

Ⅱ 調 査 研 究 報 告

1. 原 著

細菌ゲノム配列情報から施設内遺伝子情報基盤データベース の構築とその活用に関する調査研究

綿引 正則 内田 薫 磯部 順子 木全 恵子
金谷 潤一 加藤 智子 大石 和徳

Construction and Utilization of In-house Genetic Infrastructure Databases from Bacterial Genome Sequence Information

Masanori WATAHIKI, Kaoru UCHIDA, Junko ISOBE, Keiko KIMATA,
Jun-ichi KANATANI, Tomoko KATO, and Kazunori OISHI

要 旨 次世代シーケンサー (NGS) による塩基配列決定技術の世界的な普及に伴い、公的 DNA データベースに登録されるゲノム配列情報も増大している。NGS から生産される膨大な配列情報を処理するゲノム解析は、主に Linux コンピュータを用いて世界的に進展しており、バイオインフォマティクスの知識が必要である。地方衛生研究所 (地研) の細菌検査部門においても、病原細菌のゲノム情報の活用は、感染源調査や病原性に関する解析等、公衆衛生上有用な情報が得られると期待されており、近年、導入が進んでいる。一方で、ヒューマンインターフェイスに優れた Windows 環境は広く普及しているが、バイオインフォマティクスの知識と Linux コンピュータの使用がメインになるため、地研におけるゲノム解析の利用は限定的であった。しかし、Windows10 の登場により WSL(Windows Subsystem for Linux) 機能が追加され、Linux 用のアプリケーションが Windows 環境でシームレスに使用出来るようになり、地研におけるゲノム解析のためのバイオインフォマティクス技術が利用しやすくなった。Windows 環境で、インターネット上に存在する膨大なゲノム配列情報を地研の細菌検査部門で利用するためには、バイオインフォマティクスの知識が必要であり、普及の壁になっていると思われる。そこで、本研究では、膨大なゲノム情報の中から、地研の細菌検査部門で有効利用できる情報を抽出し、バイオインフォマティクスの知識に依存しなくても利用を可能とする in-house データベースの構築のためのワークフローの作成とその活用法について検討した。カルバペネム耐性腸内細菌科細菌検査、腸炎ビブリオ分離株の SNP 情報のデータベース化、およびこれまで蓄積してきた病原体検出情報も同じくデータベース化し、その活用法を検討したところ、検査結果の迅速化や的確な情報発信などに寄与することが明らかになった。まだまだ発展中の分野であり、今回示したワークフローの検証を含めて、日々の業務を支援するデータベースとしてどのように維持するかが今後重要である。

近年の塩基配列決定技術の進歩は著しく、DNA シーケンサと呼ばれる塩基配列を決定する装置が普及し、地方衛生研究所 (地研) においても、検査機器の一つとして普及している。塩基配列情報は、アデニン (A)、グアニン (G)、シトシン (C) およびチミン (T) を示す AGCT の4つの塩基文字列によるテキストデータとして表現されている。そのためデータベース化しやすく、日本をはじめ、米国や欧州の3極協調による塩基配列データベース (「公的 DNA データベース」と称される；日本の場合は、DDBJ[1] が担当) が構築されており、インターネット上で誰でも自由に利用することができるのが大きな特徴である。

公衆衛生領域に限れば、感染症の原因となる微生物の塩基配列情報も日々増加しており、その活用も広がっている。例えば、1) 細菌、真菌及び原虫のリボゾーム RNA 配列解析による分子同定、2) ウイルスや細菌遺伝子の配列多型解析による病原体の遺伝系統の解析や分子疫学情報として利用した感染源や感染ルート調査への応用、3) 公開された遺伝子配列から病原微生物を解析する PCR プライマーの設計等、既に日常的な検査に利用されている。

公的データベース上の配列情報は誰でも自由に利用することが出来る、有用性の高い情報である。それをどのように利用するか、特に近年増加する

病原微生物ゲノム情報は、細菌検査の現場で有用と思われるが、食中毒細菌（例えば、病原性大腸菌やサルモネラ属菌）のゲノムサイズは約4～6Mbp（メガ塩基対）と大きく、塩基配列を解析するコンピュータとソフトウェアが必須である。さらに近年、地研においても次世代シーケンサー（NGS）の導入が進み、バイオインフォマティクス技術の必要性が増大している。NGSから生産された大量の塩基配列データは、コンピュータのOSとして、WindowsではなくUnix系のLinux上で動く様々なアプリケーションが開発されゲノム解析に広く利用されているが、WindowsユーザーにとってLinuxの利用はこれまで難しかった。しかし、Linux用のソフトをそのまま使えるようにするWSL（Windows Subsystem for Linux）機能が利用できるようになったWindows10の普及により、NGSによる細菌ゲノム解析はWindows環境で利用できるようになってきている。

地研におけるゲノム解析は、地域で分離された病原ウイルスや病原細菌が対象となる。ウイルスと細菌のゲノムサイズは、大きく異なり、そのため、ゲノム解析の手法が異なる。本調査研究においては、地研における細菌検査部門に限定する。地研の細菌検査の現場で生産される日々の遺伝子検査結果と公的DNAデータベースから得られる膨大な塩基配列情報を利用するためには、その情報を如何に利用するかが重要である。適切なソフトウェアを用いても、かなりの時間を有する。従って、日々、検査の現場で利用できる有用な遺伝子情報を抽出し、施設内で簡便に利用できるデータベースの構築は有用と思われる。あらかじめ解析に利用できるin-house（施設内）データベースとして構築しておけば、必要な情報が短時間に得られ、結果的に検査時間の短縮につながると考えられる。

インターネット上で得られる情報は膨大であり、有用な情報が存在するものの、様々なファイル形式で存在しており、有効に利用するためには必要な情報のみを抽出することが必要となる。特に遺伝子に関する情報については、それぞれ目的に応じた拡張子や様々なファイル形式が定義されている。これらのファイル形式は基本的には文字列のみのテキストデータ（plain textとも呼ばれる）から成る。従って、このような文字列から、検査や調査研究に利用できる情報を効率的に抽出することが必要である。

本調査研究は、地研の検査の現場でコンピュー

タのOSとして広く利用されているWindows環境で、細菌検査や調査研究に有用となる病原体細菌の遺伝子情報に関するin-houseデータベースを構築する方法を検討した。さらに構築したデータベースの活用法についても検討を加えたので報告する。

材料と方法

1. 使用コンピュータの環境、Webツールおよびアプリケーション

1) 使用したコンピュータは、64-bit仕様のWindows 10で、Ubuntu on Windows Subsystem for Linux (WSL)の使用及びインターネット接続環境とした。

2) Web ツール

- ・DDBJ [1], NCBI [2]: 公的DNAデータベースで、あらゆる生物の解析されたDNA配列の登録、検索（blast 検索サービス）等の利用がインターネット経由で可能。登録DNA塩基配列はgenebankファイル（拡張子gbkあるいはgb）として、遺伝子の情報と配列が記載された書式（gbkファイル）としてダウンロード可能。
- ・RAST [3]: ゲノム解析された塩基配列に遺伝子と機能を自動的に割当て（annotation）、gbkファイルやExcelファイル形式でダウンロード可能。

3) 使用ソフト

① Windows環境で使用したソフトウェアおよび使用目的は以下の通りである。

- ・CLC Genomic Workbench（フィルジェン株式会社）:de novo アセンブル

- ・秀丸エディタ [4]: テキストデータの加工（正規表現、検索、置換、grep 検索）、csvファイルからfastaファイル*変換、文字コード・改行コードの変換（WindowsからLinux）
- *fastaファイルとは、拡張子fasta, fasあるいはfa: 配列の識別名称とDNA配列を含む文字列より成るplain textのこと。

- ・エクセル（Microsoft Corp）: テキストデータの加工、抽出（関数使用）

- ・FileMaker（FileMaker Pro 16 Advanced; FileMaker, Inc）: 検索、関数を使用したテキストデータの加工とゲノム情報データベースを構築。

- ・Artemis [5]: gbkファイルを読み込み、CDS（coding sequence、蛋白質をコードする遺伝

子) 情報を視覚化およびCDS 配列 (塩基配列, アミノ酸配列) の抽出, gbk ファイルの編集.

- ・ Sequence Assistant ver2.7 [6]: 塩基配列の連結, DNA 配列の相補鎖配列の変換.

- ・ Ruby script[7]: 複数の塩基配列情報を含む multi-fasta ファイルの csv 形式への一括変換 (Windows 付属のコマンドプロンプト使用)

- ・ FastQC [8]: NGS データのクオリティチェック

- ・ trimmomatic [9]: Miseq で得られた配列情報からのアダプター除去と及び配列のトリミング.

② Linux (ubuntu on WSL) で使用したソフトおよび使用目的は以下の通りである.

- ・ nucmer [10]: 相同 (共通) CDS の抽出, および一塩基多型 (Single Nucleotide Polymorphism; SNP) の抽出

- ・ raxml-ng [11]: 系統樹作成

尚, 使用アプリケーションについては, Windows10, WSL 及び Web 上のサービスを利用した場合には, アプリケーション名や Web 上のサービス名の後に, 必要に応じて, それぞれ「/Win」, 「/Lin もしくは/Linux」 および「/Web」と付加して表記した.

2. 供試菌

SNP 解析, SNP データベースの構築とその評価のため, 腸炎ビブリオの保存株を使用した. 内訳は, 1997-8 年分離 4 株 (臨床株: 血清型 O4:K68 1 株, O3:K6 3 株), 2010 年分離 1 株 (海水からの分離株: 血清型 O3:K6) および 2016-7 年分離 3 株 (臨床株: 血清型 O3:K6), 合計 8 株である.

3. ゲノム解析, SNP 抽出

細菌分離株のゲノム配列は NGS である MiSeq (illumina, Inc) を使用し取得した. DNA ライブラリーは Nextera XT DNA Library Preparation Kit (illumina, Inc) を用いて作製し, 試薬キットは MiSeq Reagent Kit v3 (PE, 600 サイクル) を使用した. MiSeq から得られた fastq ファイルからゲノム配列の作成は, 品質トリミング後 (FastQC/Win, trimmomatic/Win), CLC Genomics Workbench/Win の De Novo アセンブルツールを用いて, contig 配列より成る fasta ファイルとして得た. 得られた配列から, 比較したい株すべてに共通に存在する CDS の抽出, および参照配列と比較した SNP の抽出には nucmer/Lin を用いた. 参照配列とゲノム配列) に共通す

る CDS を選択し, 共通の CDS のみからなる SNP 抽出用の参照配列を作成 (multi-fasta 形式) した. これを参照配列として, nucmer/Lin を利用して, 各ゲノム配列と比較し塩基の変異データを抽出し, 塩基置換部位を記述するファイル形式である vcf (variant call format) ファイル (参照配列に対する位置と塩基情報と比較配列の代替塩基情報等を含む) として出力した. この vcf ファイルから, 秀丸エディタを使って, CDS 名, 参照配列に対する位置, 参照配列塩基, 解析株の置換塩基を抽出し, csv ファイルに変換し, FileMaker にインポートして, SNP データベースとした. 今回は, 塩基置換だけでなく, 挿入と欠失 (Indel) 情報も得た.

本研究では, 腸炎ビブリオの保存株を用いた SNP データベースの構築と評価を行うため, 参照配列は *Vibrio parahaemolyticus* RIMD 2210633 のゲノム配列 (Accession No. BA000031, BA000032) を用いた.

4. 系統樹作成

FileMaker による SNP データベース上で, indel を排除し, すべての SNP 位置の塩基を Excel ファイルとしてエクスポートした. 参照配列と各株の SNP 塩基はそれぞれ Excel の連結関数を用いて連結し, 秀丸エディタにコピー, 貼り付けし, multi-fasta 形式のファイルを作成した. この fasta ファイルを用いて, raxml-ng/Lin を用いて系統樹を作成した. 系統樹の表示は, FigTree/Win[12] を用いた.

結 果

1. 遺伝子情報基盤データベースの構築: β - ラクタマーゼ遺伝子

FileMaker/Win を用いて, in-house データベースを構築した. 本データベースで収集する情報は, 主に蛋白質をコードする遺伝子 (CDS) であり, 付随する情報として, 菌種名, 株情報, accession 番号 (公的データベースで付与された受入番号), 遺伝子名, 塩基配列とアミノ酸配列及びそのサイズ (塩基数とアミノ酸数) を含み, その他, データベースの目的に応じて収集すべき情報を追加した. ここで主な情報元は, 3 つで, 1 つ目は, 公的データベース (DDBJ と NCBI) に登録されている gbk ファイル, 2 つ目は特定の遺伝子あるいは菌種に特化した遺伝子データベースで通常 fasta ファイルとして入手できる. 3 つ目

A. gbk-formated or fasta-formated files from the public database, convert to gbk file to csv file for extracting CDS data sets.

1. Viewing gbk files by Artemis/Win, extract CDS data and export to csv file.
2. Re-annotation of gbk files by RAST/Web, download Excel-formated file.
3. Download of fasta-formated specific gene databases and convert to csv file by Ruby script.

B. fasta-files of laboratory sequence data produced by NGS.

1. Annotation of gbk files by RAST/Web, download Excel-formated file.

Fig.1. Workflow of Construction of In-house Database using FileMaker/Win.

は、自施設で解析した配列データで、ゲノム解析の結果として、de novo アセンブル後、繋がった contig 配列の fasta ファイルとして得られる。登録されている細菌の完全ゲノム配列の gbk ファイルは、ファイル容量は通常約 10M バイトで、テキストデータとしては大きなファイルである。ここでこのようなファイルから抽出した情報を FileMaker にインポートすることは直接には不可能であり、FileMaker にデータインポートを可能とするファイル形式である、csv あるいは Excel ファイル形式に先ず変換が必要である。そこで本研究では、3つの情報元から得た配列情報を FileMaker にインポートするためのワークフローを Fig.1 に示した。このワークフローを利用して、薬剤耐性菌の遺伝子検査に有用と思われる β -ラクタマーゼ遺伝子情報データベースを構築した。 β -ラクタマーゼ CDS の塩基配列及びアミノ酸配列は、NCBI の Web サイト [13] からクラス A から D に分類されている β -ラクタマーゼの遺伝子配列およびアミノ酸配列の fasta 形式のファイルをそれぞれダウンロードし、ワークフローの工程に従い FileMaker にインポートし、 β -ラクタマーゼ遺伝子情報の in-house データベースとした (Fig.1A3)。 β -ラクタマーゼ遺伝子情報については、日々、新しい遺伝子情報が公的データベースに登録されており、データベースの更新や訂正を以下のように行った。DDBJ の検索 Web ツールである ARSA[1]を利用して、キーワード検索して新しい遺伝子情報を調査し、必要であれば gbk ファイルとしてダウンロードし、塩基配列とアミノ酸配列情報を抽出し、データベースに追記した (Fig.1 A1)。その結果、2,338 配列よりなる β -ラクタマーゼ遺伝子情報データベースを作成

した。その内訳は、 β -ラクタマーゼの機能別の分類では、carbapenemase 632 遺伝子、Extended Spectrum β -lactamase (ESBL) 488 遺伝子、AmpC β -lactamase 606 遺伝子およびその他の β -ラクタマーゼとして 662 遺伝子（公的データベースから得た gbk ファイル中の情報から特定できなかった β -ラクタマーゼ）を含み、クラス別収録遺伝子の分類では、 β -ラクタマーゼとして、classA 型 845 遺伝子、classB 型 252 遺伝子、classC 型 612 遺伝子、classD 型 608 遺伝子 およびその他遺伝子（公的データベースから得た gbk ファイル中の情報から特定できなかった β -ラクタマーゼ）から構成されている in-house データベースとなった。

2. β -ラクタマーゼ遺伝子配列データベースの活用

このデータベースを用いて、PCR に使用するプライマー配列が CDS 中に存在するかどうか確認が可能であり、日常的に実施される薬剤耐性菌の β -ラクタマーゼ遺伝子の PCR 検査に活用が期待できる。また、このデータベースからエクスポートして得られる β -ラクタマーゼ遺伝子配列の fasta ファイルは、ローカル blast 検索で利用可能なデータベースファイルに変換すると、検査で得られた β -ラクタマーゼ遺伝子の塩基配列から、 β -ラクタマーゼ遺伝子の遺伝子型別を簡単に行うことが可能であった。

**3. Windows による SNP データベースの構築：
腸炎ビブリオ分離株のゲノム解析と SNP
データベース**

分離株の高精度分子疫学的マーカーとして利用可能なゲノム SNP データベースを Windows 環境の FileMaker で構築した (Fig.2)。構築法とデー

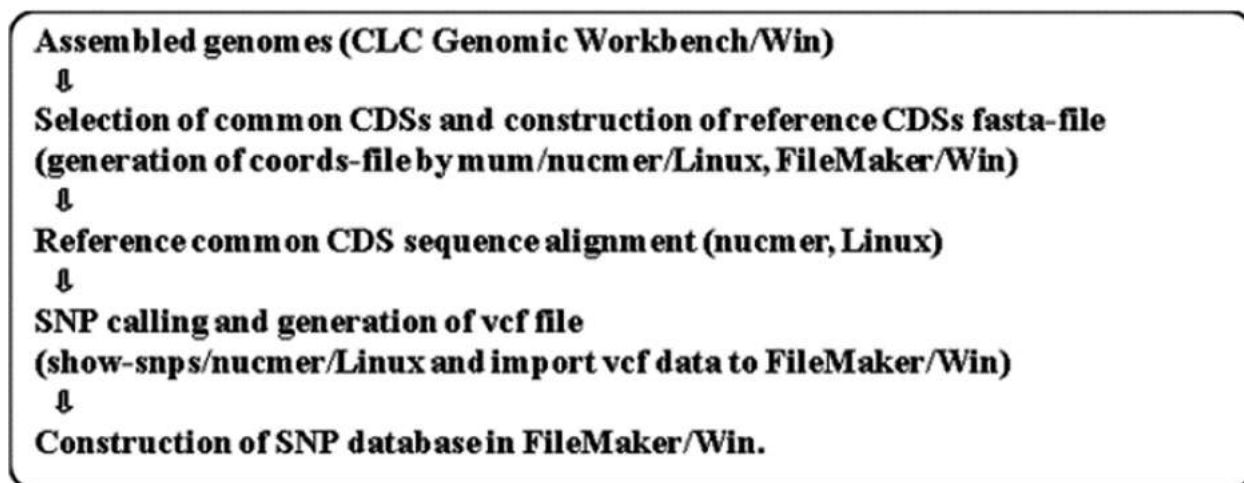


Fig.2. Workflow of Construction of SNP Databases using FileMaker/Win.

