 分) → 40% (3 分) → 35% (5 分) → 1% (5.5 分, 4.5 分間保持) → 99% (10 分, 5 分間保持)

・MS/MS 条件

イオン化法: ESI (+), 測定モード: SRM, キャピラリー電圧: 1.0 kV, 脱溶媒ガス流量: 600 L/hr, 脱溶媒ガス温度: 450°C, コーンガス流量: 50 L/hr, ソース温度: 150°C, 測定イオン (表 2)

5. 試験溶液調製 (図 1): 南谷の方法 [2] に準じて実施し, 詳細は既報に示した [3]. イルジン S を測定するには試験溶液を 0.2% (w/v) TCA 含有 8% (v/v) メタノール溶液でさらに 10 倍希釈した.

6. 検量線の作成: 混合標準液を 0.2% (w/v) TCA 含有 8% (v/v) メタノール溶液で希釈し, リコリン, ガランタミン, コルヒチン, デメコルシン, アトロピン, スコボラミン, ベラトラミン, ジェルビン, フブリフジン, アコニチン, ジェサコニチン 0.0005 ~ 0.02 μ g/mL, ヒパコニチン 0.0015 ~ 0.06 μ g/mL, メサコニチン 0.001 ~ 0.04 μ g/mL, α -ソラニン, α -チャコニン 0.005 ~ 0.2 μ g/mL, イルジン S 0.0005 ~ 0.01 μ g/mL の検量線用標準溶液を調製した.

7. 添加回収試験: 細切した食品試料 5 g に混合標準液を 0.5 mL 添加した. 添加濃度はリコリン, ガランタミン, コルヒチン, デメコルシン, アトロピン, スコボラミン, ベラトラミン, ジェルビン, フブリフジン, アコニチン, ジェサコニチン 0.1 μ g/g, ヒパコニチン 0.3 μ g/g, メサコニチン 0.2 μ g/g, α -ソラニン, α -チャコニン, イルジン S 1 μ g/g である. 試料は 1 種類の食品につき添加試料 5 個を調製し, 回収率および併行精度を求めた.

結果及び考察:

1. 測定条件の検討: LC 条件は南谷の方法 [4] を

表 2. 各自然毒成分の SRM 条件

自然毒成分	定量イオン m/z	コーン電圧 (V)	コリジョンエネルギー (eV)	参照イオン m/z	コーン電圧 (V)	コリジョンエネルギー (eV)
リコリン	288.2 > 147.0	25	25	288.2 > 119.0	25	35
ガランタミン	288.2 > 213.1	25	20	288.2 > 198.1	25	30
コルヒチン	400.3 > 326.1	20	24	400.3 > 310.1	20	25
デメコルシン	372.3 > 310.1	10	20	372.3 > 340.2	10	15
アトロピン	290.1 > 124.1	28	22	290.1 > 93.0	28	28
スコボラミン	304.2 > 156.1	15	15	304.2 > 138.1	15	20
ベラトラミン	410.4 > 295.3	15	30	410.4 > 114.1	15	30
ジェルビン	426.5 > 114.1	36	35	426.5 > 109.1	36	30
フブリフジン	302.1 > 120.1	12	14	302.1 > 100.0	12	22
アコニチン	646.5 > 586.5	32	30	646.5 > 105.0	32	60
ジェサコニチン	676.5 > 616.5	32	34	676.5 > 107.0	32	96
ヒパコニチン	616.5 > 556.5	36	32	616.5 > 105.0	36	64
メサコニチン	632.5 > 572.5	36	32	632.5 > 105.0	36	66
α -ソラニン	868.5 > 98.1	92	86	868.5 > 398.4	92	72
α -チャコニン	852.6 > 706.5	20	70	852.6 > 98.0	20	90
イルジン S	265.2 > 217.1	15	10	265.2 > 247.2	15	10

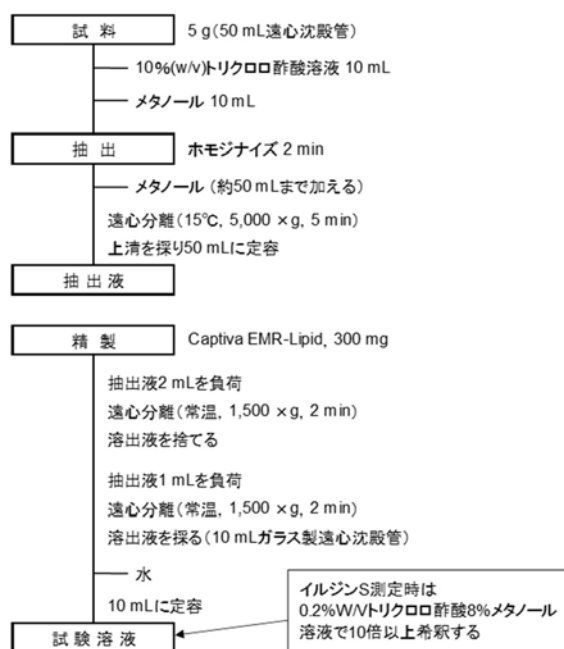


図1. 試験溶液調製法

参考に検討した。この報告ではLCの移動相に5 mM ギ酸アンモニウムとアセトニトリルを使用してスイセン、イヌサフラン等の高等植物の自然毒成分一斉分析を行っている。一方、イルジンSはこの移動相では検出できず、5 mM ギ酸アンモニウムとメタノールのグラジエント分析では良好に確認できたとし、異なる分析条件を提示している。今回はイルジンSを含めた植物性自然毒成分の一