データベースの評価を行うため、1997-8年と2016-7年に分離された腸炎ビブリオ食中毒患者及び海水から分離された8株の腸炎ビブリオのゲノム配列をMiSeqより得た。得られたfastqファイルは、アダプター配列除去、品質評価後のトリミングを実施し、CLCgenomic Workbench/Winでde novoアセンブルを行い、40～60 contig配列を得た。得られた配列は、参照配列として、既に報告されているゲノム配列 (BA000031及びBA000032)と比較して、塩基置換部位 (single nucleotide variation site) を検索し、これをSNP (single nucleotide polymorphism) として利用した。SNPの抽出は、蛋白質をコードする領域 (CDS) を対象とし、2,254個のCDSからなる参照配列と8株のゲノム配列に共通に存在するCDSを対象として選択した。この共通するCDSの選択には、nucmer/Lin (-mum, オプションスイッチ使用) を使って、当所の供試8株のcontig配列から、今回は100%配列が一致したCDS (一塩基多型が存在しないため) を除き、また、2コピーあるいは部分的に2コピー以上存在するCDSも除いたところ、最終的に171個のCDSを得た。そこで参照配列からこの171個のCDS塩基配列を抽出し、multi-fastaファイルとして、これを今回、NGS解析した8株の腸炎ビブリオゲノム配列からSNP抽出に使用した。SNP抽出には、nucmerを用いてそれぞれの株の配列毎に、参照配列に対する塩基置換位置と置換塩基を検出し、vcfファイル形式で結果を得た。この結果を秀丸エディタとエクセルを用いて、必要な情報 (CDSの識別名称、CDS内の変異部位の位置情報、参照配列及び解

析株配列の塩基情報) を抽出し、FileMakerに逐次インポートし、SNPデータベースを構築した。複数株の塩基置換部位について、FileMakerへインポート時に参照配列と照合し、同一部位で既に検出されているか、あるいは新しい部位かを判定し、新しい場合にはデータを逐次追加するインポート法を採用した。今回のnucmerによる塩基変異部位の検出は、indelも検出しているため、FileMakerにインポートした後、このindelについてはすべて除去した。その結果、今回、171個のCDS (合計塩基数、180,648塩基) から、881か所でSNP座を検出した (Fig.3)。参照配列の塩基と、参照配列と較べてSNPとして検出された塩基は、大文字で、参照配列と同一塩基は小文字で標記した。また、ここで示した参照配列の「Ref_LocusCDS」フィールドで、VP239は771塩基のCDSであることを示しており、ここでは9か所のSNPが存在することを示されている。ここで例示したVP0239は *Vibrio parahaemolyticus* RIMD 2210633の第一染色体にコードされている triosephosphate isomeraseであった。

4. WindowsによるSNPデータベースの構築： 腸炎ビブリオ分離株のSNP配列による系統解析

SNPデータベースのデータを用いた系統解析のワークフローはFig.4に示した。参照株を含めたすべての株の881か所のSNPを含む塩基は、複数塩基配列をもつfasta形式のファイル (multi fasta) に変換した。作成したfastaファイルは、文字コード及び改行コードをLinux形式に変換し、raxml-ng/Linを用いて、系統樹を作成した。

Vp_SNP_db_EditedV1

ファイル(F) 編集(E) 表示(V) 挿入(I) 書式(M) レコード(R) スクリプト(S) ツール(T) ウィンドウ(W) ヘルプ(H)

23 881 合計 (ソート済み) レコード

すべてを表示 新規レコード レコード削除 検索 ソート 共有

レイアウト: VpSNP_Input original 表示方法の切り替え: プレビュー

Ref_LocusCDS	Pos	CDS_size	Ref	VP207	VP221	VP250	VP297	VP562	VP570	VP581	VP585	LocusCDS計算	LocusCDS集計
VP0003	132	1623	T	t	A	t	t	t	t	t	t	1	881
VP0015	76	114	A	a	a	a	a	a	a	T	a	1	881
VP0041	1293	2016	C	c	T	c	c	c	c	c	c	1	881
VP0083	25	198	C	c	A	c	c	c	c	c	c	1	881
VP0086	174	399	T	t	t	t	t	t	C	t	t	1	881
VP0147	431	726	A	a	a	a	a	a	G	G	a	1	881
VP0239	132	771	A	a	a	T	a	a	a	a	a	9	881
VP0239	270	771	A	a	a	T	a	a	a	a	a	9	881
VP0239	324	771	C	c	c	T	c	c	c	c	c	9	881
VP0239	366	771	T	t	t	C	t	t	t	t	t	9	881
VP0239	405	771	A	a	a	G	a	a	a	a	a	9	881
VP0239	567	771	T	t	t	C	t	t	t	t	t	9	881
VP0239	606	771	A	a	a	T	a	a	a	a	a	9	881
VP0239	615	771	A	a	a	G	a	a	a	a	a	9	881
VP0239	702	771	T	t	t	G	t	t	t	t	t	9	881
VP0240	73	348	G	g	g	T	g	g	g	g	g	7	881
VP0240	177	348	C	c	c	T	c	c	c	c	c	7	881
VP0240	243	348	G	g	g	A	g	g	g	g	g	7	881
VP0240	244	348	C	c	c	A	c	c	c	c	c	7	881
VP0240	257	348	T	t	t	C	t	t	t	t	t	7	881
VP0240	285	348	G	g	g	A	g	g	g	g	g	7	881
VP0240	307	348	C	c	c	A	c	c	c	c	c	7	881

Fig.3. Partial Depiction of SNP Database of *Vibrioparahaemolyticus* Isolates in Toyama
Dotted box shows the details of the SNP locus present in the reference CDS, VP0239.
See text for details.

Export SNP data to Excel format after searching on FileMaker/Win.

⇓

Convert the concatenated SNP data sets to multi-fasta format file (Excel, Text editor/Win).

⇓

Construction of phylogenetic trees (raxml-ng/Linux)

⇓

Veiwing of trees (FigTree/Win)

Fig.4. Construction of SNP phylogenetic tree

(Fig.5).

1997-8 年 の O3:K6 流 行 株 (VP207, VP221, VP297) と 2016-7 年 の O3:K6 株 (VP570, VP581, VP585) に加えて, 2010 年に海水から分離 O3:K3 株 (P562), 血清型が異なる VP250 (O4:K68) の 8 株では, 1997-8 年の分離株間の SNP は 6 ~ 13

違いで系統関係が極めて近いことが示されたが, 年代が上るとその SNP の違いは 100 前後であることが示された. 血清型が異なる分離株は, 遺伝的に離れており, 今回解析した血清型の異なる VP250 株と参照株 (Ref) の SNP 数は 658 であった. 今回, 解析した株のなかで最も参照配列

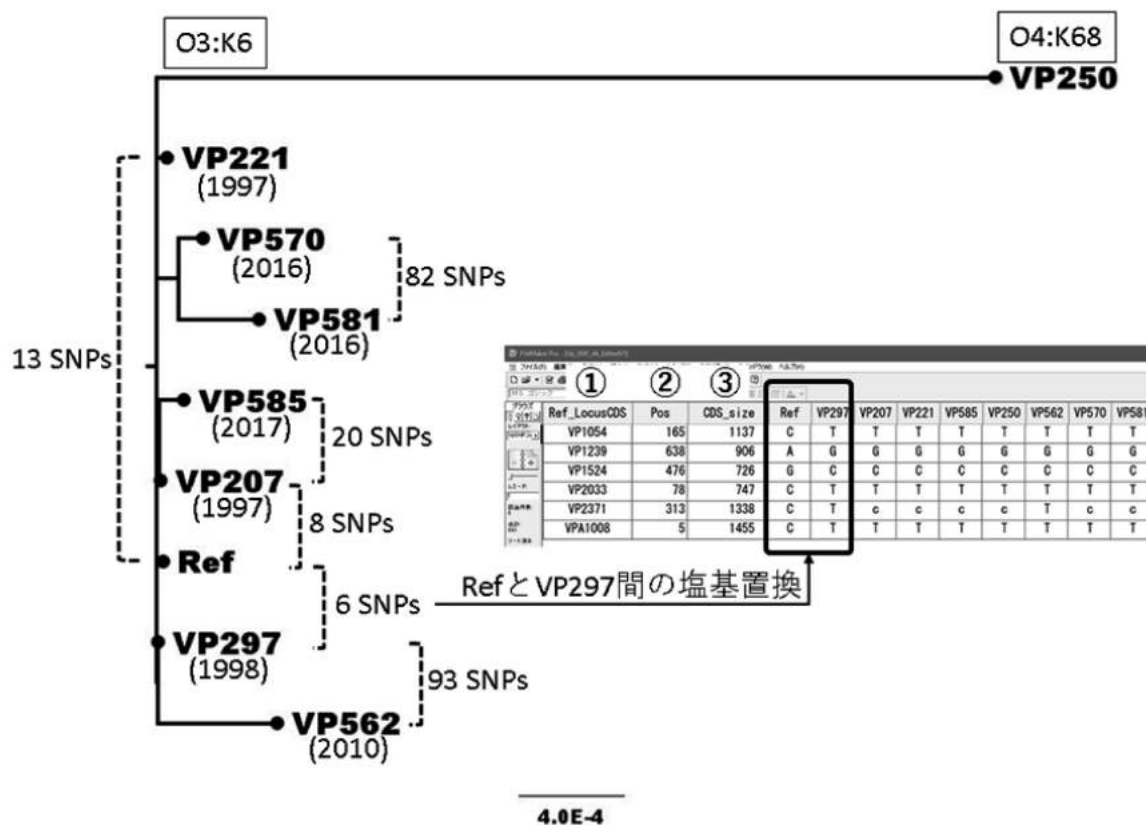


Fig.5. SNP-based Phylogenetic Tree of *Vibrio parahaemolyticus* Isolates in Toyama

Internal figure is described 6 SNPs after searching loci of base substitutions by FileMaker.

(Ref) に近縁であったのはVP297 株で、6 SNP の違いであり、PFGE パターンが同一になる可能性もあると推測される。本データベースから、参照配列のCDSにおける6つのSNP位置の特定が可能であった (Fig.5)。

5. 病原微生物検出情報データベースの構築

検体別に病原細菌の検出数の集計が記録されている2000年からの富山県病原微生物検出情報から、菌種名、分離年、分離月、分離材料に関する情報をFileMakerにインポートして、データベースを構築した。令和2年3月31日時点で、報告された分離菌株総数は、350,711株となった。検査材料別分離株数の割合は、尿及び呼吸器材料からの検出が多かった (Fig.6)。このデータベースを用いることにより、富山県で検出されている病原細菌の動態を迅速に把握することが可能となった。

考 察

細菌検査は、感染症や食中毒の原因となる病原細菌を分離し、分離した細菌の特徴を明らかにし、疾病診断や治療に資することが目的である。その中で、地研における細菌検査は公衆衛生上、感染症や食中毒が発生した場合、それが集団感染なのか、集団発生の場合、その感染源や感染ルートを明らかにし、蔓延防止に資するため、病原細菌の分離とその病原細菌の特徴を明らかにすることが求められる。また、平時においては、食品や環境中に存在する病原微生物のサーベイランスなどを行い、環境中のリスク評価を行なっている。その中で遺伝子検査は、その迅速性と再現性に優れ、得られる情報量の多さから近年、急速に普及が進み、塩基配列決定技術の需要は増大しつつある。また、ゲノム塩基配列情報が増大しているなかで、我々の検査や研究活動から生産される塩基配列情報の有効利用はいまだ限定的である。特にバイオインフォマティクスの知識が必要で、主にLinux

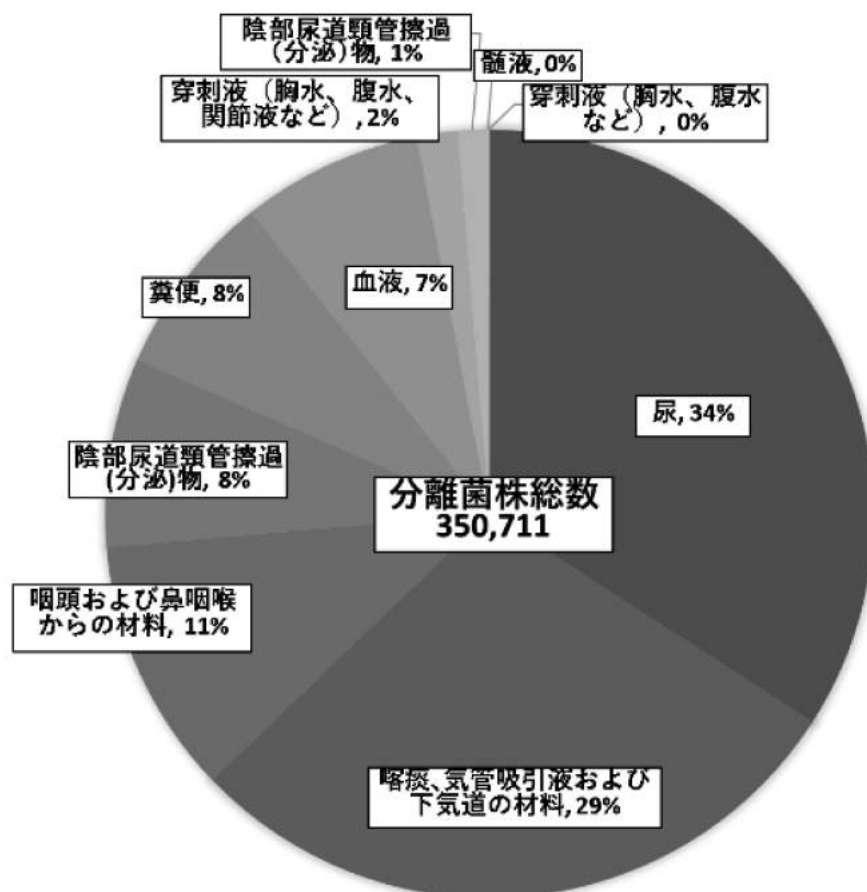


Fig.6. Isolation Rates of Pathogenic Bacteria by Clinical Specimen Detected in Toyama from 2000 to 2019.

環境で発展しており、Windowsを主に使っている現場ではその普及も限定的であった。しかし、最近発表されたWindows10の機能として追加されたWSLを利用すると、これまでLinux上で利用されてきたバイオインフォマティクス用のアプリケーションがWindowsとLinuxをシームレスで利用できるようになった。そこで本研究では、我々が必要とする情報をWindows環境で広く利用されているテキストエディタやExcelと言ったソフトの機能を使用し、様々なファイル形式で記述されている大量の情報から必要な情報を抽出し、我々が日常業務で簡単に利用できる情報に特化したデータベースの構築するためのワークフローの構築を試みた。また、その活用法を評価することも本研究の目的とした。

今回、作成したデータベースは、CRE検査に有用と思われる β -ラクタマーゼ遺伝子に関する情報、分離株の高精度分子疫学マーカーとして利用価値が高いといわれるSNP情報、さらに本県で長期にわたり蓄積されている病原微生物検出情報

に関する。何れも、FileMakerの検索機能が利用可能で、検索して得られた情報をエクスポートすることにより、blast検索や遺伝子配列に基づく遺伝子系統解析などに、すぐに利用することが可能になるというのが大きな利点である。

β -ラクタマーゼのデータベースは、カルバペネム耐性腸内細菌科細菌(CRE)感染症の起原菌の検査に有用である。地研のCREの検査は、カルバペネマーゼ産生腸内細菌科細菌(CPE)を鑑別するため、スクリーニングとしてPCR[14]を実施し、カルバペネマーゼ遺伝子の有無を確認している。CPEと決定され、医療関連感染が疑われる場合には、カルバペネマーゼ遺伝子の亜型の決定が必要になる場合がある。今回、構築した β -ラクタマーゼのデータベースから、カルバペネマーゼ遺伝子配列と亜型情報を含めた遺伝子名を出力し、予め、ローカルブラスト検索のデータベースとして準備しておく、瞬時にカルバペネマーゼ遺伝子の鑑別が可能であった。この β -ラクタマーゼのデータベースは、地研の検査の現場

では有用であり、既に複数の地研でこのデータベースの情報が利用されている。また、このデータベースを利用して、新しいPCR 検査の開発、評価に利用された[15]。

地研で有用と思われる細菌のゲノム解析の一つに SNP 解析が挙げられる。地研の役割は、分子疫学情報として利用できる遺伝子型を決定することであり、アウトブレイクの早期探知、感染源や感染ルートの特特定に欠かせない検査である。この目的に実施されている遺伝子検査法として、パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) [16], IS-Printing System [17], Mutiple-Locus Variable number tandem repeat Analysis (MLVA) [18], Multi Locus Sequencing Typing (MLST) [19] などが知られている。しかし、菌種やその検査原理により、迅速性、使い勝手、解像度やコストなどが異なり、一長一短があることも事実である。特に、PCR 法をベースにした方法は、迅速性は優れているものの解像度が低い傾向にあり、ターゲットとする遺伝子により、分子疫学マーカーとして有用性が異なり、個別に評価が必要である。しかし、一方でコストやバイオインフォマティクスの知識が必要となるが、ゲノム配列上の一塩基多型を利用した解析として、高精度疫学マーカーとして利用できる SNP 解析が注目されている。これまで既存の解析法では解像度の点で問題のあったサルモネラ属菌や結核菌は、その有用性が報告されている [20, 21]。ここで SNP 抽出は、基準となるゲノム配列 (参照配列) に対して、NGS から得られた配列を張り付けて変異塩基を抽出する。また、

参照配列として、利用するゲノム配列により、core genome (cg) MLST, whole genome (wg) MLST [22] など SNP 解析には、操作性や使い勝手により様々な方法が報告されるようになっていく。そこで、今回、データベース化しやすいと思われる、共通の遺伝子 (CDS) から SNP を抽出する cgMLST の考え方をベースとした方法を開発した。その大きな特徴は、WSL の Linux 上で SNP 抽出を行い、得られた SNP データを逐次保存可能で、どの遺伝子上の SNP として検出されたかを知ることができる。今回使用した菌種は、腸炎ビブリオ食中毒で分離された研究室保存株である。本菌における、富山県の臨床分離株の検出株数は、1998 年に 252 件とピークで、当時世界的に流行し、公衆衛生上問題となった代表的な食中毒起因菌である (Fig.7)。当時から、PFGE 解析ではほとんど区別できない流行株として血清型 O3:K6 が注目されていた。この食中毒は、最近ではほとんど報告されなくなってきたが、2016 年に同じ血清型が 16 件検出された。約 20 年前に分離された同血清型の臨床分離株の遺伝的関係を調べるため、SNP 解析を実施すると同時に SNP データベースを構築し、その有用性を評価した。その結果 1997-8 年の分離株間の SNP は 6 ~ 13 違いで系統関係が極めて近いことが示されたが、年代が上がるとその SNP の違いは 100 前後であることが示された。また、このデータベースは、参照配列の CDS と塩基置換部位を簡単に知ることができるため、塩基置換の蓄積しやすい遺伝子など推定が可能になると期待される (Fig.5)。現在、本研究のワークフローを用いて、レジオネラ菌の SNP データベースを構築し、地域で分離された株間遺伝的関係を解析するツールとしての、本 SNP データベースの有用性の評価を進めている。

FileMaker によって構築した細菌ゲノム配列情報は、地研で実施されている遺伝子検査を支援し、迅速で、的確な検査結果を提供することが期待され、今後、他の菌種についても作成中である。また、我々は、これまで感染症サーベイランスの一環として、以前から県内の定点医療機関で分離された病原微生物の検出情報を集計し、情報還元し、NESID (感染症サーベイランスシステム) のサブシステムである病原体検出情報システムにも報告している。これらの情報も FileMaker に移行し、現在、効率的な情報還元方法を検討している。今後、当所のホームページを利用した情報還元等に利用していきたい。

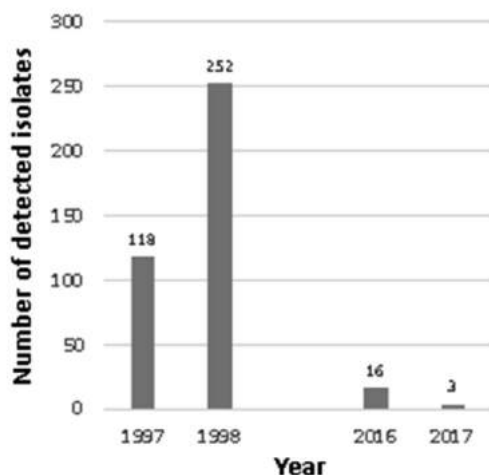


Fig.7. *Vibrioparahaemolyticus* Detected in Toyama at Specific Times.