斉分析を行うことを目的としているため、移動相については5 mM ギ酸アンモニウムとアセトニトリルまたはメタノールの2種類で測定し、ピークの検出状況を確認した。その結果、有機溶媒にメタノールを用いた場合にはすべての成分が検出されたが、既報のとおりアセトニトリルではイルジンSのみが検出できなかった。さらに、移動相の水系溶媒に酢酸アンモニウムを使用している例が報告されているため[5]、メタノールと5 mM ギ酸アンモニウムまたは5 mM 酢酸アンモニウムを移動相として標準液を測定し比較した。自然毒成分はいずれの移動相でも全て検出されたが、5 mM 酢酸アンモニウムを使用した場合には α -ソラニンの面積値は約3倍、イルジンSでは約0.5倍と検出感度が大きく異なる成分があった。今回の分析条件ではイルジンSの感度が最も低いため、イルジンSでより高い感度が得られる5 mM ギ酸アンモニウムとメタノールを移動相として用いることにした。

次にMS/MS条件の脱溶媒ガス温度について検討した。脱溶媒ガス温度を300, 350, 400, 450, 500, 550°Cに設定して標準液を測定したところ、イルジンSの面積値は300～400°Cでは変化はないが、450°C以上では温度が高くなるほど小さくなった。 α -チャコニンは450°Cで面積値が最も大きく、500°C以上では温度が高くなるほど、400°C以下では温度が低くなるほど面積値が小さくなった。その他の成分は全て550°Cで最も面積値

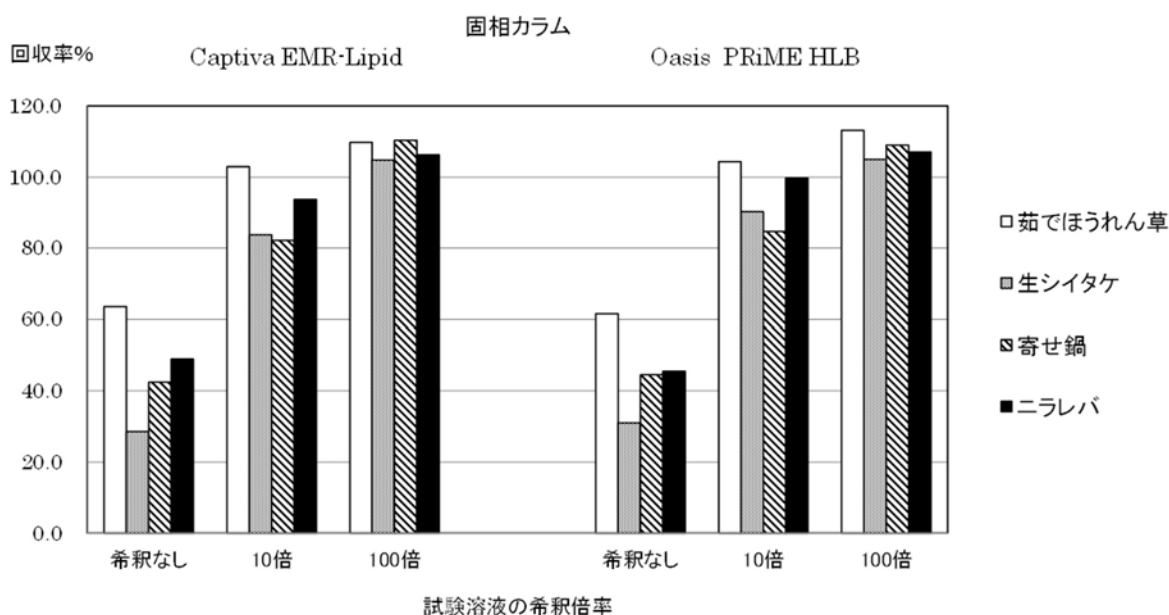


図2. 食品試料の試験溶液に添加したイルジンSの回収率

が大きく、温度が低くなるにつれて面積値も小さくなった。この結果から脱溶媒ガス温度は全ての成分の検出に最適な450℃とした。

2. 試験溶液調製法の検討：今回の検討では、単一の植物から油などで調理された食品まで、幅広い検査対象食品に対応できる分析法を確立することを目標にしている。そこで、ギョウザやカレーを対象とした場合に良好な結果が得られている南谷の方法 [2] に従って4種類の食品の抽出液を調製した。南谷はこの抽出液を固相カラム EMR Lipids で精製して試験溶液を調製しているが、脂質等の除去ができることから調理食品に有用と考えられた PRiME HLB も使用し、2種類で比較した。