今回、細菌ゲノム配列情報に基づいたin-houseデータベースの構築と活用法について報告した。細菌ゲノム配列情報は、日々、増大しており、新しい情報が追加されており、感染症や食中毒の流行する菌種や感染様式も時代とともに変化しているのも事実である。従って、今回、構築したデータベースも時代の変化に合わせて、修正、追加だけでなく、新しいデータベースを構築する努力も必要になる。今後は、日々の業務を支援するデータベースをどう維持していくか、システム化することが重要である。

謝 辞

この調査研究は、平成 29 ～ 31 年度の富山県重点事業「病原体の遺伝子情報基盤整備による感染症対策強化事業」により遂行された。

参考文献

1. DDBJ (DNA Data Bank of Japan) , <https://www.ddbj.nig.ac.jp/services.html> (2020 年 7 月 1 日アクセス可能)
2. NCBI (National Center for Biotechnology Information) , <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/> (2020 年 7 月 1 日アクセス可能)
3. Aziz RK, Bartels D, Best AA, et al. (2008) . BMC Genomics, 9:75
4. 秀丸エディタ , <https://hide.maruo.co.jp/software/hidemaru.html> (2020 年 7 月 1 日アクセス可能)
5. Carver T, Harris SR, Matthew Berriman M, et al. (2012) . Bioinformatics, 28 (4) , 464-469
6. Sequence Assistant Ver2.7, <http://www2s.biglobe.ne.jp/~haruta/> (2020 年 7 月 1 日アクセス可能)
7. Ruby script, <https://www.biostars.org/p/3722/> (2020 年 7 月 1 日アクセス可能)
8. FastQC, <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/> (2020 年 7 月 1 日アクセス可能)
9. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. (2014) . Bioinformatics, 30, 2114-2120
10. Marçais G, Delcher AL, Phillippy AM, et al. (2018) . PLoS Comput. Biol., 14, e1005944
11. Kozlov A, Darriba D, Flouri T, et al. (2019) . Bioinformatics, 35, 4453-4455
12. FigTree, <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/> (2020 年 7 月 1 日アクセス可能)
13. NCBI Beta-Lactamase Data Resources, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens/beta-lactamase-data-resources/> (2020 年 7 月 1 日アクセス可能)
14. 地方衛生研究所全国協議会・国立感染症研究所. (2016). 病原体検出マニュアル 薬剤耐性菌, 2016 年 12 月版
15. Watahiki M, Kawahara R, Suzuki M, et al. (2020) . Jpn J Infect Dis., 73, 166-172
16. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, et al. (1995) . J Clin Microbiol., 33, 2233-2239
17. Ooka T, Terajima J, Kusumoto M, et al. (2009) . J Clin Microbiol., 47, 2888-2894
18. Izumiya H, Pei Y, Terajima J, et al. (2010) . Microbiol.Immunol., 54, 569-577
19. Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, et al. (1998) . Proc Natl Acad Sci USA, 95, 3140-3145
20. Octavia S, Lan R. J Clin Microbiol., (2007) . 45, 3795-3801
21. Walker TM, Clp CL, Harrell RH, et al. (2013) . Lancet Infect Dis., 13, 137-146
22. Maiden MC, Van Rensburg MJ, Bray JE, et al. (2013) . Nat Rev Microbiol., 11, 728-736

Ⅱ 調 査 研 究 報 告

2. 短 報

ウイルス性胃腸炎の集団発生事例及び散発例について (令和元年度)

稲崎 倫子 頼成 明奈¹ 髙田 嵩久 佐賀由美子
長谷川澄代 板持 雅恵 小渕 正次 大石 和徳

Outbreaks and Sporadic Cases of Viral Gastroenteritis in Toyama Prefecture in the Fiscal Year 2019

Noriko INASAKI, Akina RAIJOU¹, Takahisa SHIMADA,
Yumiko SAGA, Sumiyo HASEGAWA, Masae ITAMOCHI,
Masatsugu OBUCHI, and Kazunori OISHI

要 旨 平成 31 年 4 月から令和 2 年 3 月までの 1 年間に検査したウイルス性感染性胃腸炎の集団発生事例および散発例についてまとめた。

当所および富山市保健所で受け付けた感染性胃腸炎の集団発生 11 事例からウイルスが検出された。発生時期は令和元年 12 月～令和 2 年 1 月が多かった。全体の発生数は平成 30 年度より少なく、過去 5 年間で比較すると平成 29 年度に次いで少なかった。原因と推定されたウイルスの内訳は、11 事例いずれもノロウイルス (NoV) Genogroup (G) II であった。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食中毒事例が 5 件あった。小学校で発生した事例については、感染者の吐物や糞便で汚染された手指等を介してウイルスが伝播したと考えられた。

NoV の遺伝子型は、集団発生では GII.2 が、散発例では GII.2 および GII.3 が主流であった。

ウイルス性の感染性胃腸炎や食中毒の集団発生は、主に冬季に多発し、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。一方、小児の散発例では、NoV とともに A 群ロタウイルスの占める割合が多い [2]。

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 [3]。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 [4-7]。

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 1g あたり $10^3 \sim 10^6$ 個、糞便には 10^9 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 [2,13-24]、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

平成 31 年 4 月～令和 2 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を対象とした。検体採取と疫学調査は各事例の管轄厚生

1. 富山市保健所

センター、富山市保健所で実施した。

2. 散発例

平成31年4月～令和2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）が実施した。

3. ウイルスの検出

厚生労働省通知[25]に準じ、糞便からのRNA抽出、DNase処理、逆転写反応を行い、リアルタイムPCR法およびPCR法によりNoVの検出を行った。PCR産物から、ダイレクトシーケンスによりG2-SKF/G2-SKR領域の塩基配列を決定した。

食品検体は、フィルター付き滅菌バッグに採取し、PBS(-)を加えて表面をもみ洗いした後にフィルターろ液を回収した。このろ液を5,000rpm、4℃で20分遠心後、上清を40,000rpm、4℃で2時間遠心し、沈殿をPBS(-)で懸濁した。この懸濁液について、糞便検体と同様にRNA抽出、DNase処理、逆転写反応、PCR法および塩基配列の決定を行った。

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/>)により行った。遺伝子型番号は、NoroNetの遺伝子型分類法[26]に基づき表記した。また、カプシドN/S領域の塩基配列について、近隣結合法による系統樹解析を行った。

結果および考察

1. 集団発生事例の概要

令和元年度に当所で受け付けた感染性胃腸炎の集団発生15事例のうち、9事例から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11事例の概要を表1に示す。原因ウイルスの内訳は11事例いずれもNoV GIIであった。NoVの遺伝子型は、GII.2が9事例、GII.3およびGII.4が各1事例であり、平成30年度と同様にGII.2の事例数が最も多かった[24]。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5件（No.2,5,6,7,9）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。中でも事例No.7においては、飲食店で提供された食品（漬物）から患者と共通の遺伝子型（GII.3）のウイルスが検出された。小学校で発生した事例については、感染者の吐物や糞便で汚染された手指等を介してウイルスが伝播したと考えられた。

2. 施設別発生事例数（図1）

施設別の発生数は、飲食店における発生が8事例と最も多く、小学校、宿泊施設、旅館の宴会場が各1事例であった。前年度に引き続き飲食施設における発生が多かった。

3. 月別発生事例数（図2）

月別では、12月～1月の発生が多く、1月の発生数は過去5年間と比べて多かった。全体としては平成30年度より少なく、過去5年間と比較すると平成29年度に次いで少なかった。

4. 散発例からの遺伝子型別（表2）

令和元年度に受け付けた感染性胃腸炎の小児散発例46例のうち、8例よりNoVが検出された。

表1. 令和元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	平成31年 4月	小学校	25以上	NoV GII.2	ヒト-ヒト *
2	令和元年 5月	ホテル(県外)	190	NoV GII.2	食品 **
3	6月	飲食店	6	NoV GII.2	不明
4	8月	飲食店	3	NoV GII.2	不明
5	12月	飲食店	12	NoV GII.4	食品
6	12月	飲食店	14	NoV GII.2	食品
7	令和2年 1月	飲食店	33	NoV GII.3	食品
8	1月	飲食店	8	NoV GII.2	不明
9	1月	飲食店	5	NoV GII.2	食品
10	1月	飲食店	7	NoV GII.2	不明
11	1月	旅館(宴会場)	15	NoV GII.2	不明 *

*富山市保健所にて検査

**当所及び富山市保健所にて検査

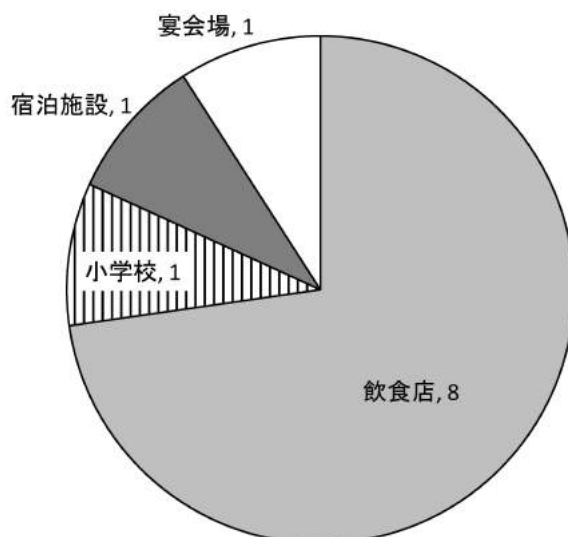


図 1. 集団発生事例の施設別発生数

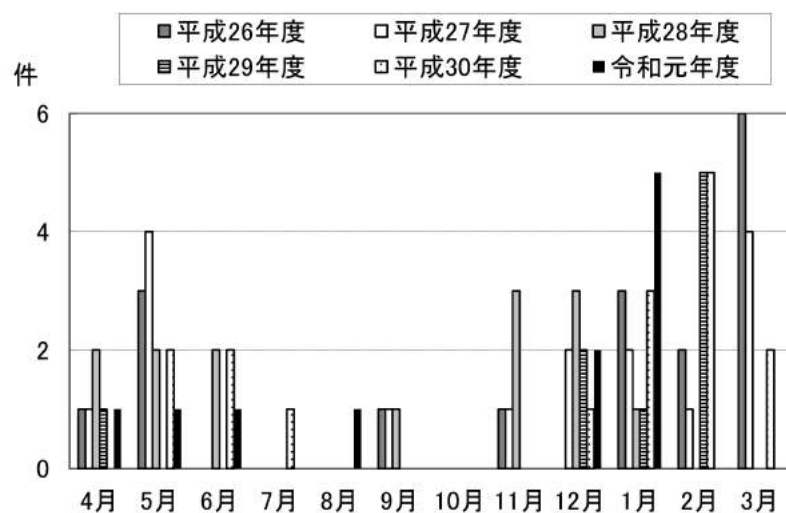


図 2. 年度ごとの月別事例発生数

表 2. 令和元年度の胃腸炎散発例からのノロウイルスの検出状況

検出月	NoV型別				計
	GII.2	GII.3	GII.4	GII.6	
平成31年 4月				1	1
令和元年 5月					0
6月	2				2
7月					0
8月					0
9月					0
10月					0
11月					0
12月		1	1		2
令和2年 1月	1	1			2
2月		1			1
3月					0
計	3	3	1	1	8

なお、その他の検出ウイルスの詳細については別途示す[27]。検出されたNoVについて遺伝子型別を行ったところ、GII.2, GII.3が各3症例, GII.4, GII.6が各1症例であり、GII.4が多かった平成30年度[24]の傾向とは異なっていた。

5. NoVの遺伝子解析 (図3)

単一の遺伝子型が原因と考えられた事例のうち、複数の検体からNoVが得られた事例は11件あり、そのうちNoVの塩基配列が100%一致していた事例は9件 (No.3-11) 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。残り2件 (No.1, 2) では、同じ遺伝子型であってもわずかに異なる配列を示す患者検体が存在した。事例No.1においては、患者6名中採取日の早い3名のグループと、採取日の遅い3名のグループの間で1塩基の配列に差がみられた。異なる配列のNoVをもつ患者が他の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。発生施設の従業員からNoVが検出された事例は4件 (No.5, 9, 10, 11) あり、検出株の塩基配列は患者株と100%一致したことから、これらの従業員は事例の感染源であったか、患者と同一感染源から感染した可能性が考えられた。

GII.2株はいずれも平成28/29年の冬季に国内外で流行したGII.2変異株 (参考株: Hu/GIIP16-GII.2/330022/Tokyo/2016/JPN) [28] に近縁であり、4月～1月にかけて集団事例および散发例から検出されたことから、令和元年度はほぼ年度を通してGII.2変異株が流行していたと考えられた。

12月から2月にかけて集団事例1例、散发例3例から検出されたGII.3は互いに近縁であり、この時期に小児を中心にGII.3が流行していたと考えられた。

GII.4は集団事例、散发例ともに12月に検出され、いずれの株もSydney 2012亜型 (参考株: Sydney/NSW0514/2012/AU, accession no. JX459908に近縁の株) [29] に分類された。令和元年度は平成25～30年度[19-24]に引き続きこの亜型がGII.4の流行の中心であったものの、流行は小規模であったと推測された。

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、健康課、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_iryou/shokuhin/syokuchu/04.html (2020年7月2日アクセス可能)
2. 宗玄俊一, 小原真弓, 長谷川澄代, 他. (2010). 小児感染免疫, 22, 23-28
3. 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).
4. Ando T, Noel JS, Fankhauser RL. (2000). J. Infect. Dis., 181, S336-348
5. Vinjé J, Green J, Lewis DC, et al. (2000). Arch. Virol., 145, 223-241
6. Kawamoto H, Yamazaki K, Utagawa E, et al. (2001). J. Med. Virol., 64, 569-576
7. Katayama K, Sirato-Horikoshi H, Kojima S, et al. (2002). Virology, 299, 225-223
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

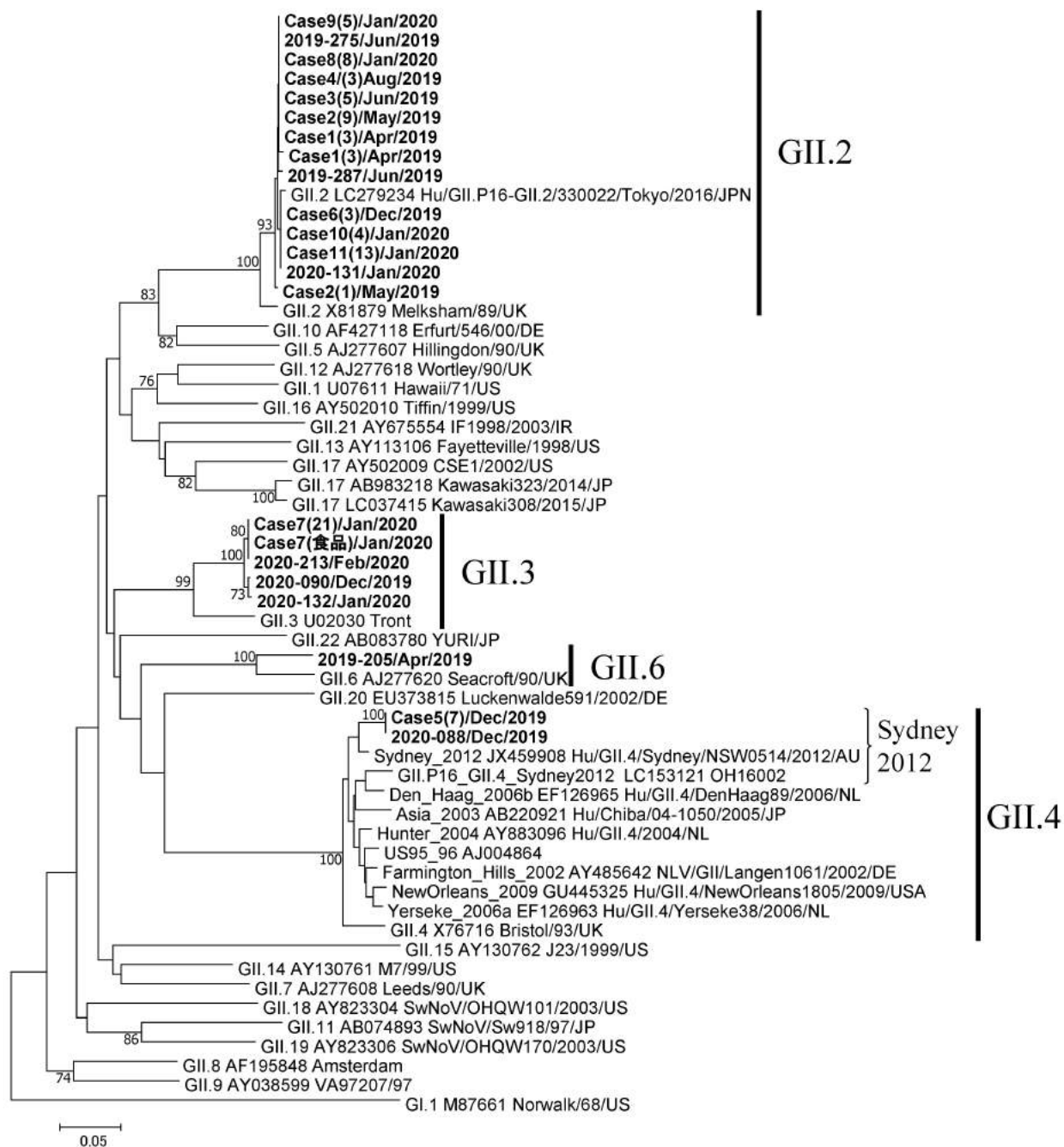


図 3. 令和元年度に得られたノロウイルス GII のカプシド N/S 領域 (282 塩基) における系統樹

分岐上の数値は、ブートストラップ値 (1000 回試行) の 70% 以上の値を示す。検体は太字で示す。集団発生事例の検体は「事例番号 (ヒト検体数または検体の種類) 発生月 / 年」、散发例の検体は「検体番号 / 発生月 / 年」で示す。参考株については「遺伝子型 accession no. 株名」で示す。GII.4 亜型の参考株については「亜型名 accession no. 株名」で示す。

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, 寫田嵩久, 他. (2019). 富山衛研年報, 42, 33-38
25. 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.
26. 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> (2020 年 7 月 2 日アクセス可能)
27. 板持雅恵, 稲崎倫子, 寫田嵩久, 他. (2020). 富山衛研年報, 43, 71-73
28. Somura Y, Mizukoshi F, Nagasawa K, et al. (2018). Jpn J Infect Dis., 71 (2) , 172-173
29. van Beek J, Ambert-Balay K, Botteldoorn N, et al. (2013). Euro Surveill., 18 (1) , 8-9

富山県における浴槽水中 *Legionella* 属菌の分離状況 (2019 年)

磯部 順子 金谷 潤一 木全 恵子 内田 薫
加藤 智子 綿引 正則 大石 和徳

Isolation of *Legionella* Species from Public Bath Water in Toyama Prefecture, 2019

Junko ISOBE, Jun-ichi KANATANI, Keiko KIMATA, Kaoru UCHIDA,
Tomoko KATO, Masanori WATAHIKI, and Kazunori OISHI

要 旨 2019 年 6 ～ 11 月に県内 11 施設から採取した浴槽水 38 検体, シャワー水 17 検体, カラン水 16 検体, 計 71 検体について, *Legionella* 属菌による汚染実態調査を実施した. 結果は以下のとおりであった.