4種類の食品試料から EMR Lipids を用いて調製した試験溶液からは、全ての試料において自然毒成分は検出されなかった。次にこれらの試験溶液に混合標準液を添加（添加濃度は添加回収試験と同濃度）して測定したところ、全ての添加溶液でイルジン S の回収率が70%未満と低い値であった（図2）。その他の成分は全て回収率が70%以上であった。LC-MS/MSによる分析では目的成分がイオン化されるときに、試験溶液中の夾雑成分の影響で目的成分のイオン化が抑制又は促進され、定量値が真値を示さないことがある。この対策として山口らは、試験溶液を希釈することで夾

雑成分の影響を減少させることができることを報告している [6]。そこで、先の試験溶液を0.2% (w/v) TCA 含有8% (v/v) メタノール溶液で10倍および100倍に希釈し、これらに混合標準液を添加してイルジン S の回収率を確認した（図2）。試験溶液を10倍希釈して標準液を添加した溶液では、全ての食品試料で回収率が70%以上となり、100倍希釈ではさらに回収率が向上した。この結果は PRiME HLB を用いて調製した試験溶液でも同様であった。このように、ほとんどの対象成分は夾雑成分の影響を受けず良好に測定できるが、イルジン S のみは試験溶液を10倍以上希釈する必要があることが示された。この結果はいずれの固相カラムを使用しても同様で、特に PRiME HLB に優位性はなかった。そこで、試験溶液調製には南谷の方法のとおり固相カラムは EMR Lipids を採用し、イルジン S を測定する場合は試験溶液を10倍以上希釈することとした。

3. 添加回収試験：4種類の食品に混合標準液を添加し、試験溶液調製法に従って試験溶液を調製した。イルジン S については試験溶液を10倍希釈して測定した。各食品における自然毒成分の回収率及び併行精度を表3に示す。イルジン S を除く各成分は全ての食品で回収率70%以上、併行精度10%未満であり、良好な結果であった。イルジン S は茹でほうれん草で回収率が64%とやや低く、

表3. 各試料における添加回収試験結果 (n=5)

自然毒成分	食品							
	茹でほうれん草		生シイタケ		寄せ鍋		ニラレバ	
	回収率 %	併行精度 RSD%	回収率 %	併行精度 RSD%	回収率 %	併行精度 RSD%	回収率 %	併行精度 RSD%
リコリン	77.4	3.3	85.0	2.6	85.9	4.1	82.8	1.2
ガラントミン	75.2	2.5	87.9	5.1	91.6	2.3	85.8	4.1
コルヒチン	80.2	8.3	87.8	4.3	87.9	9.3	79.9	5.9
デメコルシン	77.1	6.0	93.5	2.0	84.7	4.0	81.0	9.6
アトロピン	75.3	2.0	88.9	5.1	86.8	4.3	85.2	6.4
スコボラミン	76.8	2.5	88.3	4.2	89.8	3.7	87.6	3.6
ペラトラミン	71.4	6.5	92.0	3.3	93.1	2.1	90.3	2.1
ジェルビン	74.3	7.3	81.8	6.8	85.7	6.4	91.1	4.5
フプリフジン	73.5	3.9	82.9	7.3	89.0	2.1	81.3	8.9
アコニチン	76.4	6.3	95.1	4.4	86.6	4.1	89.6	2.7
ジェサコニチン	76.3	6.5	89.4	1.6	90.8	6.6	92.4	2.3
ヒバコニチン	79.9	5.0	91.7	3.0	90.5	3.2	93.3	4.2
メサコニチン	79.3	2.5	94.2	5.0	91.1	5.4	92.9	4.4
α-ソラニン	92.9	8.0	100.0	3.0	88.2	3.3	100.2	1.5
α-チャコニン	76.0	2.6	88.0	3.6	86.3	6.0	91.4	3.7
イルジンS*	64.3	15.1	75.9	19.8	77.7	7.7	84.6	9.8

* イルジンSは試験溶液を10倍希釈して測定

併行精度は茹でほうれん草 15.1%, 生シイタケ 19.8%とやや高い値であった。回収率, 併行精度の目標値について, 厚生労働省の事務連絡 [7] で, 健康被害防止の観点から開発される農薬等の混入を検出する検査法では回収率 50~200%, 併行精度 30%未満と示されている。今回検討した検査法は食中毒発生時の検査を想定していることから, この目標値を参考に評価し, 全ての成分が目標値を満たすことを確認した。

まとめ: 植物性自然毒による食中毒発生に備え, LC-MS/MSを用いた植物性自然毒の多成分一斉分析法を検討し, 食品試料での添加回収試験を実施した。その結果, 検討した検査法は, 単一の植物だけでなく調理食品についても適用可能であることが示された。今後は今回整備した検査法を用いて, 自然毒食中毒による健康危機発生時に迅速な対応をしていきたい。

文 献

1. 厚生労働省, 食中毒統計資料, https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/shokuhin/syokuchu/04.html (2023 年 5 月 29 日アクセス可能)
2. 南谷臣昭. (2019). 厚生労働科学研究費補助金食品の安全確保推進研究事業・植物性自然毒による食中毒対策の基盤整備のための研究: 令和元年度総括・分担研究報告書 (研究代表者: 登田美桜) 10-78
3. 堀井裕子, 中山恵理子 (2022). 富山衛研年報, 45, 104-106
4. 南谷臣昭. (2018). 厚生労働科学研究費補助金食品の安全確保推進研究事業・植物性自然毒による食中毒対策の基盤整備のための研究: 平成 30 年度総括・分担研究報告書 (研究代表者: 登田美桜) 9-30
5. 設楽紘史, 永山矩美子, 神田典子. (2017). さいたま市健康科学研究センター年報, 11, 134-137
6. 山口奈穂, 富永純司, 松本理世, 他. (2017). 熊本県保健環境科学研究所報, 47, 48-54
7. 厚生労働省医薬食品局食品安全部基準審査課事務連絡: 加工食品中に高濃度に含まれる農薬等の迅速検出法について, 平成 25 年 3 月 26 日

令和4年度富山県水道水質検査精度管理事業 (理化学検査項目)について(2022年度)

遊道 梓 健名 智子 安川 和志

Quality Control Survey of Chemical Analysis of Drinking Water in Toyama in the Fiscal Year 2022

Azusa YUDO, Tomoko KEMMEI, and Kazuyuki YASUKAWA

要旨：富山県では、1996年度より、水質検査機関における試験分析技術及び検査精度の向上を図るため、県内で水道水等の水質検査を実施している検査機関を対象に、「富山県水道水質検査精度管理実施要領」に基づく精度管理事業を実施している。この事業において、当所は配布検体の作製、参加機関から報告されたデータの集計及び解析並びに技術研修を担当している。今回、2022年度に実施した亜鉛およびその化合物（以下、亜鉛とする）、濁度の精度管理事業の調査結果について報告する。

材料と方法：

- (1) 検査項目：亜鉛、濁度
- (2) 検体の配布年月日：2022年11月8日
- (3) 参加機関：富山県内で水道水等の水質検査を実施している検査機関で、水道事業者、水道用水供給事業者、水道法第20条に規定する登録検査機関及び地方公共団体の20機関
- (4) 配布検体：亜鉛測定用検体は、検体配布前日に精製水に、電子工業用濃硝酸を10 mL/L、市販の亜鉛標準液(1000 mg/L、関東化学株式会社製)を0.65 mg/Lとなるように添加して30 L調製し1 L角型ポリビンに分注した。あらかじめ分注した順に3検体を等間隔に抜き出し、亜鉛濃度を測定したところ、そのビン間変動係数は1.0%であった。また、検体調製日の7日後(2022年11月14日)、14日後(2022年11月21日)においても亜鉛の濃度に変化はなく、配布検体間の濃度のばらつきや測定日の違いによる測定値の差は無視できる範囲であると考えられた。配布に際し、亜鉛の濃度範囲は0.1～1.0 mg/Lであると明示した。濁度測定用検体は、検体配布前日に衛生研究所の水道水に、市販の濁度標準液(100度、JSRライフサイエンス株式会社製)を0.9度となるように添加して30 L調製し1 L角型ポリビンに分注した。

あらかじめ分注した順に3検体を等間隔に抜き出し、濁度を測定したところ、そのビン間変動係数は1.2%であった。また、検体配布翌日(2022年11月9日)においても濁度に変化はなく、配布検体間の濁度のばらつきや測定日の違いによる測定値の差は無視できる範囲であると考えられた。配布に際し、濁度の範囲は0.2～2.0度であると明示した。

(5) 検査方法及び検査結果：検査は、当該検査項目の検査担当者が、日常の検査業務と同じ方法を用いて、5回の併行測定を行うこととした。この5回の併行測定値の平均値を求め、各機関の測定値として解析を行った。

(6) 集計項目

X ：各機関の測定値、 X_1 ：全機関の中央値、 X_2 ：全機関の平均値、 σ ：全機関の標準偏差

変動係数(CV%) = 各機関の標準偏差 / $X \times 100$

誤差率(E%) = $(X - X_1) / X_1 \times 100$

範囲(R) = | 最大値 - 最小値 |

Zスコア(Z) = $(X - X_2) / \sigma$

結果と考察：

(1) 亜鉛

亜鉛の精度管理には17機関が参加した。各機関の測定値を大きさの順に並べて表1に、またその度数分布を図1に示す。解析の結果、誤差率が中央値 $\pm 10\%$ の範囲から外れる機関はなかった。17機関の測定値の平均値 $\pm$ 標準偏差は0.6425 $\pm$ 0.0191 mg/Lであった。各機関内での併行測定における室内変動係数は0.2～3.9%、17機関間の室間変動係数は3.0%であった。