1. 培養法による *Legionella* 属菌の検出率は全体では 16/71 (22.5%) で, 給湯方式別にみると, 浴槽水 9/38 (23.7%), シャワー水 3/17 (17.6%), カラン水 4/16 (25.0%) と, カラン水の検出率がもっとも高かった. シャワー水とカラン水では, 井戸水を使用した検体で, それぞれ 3/9 検体 (33.3%), 2/8 検体 (25.0%) と, およそ 3 割の検体で *Legionella* 属菌が検出された.
2. LAMP 法による検出率は, 全体では 30/71 (42.3%) で, その内訳は, 浴槽水 20/38 (52.6%), シャワー水 3/17 (17.6%), カラン水 7/16 (43.8%) で, 培養法に比べ LAMP 法での検出率が高かった.
3. 培養陽性検体のうち, 浴槽水 9 検体では, 非濃縮検体から *Legionella* 属菌は検出されなかったが, シャワー水 3 検体すべてと, カラン水 4 検体中 2 検体で非濃縮検体から *Legionella* 属菌が検出され, その菌数は 1,000 cfu/100mL 以上と多かった.
4. *Legionella* 属菌の検出率と残塩濃度の関連性については, *Legionella* 属菌が検出された検体では, 残塩濃度が高くなると菌数が少なくなる傾向が認められた.
5. 分離された *Legionella* 属菌は, 浴槽水, カラン水では *Legionella pneumophila* serogroup1 (Lp1), Lp6 がそれぞれ 5 検体からと多く, シャワー水では Lp1 は分離されず, Lp6 が多かった.

以上のことから, ミスト発生リスクの高いシャワー水, カラン水について, 遊離残留塩素濃度を上げるなど, 衛生管理の強化が必要であることが明らかとなった. 今後も日常的に浴用施設の衛生管理の監視と汚染実態の把握は強化・継続すべきである.

Legionella 属菌は土壌や淡水などの自然環境に広く生息するが, 近年では冷却塔, 加湿器, 循環式浴場など, 人工的な水環境にも生息域を広げている. このような環境で発生するエアロゾルや粉塵と一緒に吸入された *Legionella* 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) を起こす. 日本では温泉や循環式浴用施設を感染源とする集団感染事例が多く報告されている [1-3]. また, 2009 年には公衆浴場のシャワー水を感染源とする事例 [4] も報告され, レジオネラ症の発生と浴用施設は強く関連することが明らかとなっている.

レジオネラ症の届け出数は全国的に増加傾向であり, 2018 年には 2,130 件の報告があり, ついに 2,000 件を超えた [5]. 富山県でも同様の傾向を

示し, 2019 年の患者届出数は 54 件で, 罹患率 (人口 10 万人当たりの発生数) は, 全国と比べて高い状況であることは変わっていない [6].

そこで, レジオネラ症の感染源を明らかにし, その発生予防に資することを目的として, おもな感染源となっている浴用施設における *Legionella* 属菌による汚染実態調査を継続している. ここでは 2019 年の結果を報告する.

材料と方法

1. 対象と材料

2019 年 6 ～ 11 月に県内 11 施設から採取した浴槽水 38 検体, シャワー水 17 検体, カラン水 16 検体, 計 71 検体を試料とした. 採水は厚生セン

ターの担当者に依頼した。浴槽水は採取後直ちにハイポ入り滅菌採水瓶に入れ、採水当日に当所へ搬入された。

2. 浴槽水の濃縮と培養

検査は厚生労働科学研究 [7] の方法に従った。すなわち、検水 800 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 8.0 mL の滅菌蒸留水を加え、ボルテックスで 1 分間振盪し、100 倍濃縮試料(未処理試料)とした。*Legionella* 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 1.0 mL は pH2.2 の 0.2M 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、1.0 mL は 50℃ 20 分間ヒートブロックで加熱し、加熱処理試料とした。酸処理試料は 200 μ L を、加熱処理試料と未処理試料は 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も行なった。培地は乾燥しないよう湿潤箱に入れ、35℃ 7 日間培養した。培養 3 日目から実体顕微鏡を用いて *Legionella* 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 [8] により平板上の発育菌を観察した。

3. 同定および菌数測定

Legionella 属菌様のコロニーを血液寒天培地(栄研化学)および BCYE α 寒天培地(日本ビオメリュー)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 *Legionella* 属菌と同定した。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 100mL 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。しかし、コロニー数が極めて多く、すべてを同定できない場合には、疑わしいコロニーを 10 ~ 20 個用いて同定試験を行い、その *Legionella* 属菌の割合をもって、全 *Legionella* 属菌数を計算した。あるいは、未濃縮検体の培養平板に発育したコロニー数からその定量値を算出した。*Legionella* 属菌を認めない場合 10 cfu/100mL 未満とした。

4. 血清凝集試験

浴槽水 1 検体あたり 1 ~ 10 個の BCYE α 寒天に発育した菌を用い、病原体検出マニュアル [9]

に従い、加熱抗原を作製した。反応はレジオネラ免疫血清(デンカ生研)および *Legionella* Latex Test Kit(オキソイド)を用いて行った。

5. DNA 抽出法

新鮮分離株を 5% キレックス液(日本バイオラド)に懸濁し、100℃ 10 分の加熱処理を行い、遠心(10,000 rpm, 5 分)して得られた上清を DNA 溶液とした。

6. LAMP 法による遺伝子検査

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 LA320C 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、*Legionella* 属菌陽性とした。

7. ATP 測定法

ATP 量の測定は簡易測定キット‘ルシパックペン’(キッコーマン)により行った。キットの説明書に従って専用の測定器(ルミテスター PD-20)にキット本体を差し込み、測定器に表示された発光計測値(RLU)を ATP 量とした。

結 果

1. 浴槽水の管理状況

採水日の遊離残留塩素濃度(以下残塩濃度)別検体数を図 1 に示した。2019 年 9 月 19 日付け「生衛発 0919 第 8 号 公衆浴場における衛生等管理要領等の改正について」の中の「別添 2 公衆浴場における衛生等管理要領」で推奨される「浴槽水中の遊離残留塩素濃度を通常 0.4mg/L 程度を保ち、かつ、遊離残留塩素濃度は最大 1 mg/L を超えないよう努めること」に合わせて見ると、残塩濃度 0.4 ~ $\leq$ 1.0 mg/L の検体は、浴槽水で 13 検体 (34.2%)、シャワー水で 3 検体 (17.6%)、カラン水では 2 検体 (12.5%) であった。カラン水では、残塩濃度の低い (0.0 ~ <0.4mg/L) 検体の割合が 12 検体 (75.0%) と高く、浴槽水では残塩濃度の高い検体 (1.0 mg/L 以上) が 16 検体 (42.1%) であった。浴槽水では残塩濃度が高くなると *Legionella* 属菌検出率が低くなった。一方、調査できた浴槽水 34 検体における換水頻度は、毎日換水とした検体が 7 検体 (5 施設)、週に 2 ~ 3 回換水が 4 検体 (3 施設)、4 検体 (1 施設) は営業日毎で、多くは (19 検体, 8 施設) では 5 ~ 7 日毎の換水であった。換水頻度と *Legionella* 属菌の検出率に関連性は認められなかった(データ未掲載)。

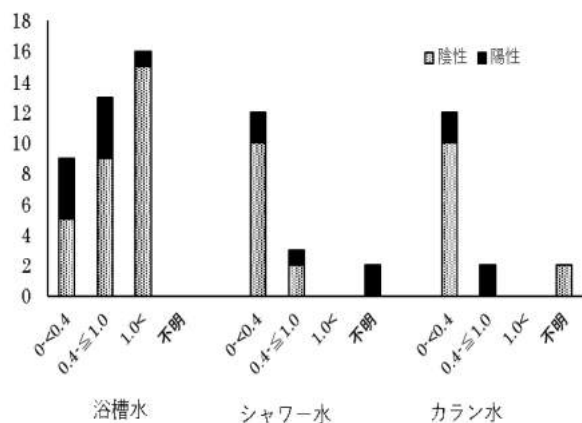


図 1. 供試検体における残塩濃度 (mg/L) の分布

2. *Legionella* 属菌検出率

Legionella 属菌の検出率を表 1, 2 に, 培養法, LAMP 法別に示した. 全体ではシャワー水の検出率は培養法と LAMP 法は同率であったが, 他は LAMP 法がおおよそ 2 倍の検出率であった. また, 浴用施設で使用されている水の泉種は, 給湯方式別に偏りがあり, 浴槽水では井戸水の検体は認められず, 19/34 検体 (55.9%) で白湯を使用していた. シャワー水およびカラン水では温泉, 薬湯, 深層水を使用している検体はなく, 井戸水の検体の割合が, シャワー水で 9/15 検体 (60.0%), カラン水で 8/14 検体 (57.1%) と高かった.

①培養法による *Legionella* 属菌検出率

培養法での検出率は全体で 16/71 (22.5%), 給湯方式別にみると, 浴槽水 9/38 (23.7%), シャワー水 3/17 (17.6%), カラン水 4/16 (25.0%) で, カラン水がわずかに高かった. 泉種別の検出率は,

浴槽水では, 白湯 5/19 検体 (26.3%), 温泉水 3/10 検体 (30.0%) であった. シャワー水とカラン水では, 白湯検体から *Legionella* 属菌は検出されなかった. それに対し, 井戸水を使用した検体では, それぞれ 3/9 検体 (33.3%), 2/8 検体 (25.0%) と, おおよそ 3 割の検体で *Legionella* 属菌が検出された. カラン水の泉種不明 2 検体ではいずれからも *Legionella* 属菌が検出された.

② LAMP 法による *Legionella* 属菌の検出

LAMP 法での検出率は, 全体で 30/71 (42.3%) で, 給湯方式別にみると浴槽水 20/38 (52.6%), シャワー水 3/17 (17.6%), カラン水 7/16 (43.8%) と, 浴槽水が高かった. 泉種別の検出率は, 浴槽水では白湯 9/19 (47.4%), 温泉 7/10 (70.0%) で, 温泉水で高かった. また, 泉種不明の 4 検体はすべてが LAMP 法陽性であった. カラン水における井戸水 5/8 検体 (62.5%) と泉種不明の 2/2 検体 (100%) で検出率が高かった.

③処理法別 *Legionella* 属菌分離菌数

培養時に夾雑菌を抑制するための処理法別 *Legionella* 属菌の検出状況 (菌数) を表 3 に示した. 浴槽水 9 検体では, 非濃縮検体から *Legionella* 属菌は検出されなかった. また, 非濃縮以外の処理法については, *Legionella* 属菌数にも大きな差は認められず, 同様の結果であった. 一方, シャワー水 3 検体すべてと, カラン水 4 検体中 2 検体で非濃縮検体から *Legionella* 属菌が検出された. 検出された *Legionella* 属菌数は, シャワー水では非濃縮検体と, それ以外の処理法との間に大きな差は認められなかったが, カラン水では, 非濃縮検体で 1,000 cfu/100ml であったにも

表 1. 給湯方式・泉種別 *Legionella* 属菌検出率 (培養法)

検水種	全体			白湯			温泉			井戸水			薬湯 or 深層水			泉種不明		
	検体数	陽性	検出率	検体数	陽性	検出率	検体数	陽性	検出率	検体数	陽性	検出率	検体数	陽性	検出率	検体数	陽性	検出率
浴槽水	38	9	23.7	19	5	26.3	10	3	30.0%	3	0	0	2	0	0	4	1	25.0%
シャワー水	17	3	17.6	6	0	0				9	3	33.3%				2		
カラン水	16	4	25.0	6	0	0				8	2	25.0%				2	2	100.0%
	71	16	22.5	31	5	16.1	10	3	30.0	20	5	25.0%	2	0	0	8	3	37.5%

表 2. 給湯方式・泉種別 *Legionella* 属菌検出率 (LAMP 法)

検水種	全体			白湯			温泉			井戸水			薬湯 or 深層水			泉種不明		
	検体数	陽性	検出率	検体数	陽性	検出率	検体数	陽性	検出率	検体数	陽性	検出率	検体数	陽性	検出率	検体数	陽性	検出率
浴槽水	38	20	52.6	19	9	47.4	10	7	70.0%	3	0	0	2	0	0	4	4	100.0%
シャワー水	17	3	17.6	6	0	0				9	3	33.3%				2		
カラン水	16	7	43.8	6	0	0				8	5	62.5%				2	2	100.0%
	71	30	42.3	31	9	29.0	10	7	70.0	20	8	40.0%	2	0	0	8	6	75.0%

関わらず、他の3法では500 cfu/100ml と非濃縮検体での菌数が多かった。

④ *Legionella* 属菌と残塩濃度

Legionella 属菌の検出率と残塩濃度との関連性を図2に示した。残塩濃度が低い時でも *Legionella* 属菌が検出されない検体が認められた。*Legionella* 属菌が検出された検体で見ると、残塩濃度が高くなると菌数が少なくなる傾向が認められた。

⑤ *Legionella* 属菌数と分離菌種

培養法、LAMP 法いずれか一方、もしくは両法で陽性となった31 検体について、培養法による定量値と分離された *Legionella* 属菌の血清型別をまとめた(表4)。培養結果の菌数が10 cfu/100mL、すなわち平板培地上に発育したのは1コロニーであったにも関わらず、分離された *Legionella* 属菌の菌種が複数となっている検体は、表4で示したように、処理方法が異なる培養を併用し、その中でもっとも多い菌数を結果としているためである。今回の調査で培養法陽性、LAMP 法陰性となった検体は認められなかった。両法共に陽性となったのは16 検体、LAMP 法陽性、培養法で陰性となった浴用水は15 検体であった。そのうち11 検体は浴槽水で、うち7 検体は循環式の浴槽水であった。これらの検体において、換水頻度や残塩濃度に関連性は認められなかった。

分離された *Legionella* 属菌は、浴槽水ではLp1、Lp6 がそれぞれ5 検体からと多く、他にはLp4、Lp5、Lp9、*L. micdadei* が各1 検体から分離された。カラン水も浴槽水と同様に、Lp1、Lp6 が3 検体からと多く分離され、他はLp3 とLp9 が各1 検体からの分離であった。これに対し、シャワー水では、Lp1 が分離された検体は認められず、Lp6 が3 検体、Lp3、Lp12、UT が各1 検体から分離された。

考 察

2019 年の全国におけるレジオネラ症患者の報告数は、2,314 件と、昨年に引き続き2,000 件を超え、右肩上がりの増加傾向は止まっていない。レジオネラ症の感染源は多様であるが、最近の集団発生事例を見ると、2017 年に発生した老人福祉施設でのポータブル加湿器を原因とする事例[10] や、2019 年の入浴施設における事例[11] の感染源・原因施設はこれまでも多く報告されてきたところと変わっていない。したがって、このような施設

表3. 培養法による処理別の *Legionella* 属菌

	ATP (RLU/10mL)	<i>Legionella</i> 属菌数 (cfu/100mL)				
		非濃縮	未処理	酸処理	加熱処理	菌数
B3	148	10	30	30	30	
B4	72	30	30	70	70	
B7	67	10				10
B17	176	350	370	310	370	
B18	54,038	10				10
B21	10		10			10
B25	18	10	10	10	10	
B34	14	40	70	20	90	
B36	249	50	80	90	90	
S2	19	3,000	>2,000	>2,000	2,460	3,000
S4	67	2,000	>2,000	>2,000	>2,000	2,000
S5	61	2,000	1,590	1,520	1,820	2,000
C1	14		80	60	180	180
C2	11	4,000	>2,000	>2,000	2,080	4,000
C10	107		260	360	240	360
C11	12	1,000	520	460	430	1,000

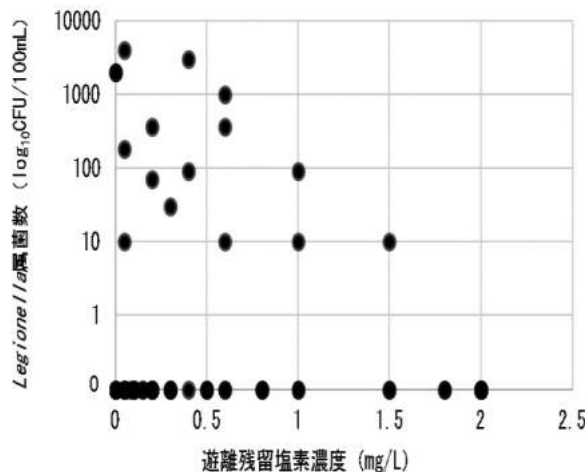


図2. 培養法による処理別の *Legionella* 属菌

設に対しては衛生管理に対する教育、指導をより丁寧継続する必要があると思われる。

富山県では、人口当たりの患者報告数は多く、全国と同様、増加傾向に歯止めがかかっていないのが現状である。これまでに原因施設の明らかとなったレジオネラ症集団感染事例は発生していないものの、多くの事例で感染源と推定されている浴用施設の衛生管理を徹底することが必要である。

本年の調査において、浴槽水における残塩濃度と *Legionella* 属菌検出率は相関したとは言えないまでも、*Legionella* 属菌が検出された検体では、その菌数が残塩濃度と逆相関していたことから、塩素による消毒は有用であると思われた。シャワー水やカラン水で *Legionella* 属菌が検出された検体では井戸水を利用しており、残塩濃度が推奨