$\bar{X}$ -R管理図を図2に示す。A機関の測定値が平均値 ± 2 標準偏差の範囲(0.6043～0.6807 mg/L)から外れた。また、A、Q機関の範囲Rは上方管理限界値(UCL：0.0299 mg/L)を超えた。

表 1. 亜鉛 結果

検査機関	測定値 X (mg/L)	変動係数 CV% (%)	誤差率 E% (%)	範囲 R (mg/L)
A	0.5838	2.9	-9.9	0.041
B	0.6168	0.3	-4.8	0.005
C	0.6238	0.3	-3.7	0.005
D	0.6388	0.4	-1.4	0.005
E	0.6406	1.0	-1.1	0.016
F	0.6438	0.2	-0.6	0.003
G	0.6450	0.4	-0.4	0.007
H	0.6450	0.5	-0.4	0.007
I	0.6478 $\cdots X_1$	0.9	0.0	0.013
J	0.6488	1.1	0.2	0.017
K	0.6512	0.4	0.5	0.007
L	0.6512	0.5	0.5	0.008
M	0.6524	0.6	0.7	0.011
N	0.6556	0.2	1.2	0.003
O	0.6572	0.7	1.5	0.013
P	0.6590	1.2	1.7	0.020
Q	0.6618	3.9	2.2	0.059
機関数	17			
平均値 (mg/L)	0.6425 $\cdots X_2$			0.0141 $\cdots CL$
標準偏差 σ (mg/L)	0.0191			
変動係数 (%)	3.0			