表 4. *Legionella* 属菌が検出された検体における調査結果

No.	検体名	施設名	泉種、水源	循環／ かけ流し	換水頻度	経過 日数	遊離残留塩素 濃度 (mg/L)	ATP RLU/10mL	LAMP法 結果	培養結果 cfu/100mL	分離された <i>Legionella</i> 属菌の 血清型
B01		I	白湯	循環	1回／週	4	0.1	286	+	<10	
B03		B	白湯	循環	3回／週	4	0.3	148	+	30	Lp1, Lp6
B04		B	白湯	循環	3回／週	4	0.2	72	+	70	Lp6
B07		C	温泉	循環	毎日	1	1	67	+	10	Lp6
B09		C	温泉	循環	1回／週	5	0.8	5	+	<10	
B14		E	白湯	掛け流し	営業日毎	0	0.8	16	+	<10	
B15		G	温泉	循環	1回／週	5	0.4	1867	+	<10	
B17		G	白湯	循環	毎日	0	0.2	176	+	370	Lp1
B18		G	温泉	循環	3回／週	2	0.05	54038	+	10	Lp6
B19		H	白湯	循環	1回／週	6	0.5	10	+	<10	
B21	浴槽水	H	白湯	循環	1回／週	6	0.6	10	+	10	Lp1
B23		K	不明				1.8	10	+	<10	
B24		K	不明				1.8	44	+	<10	
B25		K	不明				1.5	18	+	10	Lp1, Lp5, Lp6
B26		K	不明				0.5	67	+	<10	
B31		A	白湯	循環	1回／週	6	0.8	13	+	<10	
B32		A	温泉	循環	1回／週	4	>2	6	+	<10	
B33		F	温泉	循環	1回／週	4	1	11	+	<10	
B34		F	温泉	循環	1回／週	4	0.4	14	+	90	Lp4, Lp9, <i>L. micdadei</i>
B36		D	白湯	循環	毎日	0	1	249	+	90	Lp1
S02		B	井戸水				0.4	19	+	3000	Lp3, Lp6, Lp12, UT
S04	シャワー水	E	井戸水				0	67	+	2000	Lp6
S05		E	井戸水				0	61	+	2000	Lp6
C01		I	井戸水				0.05	14	+	180	Lp1, Lp6
C02		B	井戸水				0.05	11	+	4000	Lp3, Lp6
C04		E	井戸水				0	37	+	<10	
C05		E	井戸水				0	65	+	<10	
C07	カラン水	G	井戸水				0	9	+	<10	
C09		H	水道水				0.05	9	+	<10	
C10		K	不明				0.6	167	+	360	Lp1, Lp9
C11		K	不明				0.6	12	+	1000	Lp1, Lp6

より低いか、全く認められなかった。とりわけカラン水では、残塩濃度の低い検体の割合が高いことから、残塩濃度を上げるなどの対策を講じるべきである。シャワー水、カラン水はミスト生成するリスクが高いことが指摘されている。前述の入浴施設における事例 [11] では、浴槽水から検出された Lp1 は 50 cfu/100 mL であった。ふき取り検体からも Lp1 は検出されているものの、この事例を参考にすると、本調査でシャワー水やカラン水で *Legionella* 属菌数が 1,000 cfu/100mL 以上という結果は、集団感染が発生してもおかしくない汚染状況であることを示している。この結果を踏まえ、厚生センター担当者が施設に対し、迅速対応を指示している。近年、浴用施設における自主管理方法として、ATP を活用している施設が多く、富山県においても監視指導の目安としている。しかしながら、カラン水やシャワー水については、ATP の値と *Legionella* 属菌による汚染度合が相関しないことが報告されている [12]。したがって、シャワー水やカラン水の衛生管理に際し、衛生状態をどのように把握し、清掃するタイミングを探知するか、解決されていない課題である。一方、ATP が高い検体では、夾雑菌の存在により、

Legionella 属菌の発育が抑制される場合があることから、検査の際には有用な情報となる [8]。

2019 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」が通知され、技術的助言という範囲を超えないものの、「公衆浴場における浴槽水等のレジオネラ属菌検査方法」が示された。これによると、「原則として非濃縮検水と濃縮検水の両方を検査する」とことと示されている。当所ではこれまでも非濃縮検体も検査対象として検査してきたが、今回の調査において、*Legionella* 属菌数の多い検体で、この非濃縮検体の検査が有用であることが改めて確認できた。非濃縮で *Legionella* 属菌が検出される検体の場合、検査に供した 100 μ L に偶発的に *Legionella* 属菌が入ってしまう場合を除き、多くは *Legionella* 属菌数が非常に多い検体である。このような検体では、通常の濃縮検体の培養法では発育菌数がきわめて多く、平板上のコロニーを正確に測定できない、もしくは、平板上に発育阻害を受けるなどの理由から、検査精度が落ちることが懸念されていた。したがって、非濃縮検体による検査は、とりわけ汚染度合の高い、すなわちレジオネラ症の感染源となり得るリスク

の高い施設の汚染状況を把握するために有用な方法となる。今回の調査において、未処理、酸処理、加熱処理で *Legionella* 属菌の検出度合に差は認められなかったが、森本が報告 [8] しているように、同時に検出される夾雑菌の種類や菌数によって、*Legionella* 属菌の検出率が大きく変わることを、あるいは *Legionella* 属菌自体が、酸や熱に耐性を示す場合があることから、検査は常に3法を併用することが望ましい。

近年は、感染症の検査にも遺伝子検査法が多く取り入れられている。レジオネラ検査においても例外ではなく、「レジオネラ症防止指針第4版」、また、上述した「公衆浴場における浴槽水等のレジオネラ属菌検査方法」の中でも遺伝子検査法が記載され、検査の迅速性が高まることが期待されている。富山県では、以前から浴槽水検査に LAMP 法を併用し、浴槽水中の *Legionella* 属菌の存在履歴を証明してきた。今回の調査に限らず、培養法と LAMP 法ですべての結果が一致することはほとんどない。とりわけ、*Legionella* 属菌数が少ない検体では、濃縮液の一部を検査に供する方法であるため、確率の問題から結果にばらつきが出る場合がある。あるいは、検体中の PCR 反応阻害物質の存在によっては、培養陽性、LAMP 法陰性となる場合も考えられる。逆に、培養陰性、遺伝子陽性の結果については、死菌 DNA の存在が考えられる [13]。現在は、Etidium monoazide (EMA) による死菌 DNA を除去する方法を取り入れた検査試薬も市販され、今後普及するものと思われる。しかしながら、近年、培養法では検出できない *Legionella* 属菌の存在が報告 [14] され、遺伝子検査法のみ陽性という結果は、死菌 DNA を検出しているだけではないことに注意しなければならない。このことから、*Legionella* 属菌の検査には遺伝子検査法の併用が望まれる。

富山県におけるレジオネラ症の罹患率（対人口 10 万人あたりの患者発生数）は、調査が始まった 2007 年より上位に位置し、対策が必要である。富山県では厚生部生活衛生課の主導のもと、2014 年から浴槽水の管理のため、*Legionella* 属菌による汚染状況の監視体制を強化している。また、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も制定するなど、行政指導を強化している。しかしながら、感染源が特定される患者は少なく、行動調査の中から利用した浴用施設の衛生管理状況や *Legionella* 属菌検査を実施するにとどまっている。富山県では、聞き取り調査などからレジオ

ネラ症のおよそ 4 割が公衆浴場などを利用していることが判明している。新たな感染源が特定できないまでも、この 4 割の患者を減らすことは大きな目標である。そのためにも、今後、日常的に浴用施設の衛生管理を監視する体制の強化と汚染実態の把握は継続すべきである。

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浴用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). 感染症誌, 79, 365 - 374
2. Nakamura H, Yagyu H, Kishi K, et al. (2003). Intern Med, 42, 806 - 811
3. 厚労省生活衛生技術研修「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> (令和 2 年 6 月 15 日アクセス可能)
4. 国立感染症研究所. (2010). 病原微生物検出情報, 31, 331-333, <http://idsc.nih.go.jp/iasr/index-j.html> (令和 2 年 5 月 15 日アクセス可能)
5. 国立感染症研究所 IDWR 速報データ 2018 第 52 週 <https://www.niid.go.jp/niid/ja/reference.html> (令和 2 年 6 月 20 日アクセス可能)
6. 国立感染症研究所 IDWR 速報データ 2019 第 52 週 <https://www.niid.go.jp/niid/ja/data/9289-idwr-sokuho-data-j-1952.html> (令和 2 年 6 月 20 日アクセス可能)
7. 倉 文明, 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・公衆浴場等におけるレジオネラ属菌対策を含めた総合的衛生管理手法に関する研究. (平成 24 年度総括・分担報告書), 93-127
8. 森本 洋. (2010). 環境感染誌, 25, 8-14
9. 病原体検出マニュアル, 国立感染症研究所, 全国地方衛生研究所, 平成 24 年改定版

10. 厚労省生活衛生技術研修「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> (令和2年6月15日アクセス可能)
11. 「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> (令和2年6月15日アクセス可能)
12. 病原微生物検出情報 (2013). 34. 331 - 333
<http://idsc.nih.go.jp/iasr/21/247/tpc247.html> (令和2年6月15日アクセス可能)
13. 井上浩章 (2018) 日本防菌防黴誌, 46, 561 - 567
14. Edagawa A, Kimura A, Kawabuchi-Kurata T, et al. (2015) . Int J Sys Evol Microbiol, 12, 13118 - 13130

Ⅱ 調 査 研 究 報 告

3. 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 (令和元年度)

九曜 雅子 西永 真理 矢澤 俊輔 湊山 亜未
大谷 直美¹

Neonatal Mass Screening Results in Toyama Prefecture
(Apr.2019-Mar.2020)

Masako KUYO, Mari NISHINAGA, Shunsuke YAZAWA,
Ami MINATOYAMA, and Naomi OTANI¹

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、昭和52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、昭和52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、本県では平成26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、平成30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を作成した。また、富山県先天性代謝異常等検査事業検討会が設置され、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うことになった。

本報では、令和元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[3]。

3. 検査期間

平成31年4月から令和2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[4]）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

1. 富山県厚生部健康課

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 [5] を用いた。

また、全検体について、自家調製試薬 [6] によるポイトラー法で、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 [7] 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 a -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 [8] 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、半年毎に判定基準の見直しを行っている。平成 31 年 3 月に質量分析装置を更新したことに伴い、判定基準を見直した結果、メープルシロップ尿症の検査指標のうち Val のカットオフ値を $210 \mu \text{mol/L}$ から $250 \mu \text{mol/L}$ に変更した。(表 1)

(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 [3]。

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
	メープルシロップ尿症(MSUD)		Leu+Ile & Val	315	4.1	600	7.9
	ホモシチン尿症(HCU)		Met	250	2.9		
	シトルリン血症1型(CIT)			67	1.0	340	5.0
	アルギニノコハク酸尿症(ASA)		Cit	100		250	
有機酸代謝異常症	メチルマロン酸血症(MMA)						
	プロピオン酸血症(PA)		C3	3.9		8.0	
	イソ吉草酸血症(IVA)		& C3/C2	0.24		0.24	
	メチルクロトニルグリン尿症(3-MCC)		C5	1.0		5.0	
	ヒドロキシメチルグルタル酸血症(HMG)		C5-OH	1.00		2.00	
	複合カルボキシラーゼ欠損症(MCD)						
	グルタル酸血症 1 型(GA1)		C5-DC	0.35			
脂質代謝異常症	中鎖アシルCoA脱水素酵素欠損症(MCAD)		C8	0.28		0.28	
	極長鎖アシルCoA脱水素酵素欠損症(VLCAD)		& C8/C10	1.2		1.2	
	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)		C14:1	0.3		0.3	
	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)		& C14:1/C2	0.013		0.013	
	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-OH	0.100		0.100	
			& C18:1-OH	0.100		0.100	
			C0/ (C16+C18)	75		75	
			(C16+C18:1)/C2	0.37		0.37	
			C14/C3	0.42		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	3mg/dL	Galが3mg/dL以上かつポイトラー法で蛍光無
		ポイトラー法	Gal-1-P Uridyltransferase	または 15mg/dL 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	8pU/mL	30pU/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

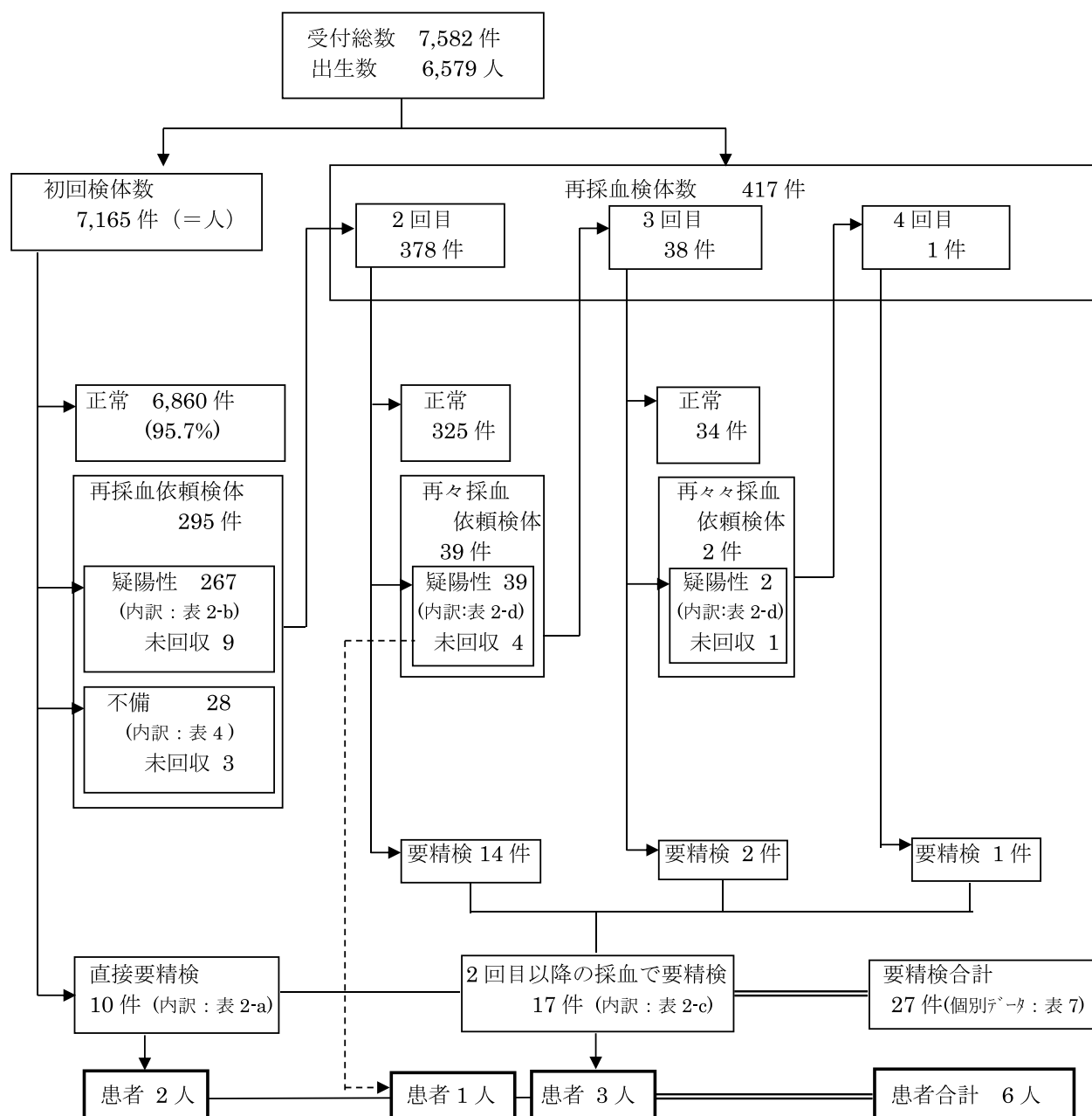


図 1. 検査の流れおよび検査数の概要

(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、7,582 件で、県内 26 か所の医療機関（おもに産婦人科医院）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 6,579 人 [9] であり、初回検体数 7,165 件（人）から計算すると受検率は 108.9% 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 6,860 件（人）（95.7%）は正常と判定されたが、267 件（人）（3.7%）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、10

表 2. 要精検数および疑陽性による再採血依頼数の内訳

疾患名	初回検体 7,165 件			再採血検体 417 件		総受付検体 7,582 件 [] : 患者数		
	直接要精検数 [a]	疑陽性による 再採血依頼数 [b]	再採血率 (%)	要精検数 [c]	疑陽性による 再採血依頼数 [d]	要精検数合計 [a]+[c]	疑陽性による 再採血依頼合計 [b]+[d]	再採血率 (%)
アミノ酸代謝異常症	0	19	0.27	3	2	3	21	0.28
有機酸代謝異常症	0	13	0.18	0	1	0	14	0.18
脂肪酸代謝異常症	5	6	0.08	0	3	5	9	0.12
ガラクトース血症	0	40	0.56	3	4	3	44	0.58
先天性甲状腺機能低下症	1 [1]	99	1.38	7 [3]	14 [1]	8 [4]	113 [1]	1.49
先天性副腎過形成症 (内 出生体重 2000g 未満児の数)	4 [1]	97 (46)	1.35	4	20 (17)	8 [1]	117 (63)	1.54
令和元年度総計 《内 疑疾患が重複している数》	10 [2]	274 《7》*	3.82	17 [3]	44 [1] 《3》**	27 [5]	318 [1] 《10》	4.19

《重複している疑疾患の内訳》

* (初回検体)

- ・フェニルケトン尿症＋ガラクトース血症 1 件
- ・メーブルシロップ尿症＋ガラクトース血症 1 件
- ・フェニルケトン尿症＋先天性副腎過形成症 2 件
- ・メーブルシロップ尿症＋先天性副腎過形成症 2 件
- ・ガラクトース血症＋先天性甲状腺機能低下症 1 件

** (再採血検体)

- ・メーブルシロップ尿症＋先天性甲状腺機能低下症 1 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 1 件

表 3. 疑陽性以外の理由による再採血依頼数

不備理由	件数
3 日以内の採血 血液量不足	2 5
古い	2
汚染	1
哺乳不良	18
合 計	28

その他理由	件数
低体重	74

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 417 件のうちでは、17 件 (人) (4.1%) 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 10 件 (人) と合わせて 27 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 0.58% 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 1.16% となった。先天性甲状腺機能低下症は 1.49%、先天性副腎過形成症は 1.54% となり、すべての対象疾患の合計は 4.19% 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%[10]、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%[11] 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では、再採血依頼数 (113 件) のうち 59 件 (52.2%) は TSH がカットオフ値付近 (8 ～ 9 μ U/ml) の検体であった。これらの中には、再採血時に高値となり精密検査の結果、患者と診断された例もあり、カットオフ値設定の際には注意が必要と考えられる。

先天性副腎過形成症では、再採血依頼数の半数以上が低体重児 (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二次検査による副腎ホルモンプロファイルの確認等が必要と考えられた。

また、2疾患が重複して疑陽性となった例は10件あり、疑疾患の内訳を表2の注記に示した。なお、これらについては、表2、表4、表5の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318件で、そのうち、令和2年6月30日現在304件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95.6%であった。

回収できなかった14件はすべて、再採血検体を当所に送付せず、医療機関（小児科）において検査が行われていた。これらのうち、検査の結果が判明しているのは、患者と診断された例が1件、正常が3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。

(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。

3日以内の採血であった2件のうち1件は、先天性副腎過形成症疑いで緊急検査の依頼のあった例で、日齢1で採血された検体であった。この検体では、異常は認められなかった。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。また、採血後当所に届くま

で7日間以上経っている場合は、検体が「古い」ということで再採血を依頼しているが、このような検体が2件あり、いずれも7日間経過したものであった。ろ紙が汚染していた例は1件であり、ろ紙の血液部分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と考えられることから、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25件で、回収率は89.3%であった。なお、回収できなかった3件は、いずれもNICUからの検体であった。

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2,500g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[12]。今年度の初回検体7,165件（人）のうち、低体重児は126人（1.8%）であった。このうち、50人は疑陽性として、2人は哺乳不良として再採血を依頼した。したがって、低体重児を理由として再採血を依頼したのは74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[13]との比較をそれぞれ表4、表5および表8に示した。

表4. 月別検査実施状況

年		平成31年	令和元年								令和2年			計
月		4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	
受付検体総数（件）		660	687	584	692	657	627	679	590	664	596	512	634	7,582
内 訳	初回検査数（件）	626	650	556	658	623	598	648	560	611	562	478	595	7,165
	再採血総数（件）	34	37	28	34	34	29	31	30	53	34	34	39	417
	採 血 回 数	2回目	34	31	27	31	29	27	27	50	33	28	34	378
		3回目	0	5	1	3	5	2	4	3	1	6	5	38
		4回目以上	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
疑 陽 性 数 （ 要 精 査 数 ）	アミノ酸代謝異常症	1	2(1)	1	2	2(1)	2	2	1	4	1	1	2(1)	21(3)
	有機酸代謝異常症	3	2	0	2	1	0	1	2	1	1	0	1	14
	脂質代謝異常症	1(2)	1(2)	1(1)	2	0	1	0	1	0	2	0	0	9(5)
	ガラクトース血症	4	2	0	5	4	0	3(1)	3	8(2)	5	3	7	44(3)
	先天性甲状腺機能低下症	7(1)	12(1)	9(2)	8(1)	7	13(1)	7(1)	12	17	9	6(1)	6	113(8)
	先天性副腎過形成症	12	11(1)	7	12	4(1)	6	9(1)	11(2)	15(1)	12	12(2)	6	117(8)
計		28(3)	30(5)	18(3)	31(1)	18(2)	22(1)	22(3)	30(2)	45(3)	30	22(3)	22(1)	318(27)

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
昭和 52 年度 ～54 年度	29,229	28,450	39,688	71.7	262	—	—	6(4)	—	—
昭和 55 年度 ～63 年度	122,841	115,435	116,956	98.7	1,811	841	—	75(27)	130(25)	—
平成元年度 ～25 年度	270,084	254,258	237,876	106.9	2,676	3,450	2,722	201(9)	603(135)	382(17)
平成 26 年度	8,844	8,460	7,697	109.9	51	59	123	7(1)	11(7)	10(0)
平成 27 年度	8,777	8,365	7,647	109.4	69	76	148	5(0)	11(7)	5(0)
平成 28 年度	8,501	8,030	7,373	108.9	61	93	189	4(0)	13(5)	15(0)
平成 29 年度	8,365	7,881	7,210	109.3	80	143	143	12(1)	18(8)	5(0)
平成 30 年度	7,939	7,533	6,911	109.0	109	100	106	10(0)	10(2)	3(1)
令和 元年度	7,582	7,165	6,579	108.9	88	113	117	11(0)	8(5)	8(1)
計	472,162	445,577	437,937	—	5,207*2)	4,875	3,548	331*2)(42*3)	804(194)	428(19)

* 1) 昭和 52 年度～平成 5 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

平成 6 年度～平成 24 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

平成 25 年度～平成 29 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

平成 30 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) 昭和 52 年度～平成 5 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 22 人あり（高フェニルアラニン血症 16 人，チロジン血症 2 人，G6PD 異常症 2 人，シトリン欠乏症 2 人）

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 9 人（ヒスチジン血症除く）であり，発見率は 1/49,500，先天性甲状腺機能低下症は 1/2,200，先天性副腎過形成症は 1/15,900 となった（表 8）．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

今年度の疑陽性数は，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 88 件，先天性甲状腺機能低下症が 113 件，先天性副腎過形成症が 117 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 11 人，先天性甲状腺機能低下症 8 人，先天性副腎過形成症 8 人であった（表 5）．

患者と診断されたのは，先天性甲状腺機能低下症 5 人および先天性副腎過形成症 1 人であった．

表 6 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．

精密検査結果報告書の回収率は，96.3%（26 例 / 27 例）であった．

なお，今年度当所に届いたフォローアップ検体 [14] は，33 人延べ 56 件であった．また，今年度要精密検査となった 27 人のうちでは，17 人延べ 19 検体についてフォローアップ検査を行った．

表 6 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．

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 3 人，脂肪酸代謝異常症の疑いで 5 人，ガラクトース血症の疑いで 3 人の計 11 人が要精密検査となった．

表 6 に示したアミノ酸，有機酸，脂肪酸代謝異常症欄の症例 1，3，4，6 は，平成 30 年度から新たに対象疾患となったカルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ -2 欠損症（CPT2）疑いの例であるが，今年度は，検査指標のひとつである（C16+C18:1）/C2 がカットオフ値以上であった場合に本検査事業のコンサルタント医に相談のうえで要精密検査と判定した．精密検査の結果はいず

れも正常であった。また、症例5はフェニルケトン尿症疑いの例であり、Phe 値軽度上昇が継続していたため要精密検査となった。精密検査の結果、フェニルアラニン水酸化酵素 (PAH) 異常による軽症高フェニルアラニン血症の疑いとして経過観察されている。なお、この症例は県外在住の例であったため、居住地の医療機関へ紹介された。

ガラクトース血症疑いの症例1は、Gal 高値で要精密検査となった。ボイトラー法 (UT 活性) は正常であった。精密検査の結果、門脈体循環シャントによる二次性ガラクトース血症疑いとして経過観察されている。

(2) 先天性甲状腺機能低下症

要精密検査となった8例のうち、患者と診断されたのは症例1, 5, 7, 8の4例であった。

症例7は、日齢13の再採血検体での検査の結果、TSH 値は初回採血での検査の結果よりも低くなっているものの依然としてカットオフ値以上であったため要精密検査とした。日齢13の再採血時に精密検査医療機関でも検査が実施され、TSH 22.88 μ U/ml, FT4 1.0ng/dl (いずれも血清値) であったことから、先天性甲状腺機能低下症として治療が開始された。

症例8は、初回採血検体でTSH 34.96 μ U/ml であったことから直接要精検となった。精密検査の結果、患者と診断された。なお、母親はバセドウ病であり、抗甲状腺剤服用中とのことであった。

また、症例2は低体重児でありNICUからの検体であった。日齢5の初回採血検体では先天性副腎過形成症の疑いで要再採血となった。表6に示したのは2回目採血時、3回目採血時および4回目採血時の結果である。2回目の日齢37での採血時でも先天性副腎過形成症の検査指標はカットオフ値以上であった。体重がまだ2,000gに達していないこともあり、主治医と相談のうえ再度要再採血とした。3回目の日齢60での採血時にはTSHが高値となり、それが持続したため、要精密検査としたが、精密検査の結果は異常なしとのことであった。

このほか、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うち、医療機関 (小児科) で再検査が実施された1例が患者と診断された (図1, 表7)。この症例は、初回検体 (日齢6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28採血) では、TSH 値が17.00 μ 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

から小児科で管理されており、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果、TSH 18 μ U/ml (血清値) であり、FT3, FT4とも低下気味であったことから、患者として治療が開始された。

(3) 先天性副腎過形成症

要精密検査となったのは8人で、患者と診断されたのは症例6である。日齢5の初回採血検体で17-OHP 値が直接法、抽出法ともにスケールオーバー (100ng/ml 以上) しており、直接要精検とした。ろ紙血液ディスクの分割測定を行い、参考値として医療機関へ報告した。

症例5は、日齢4の初回採血検体で17-OHP 値が抽出法で12.60ng/ml であり、直接要精検となった。日齢12で採血されたフォローアップ検体でも17-OHP 値は抽出法で15.21ng/ml であり、21-水酸化酵素欠損症 (非古典型) 疑いとして経過観察中である。

なお、症例2については、精密検査医療機関から精密検査結果報告書が届いていないが、日齢20で採血されたフォローアップ検体でも17-OHP 値は抽出法で4.43ng/ml でカットオフ値以上であった。

(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。今年度は、このような疾患は発見されなかった。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16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、シトリン欠乏症2人である。

3. 精度管理

外部精度管理は、新生児マス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。

平成26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 [15] 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」[16] 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。

令和元年度は、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

表 6. 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	5	(C16+C18:1)/C2 0.411	C14/C3	0.095	異常なし
	2		男	5	C14:1 0.31 nmol/ml	C14:1/C2	0.0195	異常なし
	3		男	6	(C16+C18:1)/C2 0.402	C14/C3	0.351	異常なし
	4		男	5	(C16+C18:1)/C2 0.374	C14/C3	0.169	異常なし
	5		男	5	Phe 125.3 nmol/ml			軽症高フェニルアラニン 血症疑い
				13	Phe 129.3 nmol/ml			
	6		男	6	(C16+C18:1)/C2 0.382	C14/C3	0.469	異常なし
	7		女	5	Val 319.1 nmol/ml	Leu+Ile	352.2 nmol/ml	異常なし
				10	Val 276.8 nmol/ml	Leu+Ile	365.0 nmol/ml	
	8		男	5	Val 264.4 nmol/ml	Leu+Ile	328.5 nmol/ml	異常なし
				13	Val 266.4 nmol/ml	Leu+Ile	350.7 nmol/ml	
ガラクトース血症	1		女	6	Gal 6.76 mg/dl	Gal-1-P ボイトラー法	5.69 mg/dl 正常	二次性高ガラクトース血 症疑い
				15	Gal 8.16 mg/dl	Gal-1-P ボイトラー法	5.26 mg/dl 正常	
	2		女	5	Gal 5.56 mg/dl	Gal-1-P ボイトラー法	6.54 mg/dl 正常	異常なし
				12	Gal 4.73 mg/dl	Gal-1-P ボイトラー法	5.53 mg/dl 正常	
	3		女	4	Gal 0.26 mg/dl	Gal-1-P ボイトラー法	0.00 mg/dl 正常	異常なし
				40	Gal 6.94 mg/dl	Gal-1-P ボイトラー法	2.02 mg/dl 正常	
				54	Gal 5.57 mg/dl	Gal-1-P ボイトラー法	2.45 mg/dl 正常	
先天性甲状腺機能低 下症	1	*	男	5	TSH 13.61 μ U/ml			先天性甲状腺機能低下症
				12	TSH 25.07 μ U/ml			
	2		女	37	TSH 2.32 μ U/ml			異常なし
				60	TSH 8.04 μ U/ml			

表 6. 要精密検査者の検査状況と結果(2)

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	2		女	75	TSH	8.97 μ U/ml			異常なし
	3		男	4	TSH	10.53 μ U/ml			異常なし
				9	TSH	8.66 μ U/ml			
				16	TSH	10.60 μ U/ml			
	4		男	4	TSH	10.41 μ U/ml			異常なし
				11	TSH	10.42 μ U/ml			
	5	*	男	4	TSH	9.01 μ U/ml			先天性甲状腺機能低下症
				10	TSH	14.75 μ U/ml			
	6		男	4	TSH	8.13 μ U/ml			一過性高TSH血症
				11	TSH	8.57 μ U/ml			
	7	*	男	5	TSH	12.75 μ U/ml			先天性甲状腺機能低下症
				13	TSH	9.69 μ U/ml			
	8	*	女	6	TSH	34.96 μ U/ml			先天性甲状腺機能低下症
先天性副腎過形成症	1		男	5	17OHP直接法	7.64 ng/ml	17OHP抽出法	4.25 ng/ml	異常なし 出生体重 3,446g
				10	17OHP直接法	11.89 ng/ml	17OHP抽出法	7.19 ng/ml	
	2		男	5	17OHP直接法	13.93 ng/ml	17OHP抽出法	4.07 ng/ml	出生体重 3,290g
				16	17OHP直接法	12.51 ng/ml	17OHP抽出法	4.34 ng/ml	
	3		女	4	17OHP直接法	32.72 ng/ml	17OHP抽出法	19.17 ng/ml	異常なし 出生体重 2,197g
	4		女	5	17OHP直接法	10.07 ng/ml	17OHP抽出法	4.72 ng/ml	異常なし 出生体重 2,270g
				15	17OHP直接法	8.11 ng/ml	17OHP抽出法	4.31 ng/ml	
	5		男	4	17OHP直接法	26.47 ng/ml	17OHP抽出法	12.60 ng/ml	先天性副腎過形成症 (21-OHD非古典型) 疑い
	6	*	男	5	17OHP直接法	190.62 ng/ml	17OHP抽出法	186.87 ng/ml	先天性副腎過形成症 出生体重 2,875g

表 6. 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
先天性副腎過形成症	7		男	4	170HP直接法	24.87 ng/ml	170HP抽出法	11.22 ng/ml	異常なし 出生体重 2,684g
	8		女	5	170HP直接法	8.51 ng/ml	170HP抽出法	4.28 ng/ml	異常なし 出生体重 3,755g
				17	170HP直接法	9.45 ng/ml	170HP抽出法	6.78 ng/ml	

表 7. 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

年齢	結果および経過
6	初回採血
7	検体受付 新生児マススクリーニング結果 TSH 3.56 μ U/ml (全血値) 低体重児 (出生時 1,826g) のため再採血依頼
28	同科で再採血
29	検体受付 新生児マススクリーニング結果 TSH 17.00 μ U/ml (全血値)
31	先天性甲状腺機能低下症の疑い (TSH 高値) で再々採血依頼
(34 担当医より連絡あり)	
同科で検査 検査結果 TSH 18 μ U/ml (血清値) FT3 FT4 低下気味 先天性甲状腺機能低下症患者として治療開始	

表 8. マススクリーニングによる富山県および全国の子供発見状況

区 分	富 山 県				全 国			
期 間	令和元年度		昭和52年度～令和元年度		平成30年度		昭和52年度～平成30年度	
受検者数	7,165人		445,577人		925,890人		50,178,505人	
患者数, 発見率	患者数	発見率	患者数	発見率	患者数	発見率	患者数	発見率
疾患名	(人)		(人)		(人)		(人)	
アミノ酸代謝異常症	0	—	6 ²⁾	1/ 74,300	15	1/ 61,700	1,031	1/ 48,700
アミノ酸代謝異常症 (2疾患) ¹⁾	0	—	0	— ⁴⁾	8	1/ 115,700	30	1/ 224,700 ⁸⁾
有機酸代謝異常症	0	—	0	— ⁴⁾	38	1/ 24,400	241	1/ 28,000 ⁸⁾
脂肪酸代謝異常症	0	—	2 ³⁾	1/ 24,000 ⁴⁾	24	1/ 38,600	150	1/ 44,900 ⁸⁾
ガラクトース血症	0	—	1	1/ 445,600	27	1/ 34,300	1,325	1/ 37,900
先天性甲状腺機能低下症	5	1/ 1,400	194	1/ 2,200 ⁵⁾	612	1/ 1,500	17,569	1/ 2,700 ⁹⁾
先天性副腎過形成症	1	1/ 7,200	19	1/ 15,900 ⁶⁾	69	1/ 13,400	2,078	1/ 16,400 ¹⁰⁾
ヒスチジン血症	—	—	33	1/ 6,000 ⁷⁾	—	—	2,200	1/ 9,600 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, メーブルシロップ尿症 1人

3) 患者内訳: 極長鎖アシルCoA脱水素酵素 (VLCAD) 欠損症 2人

4) 平成25年度 (平成26年3月) ～令和元年度 タンデムマス法受検者数 48,089人

5) 昭和55年度～令和元年度 受検者数 417,127人

6) 平成元年度～令和元年度 受検者数 301,692人

7) 昭和52年度～平成 5年度 受検者数 197,180人

8) 平成23年度～平成30年度 タンデムマス法受検者数 6,740,156人

9) 昭和54年度～平成30年度 受検者数 46,835,564人

10) 昭和63年度～平成30年度 受検者数 34,093,964人

11) 昭和52年度～平成 4年度 受検者数 21,119,892人

1 回 (11 月) 行われた。今年度の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：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ことにより生涯にわたって障害などの発生を予防すること [17] 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、新生児マススクリーニングにおいて、検査と同じろ紙血液を使用したより精度の高い検査法、すなわち二次検査を導入し、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が必要である。これにより、不要な再採血が減少し、適正な再採血率、精検率を確保することが可能となり、検査精度の向上に繋がることになる。そのため、再採血率や精検率が高い対象疾患については、二次検査法の検討を行っているところである。

また、本県では、今年度も、要精密検査となった例の中に、里帰り出産等のために県外の居住地に戻る例があった。県外へ転出した例では、その後の追跡調査は容易ではないことから、早期に自治体間の枠を超えたフォローアップ体制を構築する必要性を感じた。現在、そのための全国レベルのネットワーク会議や患者登録追跡体制、事業の標準化についての検討が行われている。

さらに、ライソゾーム病や原発性免疫不全症等を新たに新生児マススクリーニングの対象疾患とすることについての検討も行われており、新生児マススクリーニング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. 九曜雅子, 米田 豊, 高森亮輔, 他. (2014). 富山衛研年報, 37, 25-37
4. 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
5. 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
6. 九曜雅子, 米田 豊, 加藤丈士, 他. (2005). 富山衛研年報, 28, 23-32
7. 美澄博雄, 高坂陸年, 和田 洋, 他. (1980). 代謝異常スクリーニング研究会会報, 5, 46-47
8. 九曜雅子, 米田 豊, 前多隆志, 他. (2010). 富山衛研年報, 33, 27-39
9. とやま統計ワールド「富山県の人口と世帯」, http://www.pref.toyama.jp/sections/1015/lib/jinko/_news/jinko200401/jinko200401.html (2020 年 6 月 30 日時点アクセス可能)
10. 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 2 0 1 2, 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
11. 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
12. 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
13. 先天性代謝異常検査等検査状況 (平成 30 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, 55, 100-103
14. 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
15. 九曜雅子, 米田 豊, 西永真理, 他. (2015). 富山衛研年報, 38, 25-36
16. 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
17. 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)

羊水細胞の染色体分析結果(令和元年度)

高森 亮輔 湊山 亜未 九曜 雅子

Chromosome Analysis of Amniotic Fluid Cells (Apr. 2019-Mar. 2020)

Ryosuke TAKAMORI, Ami MINATOYAMA, and Masako KUYO

目的：当所では、富山県の総合母子保健対策の一環として昭和48年度から血液の染色体検査を開始し、昭和49年度からは羊水の染色体検査を実施している。出生前診断領域の一翼を担う羊水検査は、染色体異常に起因する何らかの異常が存在するか否かを、核型分析により検索し、進行中の妊娠の継続や中断の決定、出生後のケアや治療の方向付けのための判断資料を医療機関に提供することを目的として実施されている。これまでの45年間で、2,830件の検体を対象として検査を実施してきたが、令和元年度に受け付けた羊水検体60件について、検査状況および結果の概略を報告する。

材料と方法：羊水細胞の培養は、既報[1]および当所の方法[2]に基づいておこなった。詳細については、既報[3]に従った。

染色体標本の作製方法については、培養に供した1検体あたり2枚のシャーレそれぞれについて、標本作製した。

Gバンド視覚化のためのトリプシン処理およびギムザ染色は、トリプシンによる標本消化効果を高めるため、標本作製日の翌日以降に行った。

核型分析には、Meta System社の染色体核型解析システム Ikaros (Ver. 5.0) を使用した。

データ集計については、一般的に35歳以上での出産が想定される場合を高齢妊娠と定義する

[4] が、本報では検査依頼受け付け時点で35歳以上の場合を高齢妊娠とした。

また、妊娠週数については、主治医による検査依頼書への記載が、たとえば「16週5日」であっても「16週」となっているケースが散見されるなど「何日」部分が省略される場合が多いことから、その記載がある場合でも「何日」部分についてはすべて切り捨ててデータを取りまとめた。