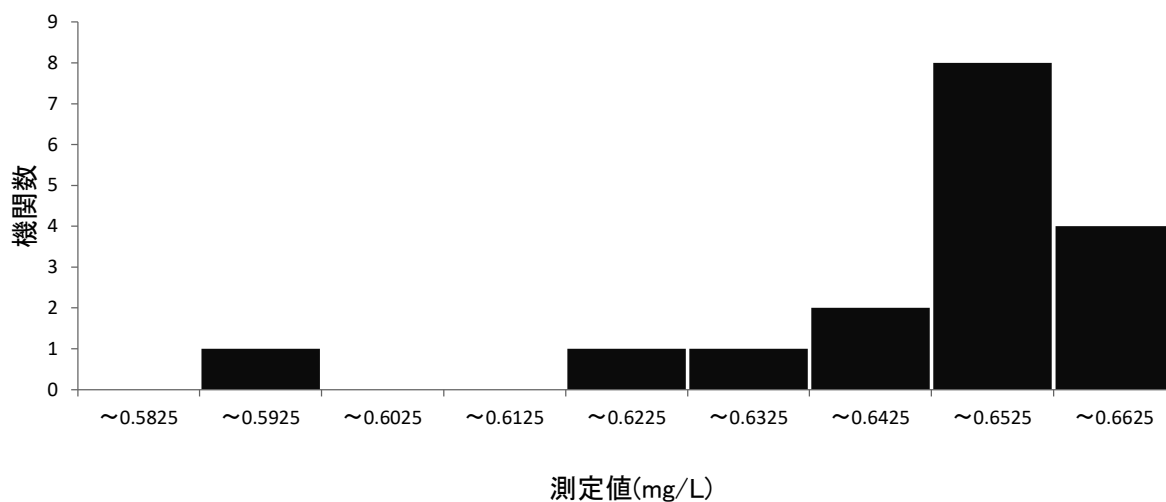


図 1. 亜鉛 ヒストグラム

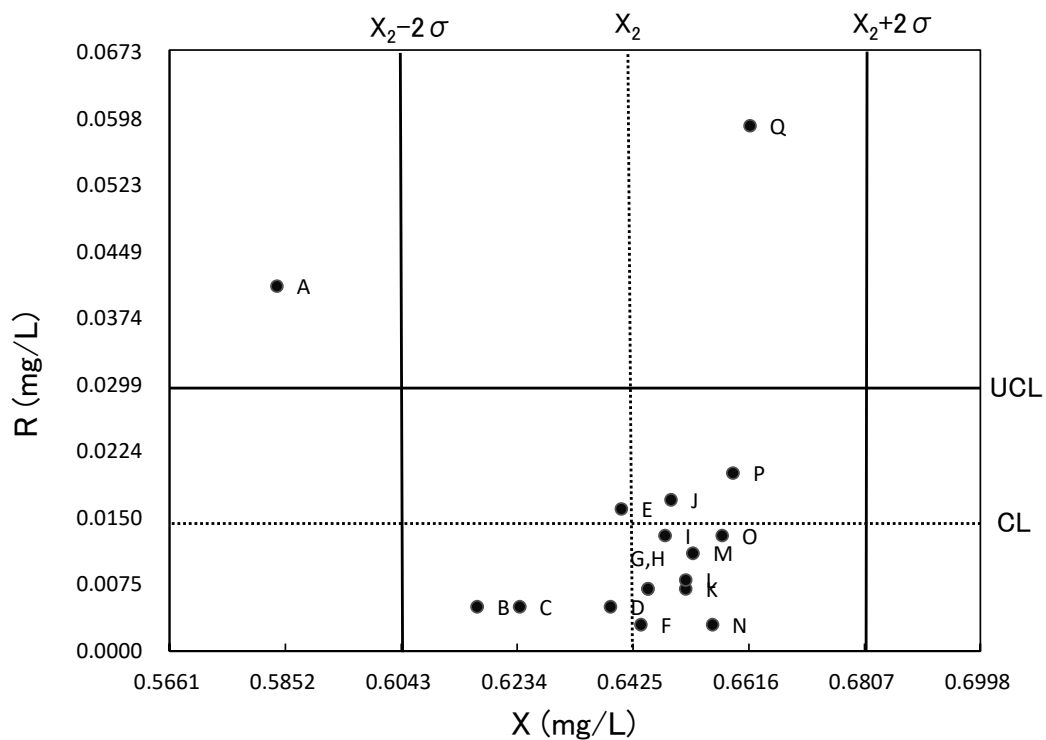


図 2. 亜鉛 Xbar-R 管理図

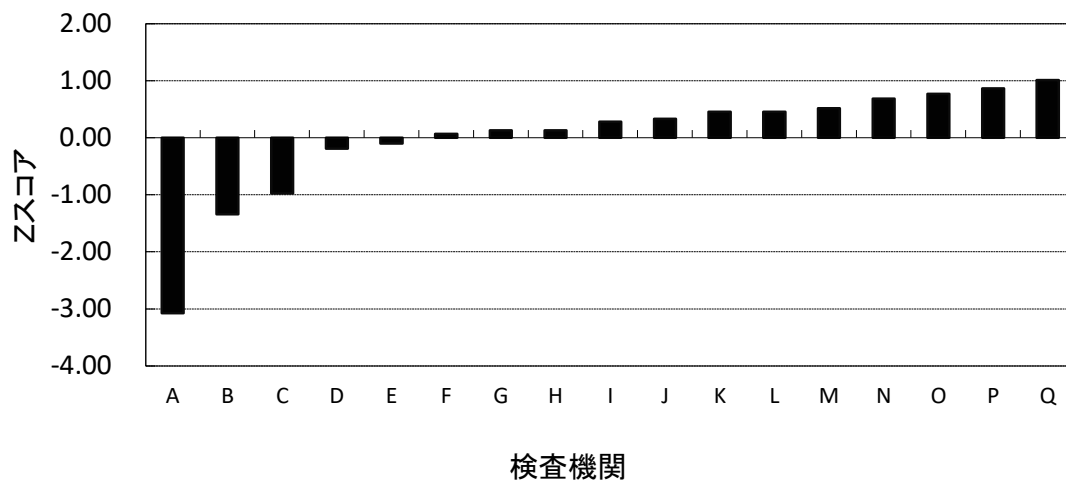


図 3. 亜鉛 Z スコアの順位

Zスコアの順位を図3に示す。Zスコアの算出には、17機関の測定値の平均値と標準偏差を用いた。Zスコアの評価基準は、 $|Z| \leq 2$ の場合を「満足」、 $2 < |Z| < 3$ の場合を「疑わしい」、 $3 \leq |Z|$ の場合を「不満足」とした。その結果、A機関が「不満足」となった。

参加した17機関のうち測定方法として誘導結合プラズマ発光分光分析法(ICP-AES)を用いた機関は1機関、誘導結合プラズマ質量分析法(ICP-MS)を用いた機関は16機関だった。水質基準に関する省令の規定に基づき厚生労働大臣が定める方法(告示法)[1]において、亜鉛は、試料採取後2週間以内に試験することとされている。今回、試料配布日～3日目までに試験を開始した機関が9機関、4～7日目が3機関、8～11日目が5機関だった。

標準原液として、市販標準原液を使用していた機関は9機関、市販混合標準原液を使用していた機関は8機関だった。ICP-AES及びICP-MSを用いた際の標準液の使用期限について、告示法では規定はされていないが、すべての機関が用時調製していると回答していた。内部標準原液として、市販標準原液を使用していた機関が13機関、市販混合標準原液を使用していた機関が4機関だった。内部標準物質について、告示法では、ICP-AESではイットリウム、ICP-MSではベリリウム、コバルト、ガリウム、イットリウム、インジウム、タリウムのいずれかを選択することが規定されている。ICP-MSを用いた機関が選択した内部標準物質の内訳は、コバルトが6機関、ガリウムが6機関、イットリウムが3機関、インジウムが1機関であった。