結果：令和元年度は、県内医療機関より計60件の羊水検体についての染色体核型分析検査依頼を受け付けた。

依頼医療機関数は7施設であった。その内訳は、総合病院5施設、産科医院2施設であった。

妊娠週数別の依頼件数を表1に示した。16週での依頼が33件で最も多く、全体の55.0%を占めた。次いで17週16件、15週7件、18週2件で

あり、検査時期に適している15週～17週での依頼の合計56件は全体の93.3%を占めた。最短は15週、最長は31週であった。

母体年齢別の検査依頼件数を表2に示した。39歳での依頼が8件で最も多く、最低年齢は24歳、最高年齢は46歳であった。本報で定義した高齢妊娠である35歳以上での検査依頼件数は45件で、全体の75.0%であった。

検査依頼理由別件数および異常核型判定結果を表3に示した。高齢妊娠および、これにその他の

表1. 妊娠週数別検査依頼件数

週数	15	16	17	18	...	20	...	31	合計
件数	7	33	16	2		1		1	60

表2. 母体年齢別検査依頼件数および年齢区分別割合

年齢	24	25	26	29	30	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	44	45	46	合計
件数	1	1	1	2	1	4	3	2	2	2	7	5	8	7	7	2	1	2	2	60
15(25.0%)										45(75.0%)										

表3. 検査依頼理由別件数および以上核型判定結果

依頼理由	受付数	異常数	核型
35歳以上	45	4	
高齢妊娠	34	1	47,XY,+18
NT肥厚	5	1	47,XY,+18
前児染色体異常	2	0	
QTで染色体異常疑い	1	0	
TMで染色体異常疑い	1	1	47,XX,+21
羊水過多症	1	1	47,XY,+21
身内に染色体異常あり	1	0	
35歳未満	15	1	
NT肥厚	4	1	45,X
本人希望	4	0	
QTで染色体異常疑い	3	0	
身内に染色体異常あり	1	0	
胞状奇胎	1	0	
胎児浮腫	1	0	
前児染色体異常	1	0	
計	60	5	

NT:nuchal translucency(後頸部低エコー域)

QT:quatro (marker) test(母体血清4成分による対象疾患罹患確率スクリーニング検査)

TM:triple marker (test)(母体血清3成分による対象疾患罹患確率スクリーニング検査)

表4. 培養日数別標本作製件数

培養日数	8	9	10	11	12	13	14	15	16	19	合計	平均日数
1回目	4	5	7	15	9	7	10	1	1	1	60	11.7±2.1
2回目	1	4	5	11	11	8	11	5	3	1	60	12.5±2.1

表5. 検査全行程所要日数別件数

日数	9	10	11	12	13	14	15	16	17	19	20	計
件数	1	2	1	4	3	16	14	9	5	3	2	60

依頼理由が付随したものは、表2でも示したとおり45件で、全体の75.0%であった。

母体が35歳未満でも、超音波検査等で、胎児に何らかの染色体異常や形態異常が疑われたことによる依頼は15件で、全体の25.0%であった。

染色体核型異常を認めたのは全検体60件中5件(8.3%)であった。高齢妊娠での検査依頼45件のうち4件(8.9%)に異常を認めた。

近年、胎児の染色体異常を疑うきっかけとして大きな割合を占めているNuchal Translucency (NT:後頸部低エコー域)肥厚の記載のある依頼は9件(35歳以上5件、35歳未満4件)あり、2

件(22.2%)に異常を認めた。

母体血液を用いたクアトロテスト(QT)の結果から胎児異常の疑いがもたれた依頼が4件(35歳以上1件、35歳未満3件)あり、異常は認められなかった。トリプルマーカータスト(TM)の結果から胎児異常の疑いがもたれた依頼が1件(35歳以上1件、35歳未満0件)あり、1件(100.0%)に異常を認めた。

令和元年度に判定した異常核型5件の内訳は、常染色体の数的異常4件(21トリソミー症候群2件、18トリソミー症候群2件)、性染色体の異常1件であった。

染色体標本作製までに要した培養日数別の件数を、表4に示した。1検体あたり2回標本作製を行っており、1回目の標本作製のピークは培養11日目であり、10～14日目の5日間の総数は48件(80.0%)であった。2回目の標本作製のピークは培養11, 12, 14日目であり、10～14日目の5日間の総数は、46件(76.7%)であった。平均培養日数は、標本作製1回目が 11.7 ± 2.1 日、2回目が 12.5 ± 2.1 日であった。

検体受入から、培養、標本作製、顕微鏡下での観察、写真撮影、核型分析を経て検査成績報告書を作成し、これを医療機関あてに送付するまでの全作業工程所要日数別の件数を、表5に示した。最短で9日、最長で20日、平均は 14.8 ± 2.2 日であった。

考察：令和元年度の検査依頼件数60件は、平成30年度の65件から5件減少した。

県内の出生数は年々微減傾向にあり、妊娠数自体も微減傾向にあると推測される。

出生前診断を目的とする羊水検査は、羊水採取に際しての安全面、培養に必要な細胞数の確保、母体への負荷や精神的なストレスの低減等の観点から、妊娠16週前後での実施が最適であるとされているが、当所で受け付けた検査依頼も、16週のみで約半数、これに前後1週ずつを加えた15週から17週までの3週で、9割以上を占めた。

母体年齢別の検査依頼件数については、高齢妊娠での依頼が7割を占めていた。

受付検体60件のすべてについて検査を完了し、5件に異常を見出したが、35歳以上45件中の異常核型判定件数は4件(8.9%)、35歳未満15件中の異常核型判定件数は1件(6.7%)であった。

35歳以上での検査依頼45件のうち、高齢妊娠のみを依頼理由としたのは34件であり、それ以外の11件ではNT肥厚や母体血液検査による胎児染色体異常疑い等の依頼理由が加わっていた。異常核型を認めたケースは、高齢妊娠のみで1件、NT肥厚、母体血液検査による胎児染色体異常疑い、羊水過多症が付随したケースでそれぞれ1件ずつであった。一般的に高齢妊娠において胎児の染色体異常の発生頻度が高まるとされるが、検体は限られるが、高齢妊娠に加えて、それ以外の依頼理由が付随することで異常核型検出の発生頻度が格段に高まると考えられた。

NTに関して、学会のガイドラインには、「NT肥厚と胎児形態異常とは関連がある(NT肥厚

が確認された児では染色体異常や心形態異常頻度が高い)」と明記されているが、正確な判定には、測定された状況が重要であることも記されている[5]。NT測定は妊娠11週0日から13週6日の間に実施するよう推奨されているが、NT肥厚を主訴とした9検体のうち、5検体は測定週日の記載がなく、記載のあった4検体は、推奨された期間内に測定が行われていた。依頼理由としてのNT肥厚と染色体異常との相関について考察するためには、より詳細なデータの収集とさらなるデータの蓄積が必要と思われる。

異常核型5件の内訳は、21トリソミー症候群2件、18トリソミー症候群2件、性染色体の異常1件であった。

検体受入れから染色体標本作製までに要した培養日数のピークは、標本作製1回目が11日、2回目が11, 12, 14日であった。全検体の平均培養日数は1回目が11.7日、2回目が12.5日で、平成28年度から30年度までの3年分のデータ(1回目:11.2日, 11.9日, 10.9日, 2回目:11.6日, 12.0日, 11.2日)と比較すると2回目の平均培養日数が最も高値であった。

当所では、染色体核型分析の対象となっている羊水、血液、流産胎児絨毛のいずれについても、検体受入れ日から3週間以内に検査結果を依頼者のもとへ届けられるように、日程を調整しながら作業を進めている。羊水検体60件の全工程所要日数の平均は、 14.8 ± 2.2 日であった。過去3年間については、平成28年度 14.5 ± 2.3 日、平成29年度 15.6 ± 2.1 日、平成30年度 14.3 ± 2.4 日となっていた。培養日数が平成30年度より増加したが、全工程の平均所要日数では過去3年間の平均的な値に収めることができた。これは、担当者が作業に習熟したためではないかと推察される。また、平成27年度より、染色体核型分析システムIkarosを用いたパソコン画面上での核型分析による作業工程の簡略・省力化を実現したことも要因と考えられる。

検体受領から3週間以内の結果報告を実現できなかったケースは、皆無であった。

標本作製までの平均培養日数を検体別に比較すると、血液は基本的に3日、流産胎児絨毛ではおよそ10日程度要する。令和元年度の羊水の培養日数は、1回目11.7日、2回目が12.5日となり、流産胎児絨毛より2日程度長かった。

検体の種類に関わらず、検査結果の正確性こそ

が最重要であるが、血液や流産胎児組織とは大きく異なり、羊水検査に関しては判定結果が妊娠の継続の可否をも左右しかねないために、母体保護ならびに倫理的な観点からも、その迅速性が厳に問われている。そのため、検体受入れから培養、染色体標本作製、そして結果報告までに要する日数を1日でも短縮することは、この業務に携わる者にとっての重要な課題である。表4でも示したように、培養日数が短い検体と長い検体では、7日以上もの差があることも、経験上、歴然たる事実である。羊水量や細胞濃度、培養開始時点でのシャーレへの播種生細胞数と培養日数との相関の有無を明確にすることが、出生前診断において重要な役割を担う染色体検査業務における、今後の課題であろう。

文 献

1. 鈴森薫 (1996). 臨床染色体診断法, 260 - 263. 金原出版
2. 本田幸子, 品川保弘, 林美貴子, 他. (2010). 富山衛研年報, 33, 54
3. 品川保弘, 高森亮輔, 西永真理, 他. (2015). 富山衛研年報, 38, 43 - 44
4. 日本産科婦人科学会 (2007). 日産婦誌, 59, 7, N-224
5. 公益社団法人日本産科婦人科学会・公益社団法人日本産婦人科医会 (2017). 産婦人科診療ガイドライン-産科編 2017, 101

ガラクトース-1-リン酸ウリジルトランスフェラーゼ(GALT) 活性測定試薬の有用性の検証

湊山 亜未 九曜 雅子 福士 勝¹

Investigation of the Measuring Reagent for Galactose-1-Phosphate Uridyltransferase
(GALT) Activity,
Using Dried Blood Specimen for Newborn Screening.

Ami MINATOYAMA, Masako KUYO, and Masaru FUKUSHI

目的：新生児マススクリーニング検査の対象疾患のひとつであるガラクトース血症は、欠損する酵素によって4つのタイプに分けられる[1]。そのうち、症状が重篤で緊急性の高いI型を確実に発見するために、ろ紙血液中のガラクトースを、マイクロプレートを使用して定量する酵素法[2]に加えて、ポイトラー法でガラクトース-1-リン酸ウリジルトランスフェラーゼ(GALT)の活性の有無を判定している[3]。測定原理を図1に示す。GALT活性の判定は、酵素反応により生成するNADPHの蛍光を、判定用ろ紙にスポットして目視で確認する。ところが、これまで使用していた判定用ろ紙であるWhatman DE81が販売中止となり、これに代わる判定用ろ紙について検討されていたが、適当なろ紙は見つからなかった[4]。そのため、GALT活性の定量の検討が全国的に進められていた[5]。今回、株式会社札幌イムノ・ダイアグノスティック・ラボラトリーにおいてGALT活性測定用の試薬が開発されたことから、この試薬キットを使用した測定について正確性及び再現性等を検討したので報告する。

材料と方法：

1. 検体：新生児ろ紙血液検体については、富山県の新児マススクリーニング検査申込書に記載されている『先天性代謝異常等検査を終えた血液ろ紙の使用について』の包括的同意が得られた検体を用いた[6]。いずれのろ紙血液検体も、乾燥剤とともにチャック付きビニール袋に入れ、4℃で保管した。
2. 試薬キット構成：反応試薬バイアル(UDP-Glu, Gal-1-P, NADPを含む凍結乾燥品)、試薬溶解液(EDTA, サポニン, トリス酢酸緩衝液,

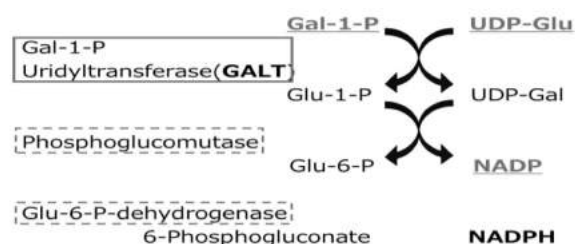


図1. 測定原理

下線が反応試薬に含まれるろ紙血液中のGALTの作用で生成するNADPHの蛍光強度を定量する



図2. GALT活性測定手順

- pH8.0), 標準バイアル(NADPH標準品), 5倍濃縮反応停止液(グリシン緩衝液, pH10.5), コントロールろ紙血液(4濃度+ブランク)からなる。
3. 検体の処理と測定：手順を図2に示した。日内変動, 日間変動の検討については試薬キットの構成であるコントロールろ紙血液を使用した。

1. 株式会社札幌イムノ・ダイアグノスティック・ラボラトリー

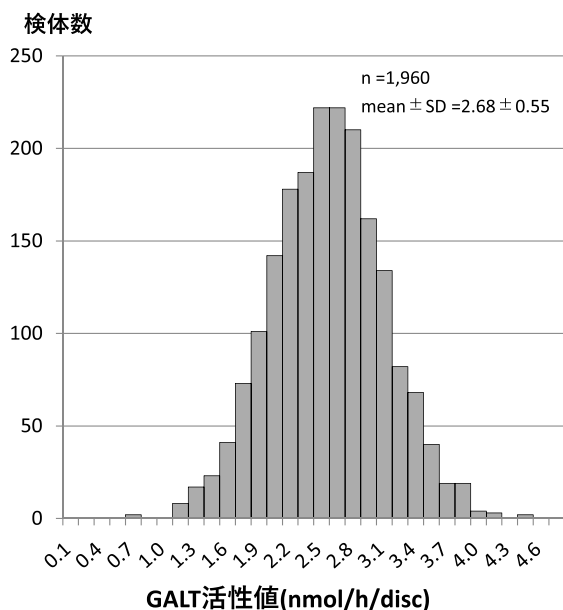


図 3. 新生児ろ紙血液検体の GALT 活性測定値分布

表 1. アッセイ内変動の検討結果 (GALT 活性値)

	Ctrl. 1	Ctrl. 2	Ctrl. 3
平均 (nmol/h/disc)	0.411	0.770	2.153
SD	0.031	0.068	0.104
CV	7.5%	8.8%	4.8%

n=10

表 2. アッセイ間変動の検討結果 (GALT 活性値)

	Ctrl. 1	Ctrl. 2	Ctrl. 3
平均 (nmol/h/disc)	0.426	0.784	2.259
SD	0.026	0.062	0.118
CV	6.0%	7.9%	5.2%

n=2 2重測定 6日間

結果：

1. 新生児ろ紙血液検体の測定値分布

新生児ろ紙血液検体 1,960 件について測定した結果を図 3 に示した. GALT 活性値の mean $\pm$ SD は 2.68 ± 0.55 nmol/h/disc であった. 酵素活性の有無の判定基準となりうる 99.95%ile 値は 0.677 nmol/h/disc であった.

2. アッセイ内変動

結果を表 1 に示した. いずれのコントロール検体も, GALT 活性値の変動係数 CV は 10% 以内であった.

3. アッセイ間変動

2 重測定 (n=2) を 6 日間行った. 結果を表 2 に示した. いずれの濃度も, GALT 活性値の CV は 10% 以内であった.

4. 検体の測定値の変動

それぞれ異なる病院で採血された, 正常検体のろ紙血液 4 検体を用いて, 1 か月間の GALT 活性値の変化を観察した. 結果を図 4 に示した. すべての検体で GALT 活性が徐々に低下したが, 変動は 5% 以内であった.

考察：今回の検討では新生児ろ紙血液検体の測定値分布, 日内変動, 日間変動について安定した結果が得られた. 測定は 4 月から 9 月までの 4 か月間に渡って行ったが, 測定値の分布に大きな変動は見受けられなかった. これらの結果から, GALT 活性測定試薬の有用性は検証されたと考える.

文 献

1. Yoichi Wada, Atsuo Kikuchi, Natsuko Arai-Ichinoi, et al. (2019) . Genetics in

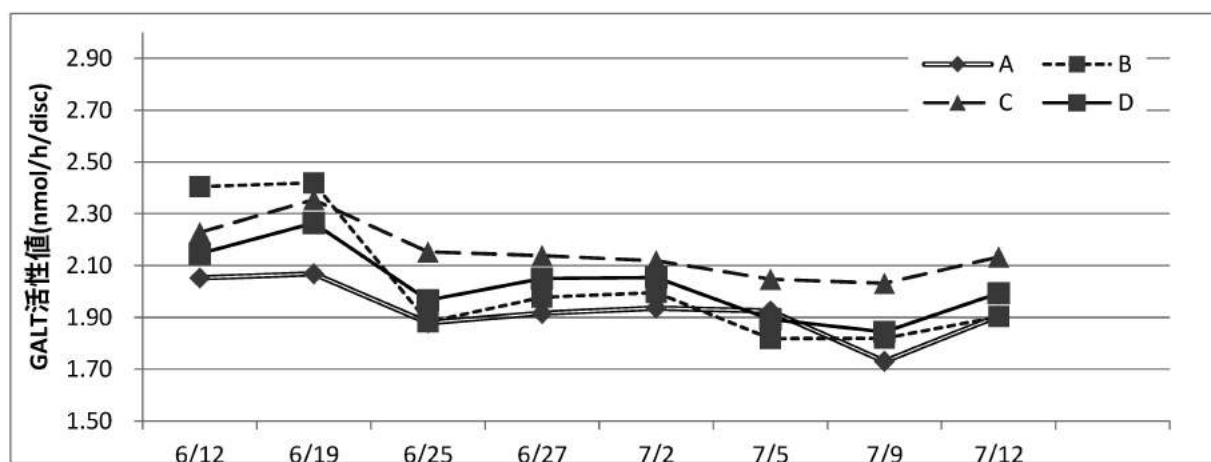


図 4. 正常ろ紙血液検体における GALT 活性値の経日変化

- medicine, Jun;21 (6) :1286-1294
2. 藤本昭栄, 大浦敏明, 長谷 豊 (1991). 日本マスキング学会誌, 1 (1), 211-212
 3. 九曜雅子, 米田 豊, 加藤丈士, 他. (2005). 富山衛研年報, 28, 23-32.
 4. 間下充子, 渡辺和宏, 世良保美, 他. (2014). 日本マスキング学会誌, 24 (2), 70
 5. 間下充子, 長谷川智美, 石毛信之, 他. (2017). 日本マスキング学会誌, 27 (1), 83-89
 6. 九曜雅子, 米田 豊, 高森亮輔, 他. (2014). 富山衛研年報, 37, 25-37

流産胎児の染色体分析結果(令和元年度)

湊山 亜未 高森 亮輔 九曜 雅子

Chromosome Analysis of Abortus Cells (Apr. 2019 -Mar. 2020)

Ami MINATOYAMA, Ryosuke TAKAMORI, and Masako KUYO

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、次回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昭和48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、昭和50年度からは、自然流産胎児

の染色体検査を実施している。令和元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・絨毛組織を貼り付け法や酵素処理法により、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。