検量線の作成について、厚生労働省から通知されている水道水質検査方法の妥当性評価ガイドライン(妥当性評価ガイドライン)[2]では、回帰式は原点を強制的に通過させず、原則としてブランク試料を含めずに応答値が得られた濃度の標準試料のみを用いて算出すると記載されているが、1機関がブランク試料を含めた検量線を作成していた。

前処理については、すべての機関が加熱操作を実施していた。また、15機関が試料の希釈操作を行っていた。

(2) 濁度

濁度の精度管理には19機関が参加した。各機

関の測定値を大きさの順に並べて表2に、またその度数分布を図4に示す。解析の結果、誤差率が中央値 $\pm 10\%$ の範囲から外れる機関はなかった。19機関の測定値の平均値 $\pm$ 標準偏差は 0.906 ± 0.035 度であった。各機関内での併行測定における室内変動係数は $0.0 \sim 1.6\%$ 、19機関間の室間変動係数は 3.9% であった。

Xbar-R管理図を図5に示す。s機関の測定値が平均値 ± 2 標準偏差の範囲($0.836 \sim 0.976$ 度)から外れた。また、n、p機関の範囲RはUCL(0.036 度)を超えた。

Zスコアの順位を図6に示す。s機関が $2.0 < |Z| < 3.0$ となり、「疑わしい」となった。

濁度の精度管理では、すべての機関が積分球式光電光度法を採用し、日本電色工業株式会社製Water Analyzer(WA7700:2機関、WA6000:13機関、5000:1機関、2000N:3機関)を使用していた。告示法において、濁度は、試料採取後12時間以内に試験することとされている。今回、すべての機関が試料配布日に測定を実施していた。

精製水は、超純水を使用した機関が16機関、純水を使用した機関が2機関、イオン交換水を使用した機関が1機関だった。

標準原液は、告示法において「濁度標準液は濁度100度に相当する」と規定されており、すべての機関が規定に準じた市販標準液を使用していた。

定量下限値について、すべての機関が基準値の10分の1(0.2 度)以下に設定しており、 0.1 度が17機関、 0.2 度が2機関だった。

検量線の作成について、妥当性評価ガイドラインでは、各濃度点の公比が原則4以内になるように設定するよう記載されているが、公比が4を超えている機関が6機関あった。また、今回の精度管理では、あらかじめ作成された内蔵検量線に基づいて定量を行った機関が7機関、試料測定日に検量線を作成し、それを用いて定量を行った機関が12機関あった。

文 献

1. 厚生労働省(2003)、平成15年7月22日厚生労働省告示第261号
2. 厚生労働省(2007)、平成29年10月18日付け薬生水第1018第1号

表 2. 濁度 結果

検査機関	測定値 X (度)	変動係数 CV% (%)	誤差率 E% (%)	範囲 R (度)
a	0.838	1.0	-7.3	0.02
b	0.850	0.0	-6.0	0.00
c	0.866	0.6	-4.2	0.01
d	0.880	0.8	-2.7	0.02
e	0.886	0.6	-2.0	0.01
f	0.896	0.6	-0.9	0.01
g	0.898	0.9	-0.7	0.02
h	0.898	0.9	-0.7	0.02
i	0.904	0.6	0.0	0.01
j	0.904 ...X ₁	0.6	0.0	0.01
k	0.908	0.9	0.4	0.02
l	0.908	1.4	0.4	0.03
m	0.912	0.5	0.9	0.01
n	0.930	1.5	2.9	0.04
o	0.932	1.2	3.1	0.03
p	0.934	1.6	3.3	0.04
q	0.940	0.0	4.0	0.00
r	0.954	0.6	5.5	0.01
s	0.984	0.6	8.8	0.01
機関数	19			
平均値(度)	0.906 ...X ₂			0.017 ... CL
標準偏差(度)	0.035			
変動係数(%)	3.9			

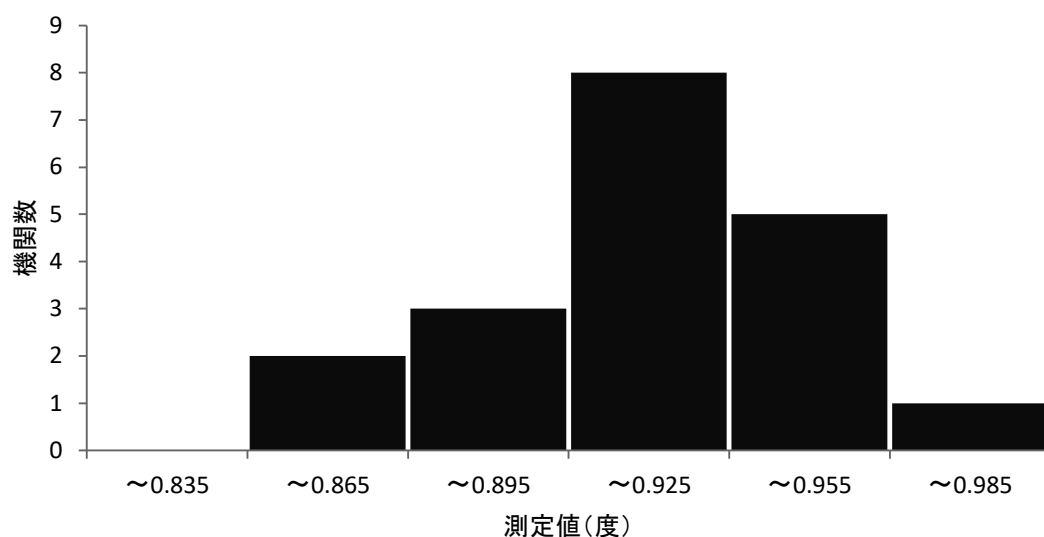


図 4. 濁度 ヒストグラム

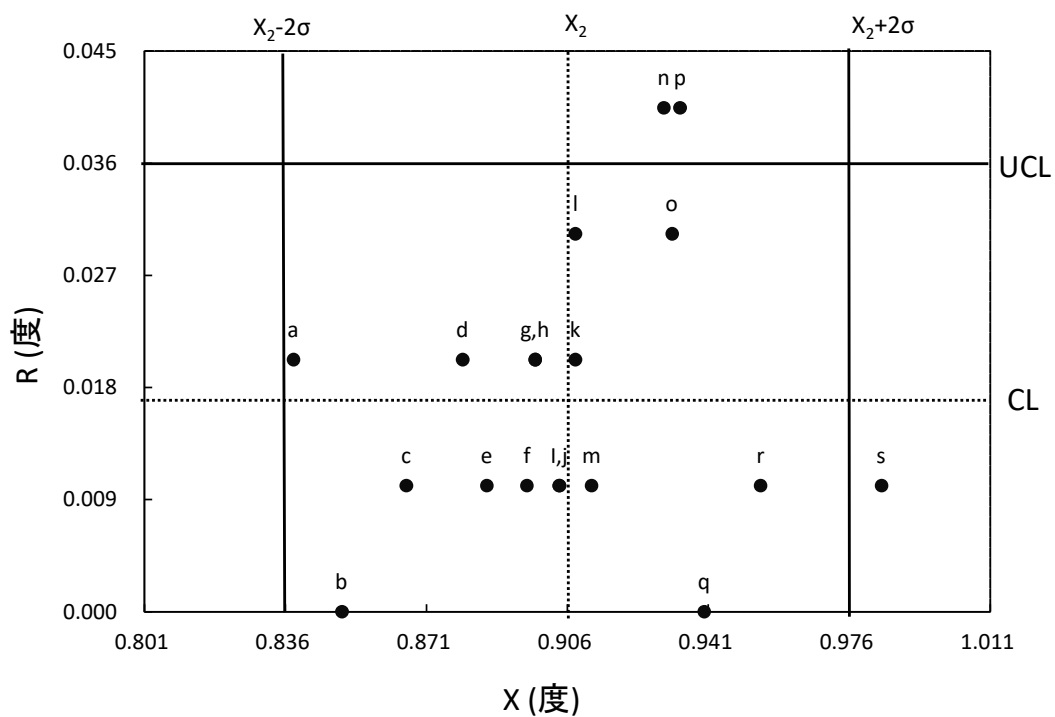


図 5. 濁度 Xbar-R 管理図

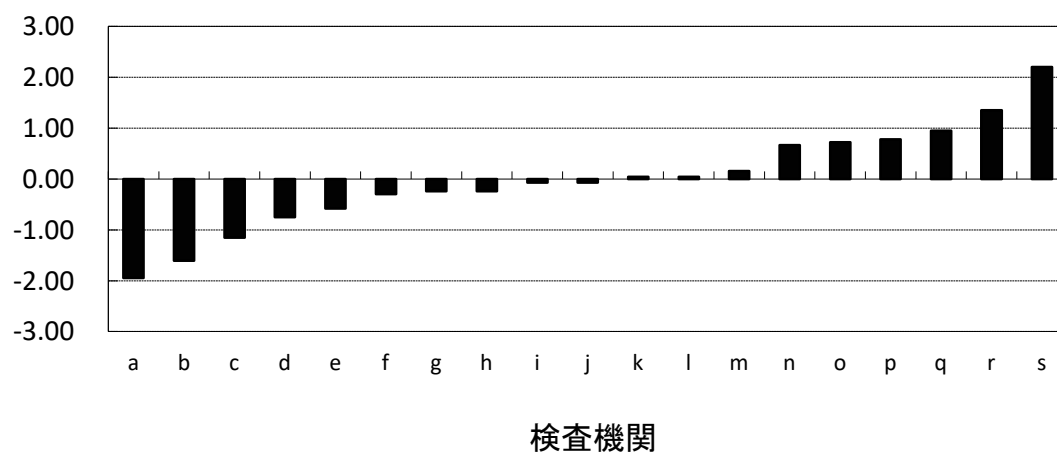


図 6. 濁度 Zスコアの順位