表 1. 検査依頼を受けた流産胎児の在胎週数

週数	5	6	7	8	9	10	11	13	14	17	19	20
検体数	1	5	5	16	11	5	3	1	1	2	1	1
計	38					14						

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	不明			
流産原因精査	22	12	5	2	2	0	1	8		46,XX,add(10p) 46,XY,14ps+ 47,XX,+17 47,XX,+21 47,XY,+21 69,XXX 47,XX,+10/46,XX 47,XX,+21/46,XX 47,XX,+10 47,XX,+11 47,XX,+13 47,XX,+22[3] 47,XY,+12 47,XY,+15 47,XY,+16[2] 47,XY,+22 48,XY,+18,+20 49,XY,+3,+13,+21 48,XX,+13,+14/49,XX,+13,+14,+21
不育症	15	0	7	2	5	1	0	14		45,X 46,XY,der(13;14)(q10;q10) 47,XX,+17 47,XY,9hq+,+21 ※ 48,XY,+15,+16 48,XY,+4,+21 47,XX,+15/46,XX 47,XX,+13/45,X
反復流産	13	0	7	3	2	1	0	8		47,XY,+14 92,XXYY 46,XX,der(9)t(9;17)(q34.1;q21)/46,XXt(9;17)(q34.1;q21)
習慣性流産	4	1	0	3	0	0	0	3		
胎児染色体異常の既往あり	2	0	1	0	0	0	1	0		
合計	56	13	20	10	9	2	2	33		

[2]: 同一核型が2件であることを示す
※9qh+は正常変異

表 3. 染色体異常と流産回数・母体年齢・在胎週数

	異常あり	異常なし	全体
流産回数	2.7±1.1 (n=33)	1.9±1.0 (n=20)	2.4±1.1 (n=53)
母体年齢	37.0±4.5 (n=33)	31.7±4.9 (n=22)	34.9±5.3 (n=55)
在胎週数	9.2±2.7 (n=31)	9.4±3.8 (n=20)	9.3±3.1 (n=51)

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。56 検体中 55 検体の分析を完了した。検体受け入れ件数は、近年 60 件前後で推移し、令和元年度は 56 件であった。

受け入れた検体はすべて絨毛のみであった。流産確認時の在胎週数が記載されていた 52 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 5 週から 20 週の範囲で、もっとも件数の多かったのは 8 週の 16 件（全体の 28.6%）、次いで 9 週の 11 件（19.6%）であった。10 週未満と 10 週以降で分けると、10 週未満が 38 件（73.0%）、10 週以降が 14 件（26.9%）であった。10 週未満の 38 件の週数の平均は 7.9 ± 1.1 週、52 件全体の週数の平均は 9.3 ± 3.1 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 55 件中 33 件（60.0%）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、昭和 50 年以来 45 年間で 919 件を数えるが、分析を完了できた検体 869 件のうち、異常を確認したのは 519 件であり、検査完了件数に占める異常検体の確認率は 59.7% となっている。

染色体異常 33 件の内訳は、数値異常 20 件、モザイク 5 件（47,XX,+10/46,XX 47,XX,+13/45,X 等）、ターナー症候群 1 件（45,X）、構造異常 3 件、3 倍体 1 件、4 倍体 1 件、構造異常 + 数値異常 1 件（47,XY,9hq+,+21）、構造異常 + モザイク 1 件（46,XX,der (9) t (9;17) (q34.1;q21) / 46,XX,t (9;17) (q34.1;q21)）であった。

染色体異常の有無と、依頼時の流産を含む総流産回数、検査依頼時の母体年齢、流産確認時までの在胎週数について表 3 に示した。総流産回数は染色体核型に異常ありの群で 2.7 ± 1.1 回、異常

なしが 1.9 ± 1.0 回であった。母体年齢は異常ありが 37.0 ± 4.5 歳、異常なしが 31.7 ± 4.9 歳であり、在胎週数は異常ありが 9.2 ± 2.7 週で異常なしが 9.4 ± 3.8 週であった。

考察：検体のおよそ 6 割に染色体異常を認めたが、この割合は、多くの報告 [3, 4] の記述と合致していた。

令和元年度は、培養不可による核型分析できなかった検体が 1 件あった。同時期に培養開始した他の検体では問題なく分析を行えたことから、培養能力に欠ける検体であったと判断した。

平成 28 年度より、染色体標本作製過程において、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。

流産胎児由来細胞では血液リンパ球や羊水細胞の場合と比較して、染色体標本作製が困難な場合が多い。培養技術、標本作成技術を改良し、さらなる核型分析の効率化と検査システム全体の迅速化の実現が望まれる。

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：斉藤滋）135 - 137

富山県における令和元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
長谷川澄代 小渕 正次 大石 和徳

Viruses and Rickettsiae Detected from Specimens of Patients in Toyama Prefecture in the Fiscal Year 2019

Masae ITAMOCHI, Noriko INASAKI, Takahisa SHIMADA, Yumiko SAGA,
Sumiyo HASEGAWA, Masatsugu OBUCHI, and Kazunori OISHI

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、令和元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。

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。

平成31年4月から令和2年3月までに受け付けた被検者は延べ571例、検体別では糞便（直腸拭い液を含む）193、咽頭または鼻腔拭い液360、喀痰または気管吸引液40、髄液21、尿64、血液（全血、血漿、血清、末梢血単核球、パフィーコートなど）157、痂皮5、皮膚病巣1、糞便由来cDNA26の計867件であった。

結果および考察：被検者575例中304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、患者別に表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：県内の医療機関を受診した患者119症例（咽頭または鼻腔拭い液120、血清1、髄液1）について検査を行った。

昨シーズン（2018/2019年）終期の4月に2症例からAH1型インフルエンザウイルスが、4症例からAH3型インフルエンザウイルスが、5症例からB型インフルエンザウイルスがそれぞれ検出された。非流行期の5～10月に11症例からAH1型インフルエンザウイルスが、7症例からB型インフルエンザウイルスがそれぞれ検出された。2019/2020年シーズンでは、11～3月に72症例からAH1型インフルエンザウイルスが、9症例からB型インフルエンザウイルスがそれぞれ検出

された。

インフルエンザウイルス以外では、4月に1症例からアデノウイルスが検出された。また、ライノウイルスとパラインフルエンザ3型との同時検出例が7月に1症例みられた。

上気道炎・下気道炎：4～6月、8月、11月に計20症例（咽頭または鼻腔拭い液17、喀痰2、血清1）について検査を行ったところ、1症例からB型インフルエンザウイルスが、3症例からライノウイルスが、ボカウイルスが2症例から、パラインフルエンザウイルス3型が3症例からそれぞれ検出された。また、ライノウイルスとボカウイルスとの同時検出例が2症例、ライノウイルスとB型インフルエンザウイルスとの同時検出例が1症例みられた。

新型コロナウイルス感染症（COVID-19）：1～3月に計113症例（咽頭または鼻腔拭い液109、喀痰35、血清2）の検査を行ったところ、5症例から新型コロナウイルスが検出された。

脳炎・脳症：計18症例（髄液11、血清13、糞便7、咽頭または鼻腔拭い液17、喀痰1、尿8）の検査を行ったところ、5症例の鼻腔拭い液または喀痰からAH1型インフルエンザウイルスが、2症例の血清からヒトヘルペスウイルス6型が、1症例の咽頭拭い液からライノウイルスがそれぞれ検出された。

無菌性髄膜炎：4症例（髄液4、血清3、糞便1、咽頭拭い液3、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、1症例の髄液からヒトヘルペスウイルス6型がそれぞれ検出された。また、咽頭拭い液からライノウイルスが、髄液からムンプスウイルス（ワクチン株）が同時に検出された症例が1例みられた。

急性弛緩性麻痺：2症例（髄液2、血清2、糞

表 1. 令和元年度 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	令和元年度												合計
		平成31年 4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	令和2年 1月	2月	3月	
インフルエンザ・ インフルエンザ様疾患	(被検者数)	13	6	2	3	1	3	5	13	29	31	11	2	119
	AH1型インフルエンザ	2		1	1	1	3	5	12	28	27	5		85
	AH3型インフルエンザ	4												4
	B型インフルエンザ	5	6	1						1		6	2	21
	ライノ+パラインフルエンザ3型				1									1
	アデノ	1												1
上気道炎・下気道炎	(被検者数)	5	2	8		4			1					20
	B型インフルエンザ	1												1
	ライノ	1		2										3
	ライノ+ボカ	1		1										2
	ボカ		2											2
	パラインフルエンザ3型			3										3
	ライノ+B型インフルエンザ			1										1
新型コロナウイルス 感染症 (COVID-19)	(被検者数)										2	22	89	113
	新型コロナ												5	5
脳炎・脳症	(被検者数)	2	1	1	3		1	1	2	3	3		1	18
	AH1型インフルエンザ									3	2			5
	HHV-6				1				1					2
	ライノ				1									1
無菌性髄膜炎	(被検者数)		1	1						2				4
	水痘・帯状疱疹		1											1
	ライノ+ムンプス(ワクチン株)			1										1
	HHV-6									1				1
急性弛緩性麻痺	(被検者数)				1	1								2
	ライノ				1									1
感染性胃腸炎(集団)	(被検者数)	6	11	5	4	7		7	4	15	62	10		131
	ノロGII ^a	6	10	5		3				10	52			86
感染性胃腸炎(散発)	(被検者数)	4	4	9	8	2	4	3	3	3	3	3		46
	ロタA群			6	4							1		11
	ノロGII	1		2						2	2	1		8
	サボ		1						1	1				3
	アデノ41型						1							1
	アストロ				1									1
麻疹	(被検者数)	11	5	1	1	1	1	1	2	3		2		28
	麻疹(型別不明)								1					1
	パレコ3型			1										1
風疹	(被検者数)	3	1	1	3	2	1	1	1	2				15
	風疹(1E型)				1									1
手足口病	(被検者数)				16	1	1							18
	コクサッキーA6				11									11
	コクサッキーA6+ライノ				1									1
	ライノ				2									2
	アデノ2型				1									1
つつが虫病	(被検者数)			3		1			3			1		8
(SFTS ^b 、日本紅斑熱 ^c を含む)	つつが虫病リケッチア			1					1					2
デング熱	(被検者数)					1		1	1					3
(ジカ熱 ^c 等を含む)	デング2型				1									1
A型肝炎	(被検者数)						1				1		4	6
	A型肝炎						1				1		4	6
E型肝炎	(被検者数)	1		1		1	1	1	3			1	1	10
	E型肝炎	1				1	1	1				1		5
発疹症	(被検者数)	1	2	4	7	1			1	1				17
	パレコ3型		2	3	6	1								12
	ライノ				1									1
筋炎、筋痛症	(被検者数)			3	5	1		1						10
	パレコ3型			3	4	1								8
その他 ^c	(被検者数)	3	1				2			1				7
														0
症例合計	(被検者数)	49	34	39	51	24	15	21	34	59	102	50	97	575
	病原体検出者数	23	22	31	37	8	6	6	16	46	84	14	11	304
食品	(検体数)										6		1	7
	ノロGII										1			1
	A型肝炎												0	0

■、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. ノロGII: ノロウイルスGenogroup II

b. SFTS: 重症熱性血小板減少症候群

c. その他: 4月の1症例はサイトメガロウイルス感染症、4月の2症例は血便、5月と9月の計2症例は、出血性膀胱炎、9月、12月の計2症例は、心筋炎

便2, 咽頭拭い液2, 尿1) の検査を行ったが、ポリオウイルスを含むエンテロウイルスは検出されなかった。その他のウイルスでは、ライノウイルスが1症例の糞便と咽頭拭い液から同時に検出された。

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17事例（131症例、糞便105、糞便由来cDNA26）について検査を行ったところ、11事例の86症例からノロウイルスGIIが検出された。一方、無症状の施設関係者からノロウイルスが検出された事例も4事例みられた。集団発生事例は、月別では、4月に1事例、5月に1事例、6月に1事例、7月に1事例、8月に3事例、10月に1事例、11月に1事例、12月に2事例、1月に5事例、2月に1事例それぞれ発生した。また、食中毒事例に関連して、1事例における食品6件の検査を行ったところ、1件（漬物）からノロウイルスGIIが検出された。

小児科医療機関からは、計46症例（糞便45、咽頭拭い液1）の散発例の検査依頼があった。このうち24症例がウイルス検査陽性となった。11症例からロタウイルスA群が、8症例からノロウイルスGIIが、3症例からサポウイルスが、1症例からアデノウイルス41型が、1症例からアストロウイルスがそれぞれ検出された。

麻疹：麻疹疑い例として検査依頼を受けた28症例（咽頭拭い液28、血漿または血清28、末梢血単核球26、尿25）の検査を行ったところ、11月に1症例の末梢血単核球から麻疹ウイルス（遺伝子型別不明）が検出された。麻疹ウイルスが検出されたのは、30歳代の男性であり、発症10日前までタイへの渡航歴があった。その他のウイルスでは、6月に1症例の咽頭拭い液と血清からパレコウイルスが検出された。

風疹：15症例（咽頭拭い液15、血漿または血清15、末梢血単核球15、尿15）の検査を行ったところ、1症例の咽頭拭い液および血清から風疹ウイルスが検出された。風疹ウイルスの遺伝子型は1Eであった。

手足口病：7～9月に計18症例（咽頭拭い液18）の検査を行ったところ、12症例からコクサッキーウイルスA6型が検出された。うち1症例ではコクサッキーウイルスA6型とライノウイルス

が同時に検出された。

つつが虫病（重症熱性血小板減少症候群(SFTS)、日本紅斑熱疑い含む）：計8症例（血漿または血清1、パフィーコート8、痂皮5）の検査を行ったところ、2症例の血液または痂皮からつつが虫病リケッチアが検出された。つつが虫病リケッチアの血清型は、6月の1症例はShimokoshi型、11月の1症例はKawasaki型であった。

デング熱（ジカ熱疑い等含む）：8～11月に計3症例（血漿3、末梢血単核球3、尿3、咽頭拭い液1）の検査を行ったところ、1症例からデングウイルス2型が検出された。モルジブへの渡航歴があり、帰国後数日以内の発症であった。

A型肝炎：9月、1月、3月に計6症例（糞便6）の検査を行ったところ、6症例からA型肝炎ウイルスが検出された。また、3月の症例に関連して食品1件の検査を行ったが、A型肝炎ウイルスは検出されなかった。

E型肝炎：計10症例（血清10、糞便2）の検査を行ったところ、5症例からE型肝炎ウイルスが検出された。

発疹症：計17症例（糞便16、咽頭拭い液18、気管吸引液1、血清、髄液3、尿7）の検査を行ったところ、5～8月の12症例からパレコウイルス3型が検出された。7月の1症例からはライノウイルスが検出された。

筋炎、筋痛症：計10症例（便7、咽頭拭い液7、血清7、髄液1）の検査を行ったところ、6～8月の8症例からパレコウイルス3型が検出された。

その他：4月にサイトメガロウイルス感染症疑い1症例（咽頭拭い液1、血清1、尿1）、4月に血便2症例（咽頭拭い液2）、5月および9月に出血性膀胱炎2症例（便1、咽頭拭い液1、血清、尿2）の検査を行ったが、ウイルスは検出されなかった。

謝辞：ウイルス検査は結果が判明するまでに時間がかかるが、今後の感染症の発生動向を知るうえで貴重な資料となる。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(令和元年度)

板持 雅恵 稲崎 倫子 嵩田 嵩久 佐賀由美子
長谷川澄代 小渕 正次 井川 朋子¹ 岩渕 有紀²
高森 徹³ 関 理恵子⁴ 石川 智子⁵ 三井千恵子⁶
大石 和徳

Epidemiological Surveillance of Poliovirus in Toyama Prefecture in the Fiscal Year 2019

Masae ITAMOCHI, Noriko INASAKI, Takahisa SHIMADA,
Yumiko SAGA, Sumiyo HASEGAWA, Masatsugu OBUCHI, Tomoko IKAWA¹,
Yuki IWABUCHI², Toru TAKAMORI³, Rieko SEKI⁴, Tomoko ISHIKAWA⁵,
Chieko MITSUT⁶, and Kazunori OISHI

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、2019年には2か国(アフガニスタン、パキスタン)からの176例の報告となり、99%以下まで減少した[1]。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2019年には17か国(アンゴラ、ベニン、ブルキナファソ、中央アフリカ共和国、チャド、コンゴ共和国、エチオピア、ガーナ、ニジェール、ナイジェリア、トゴ、ザンビア、パキスタン、ソマリア、ミャンマー、マレーシア、フィリピン)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、平成24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。令和元年度の調査内容は、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合わせて報告する。

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：平成31年4月から令和2年3月まで、富山県内の1下水処理場(分流水)において、月1回下水流入水を約2L採取した。下水流入水は4℃で3,000rpm、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1Lに、最終濃度0.05Mとなるように塩化マグネシウムを添加し、0.5Nの塩酸を用いてpH3.5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 (pH10.5) 10mL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 (pH8.0) 100 μ Lと0.1N硫酸50 μ Lを加えた後、4℃で10,000rpm、30分間遠心した。遠心上清を

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. 富山県厚生部健康課

表 1. 下水流入水からのウイルス分離株数

分離ウイルス		平成31年(令和元年)								令和2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	
エコー	11型	1							8	7	2	3	1	22	
	25型					1		2						3	
	30型						7	5		1	1	5	5	24	
レオ	2型	1				11								12	
計		2	0	0	0	12	7	7	8	8	3	8	6	61	

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													
(歳)	(人)	<4	4	8	16	32	64	128	256	≥512	保有者数	保有率(%)	平均抗体価	
0～1	17	1	0	0	0	1	1	2	8	4	16	(94.1)	224.8	
2～3	21	0	0	1	0	1	1	4	6	8	21	(100)	210.0	
4～9	26	0	0	0	1	3	4	5	8	5	26	(100)	146.3	
10～14	22	0	0	1	2	2	3	6	5	3	22	(100)	106.0	
15～19	16	1	0	0	1	1	1	4	5	3	15	(93.8)	161.3	
20～24	25	2	0	0	2	1	4	7	5	4	23	(92.0)	131.9	
25～29	28	0	0	0	1	3	6	7	6	5	28	(100)	131.2	
30～39	23	2	1	1	1	2	5	5	3	3	21	(91.3)	86.1	
40～49	25	3	2	2	5	1	3	8	0	1	22	(88.0)	41.2	
50～59	21	3	1	4	2	2	4	2	2	1	18	(85.7)	38.8	
60～	18	2	0	1	3	5	2	1	1	3	16	(88.9)	58.7	
合計	242	14	4	10	18	22	34	51	49	40	228	(94.2)	105.7	
(%)		(5.8)	(1.7)	(4.1)	(7.4)	(9.1)	(14.0)	(21.1)	(20.2)	(16.5)	(94.2)			

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													
(歳)	(人)	<4	4	8	16	32	64	128	256	≥512	保有者数	保有率(%)	平均抗体価	
0～1	17	0	0	0	0	3	1	1	1	11	17	(100)	245.8	
2～3	21	0	0	0	0	0	3	0	3	15	21	(100)	344.6	
4～9	26	0	0	0	1	5	4	4	3	9	26	(100)	142.4	
10～14	22	0	0	2	1	7	5	5	2	0	22	(100)	53.0	
15～19	16	0	1	2	0	3	2	5	2	1	16	(100)	61.3	
20～24	25	0	0	2	4	5	6	6	2	0	25	(100)	49.9	
25～29	28	0	0	0	3	3	14	6	2	0	28	(100)	65.6	
30～39	23	2	1	0	1	4	5	3	5	2	21	(91.3)	86.1	
40～49	25	0	1	2	1	2	4	10	3	2	25	(100)	79.9	
50～59	21	1	0	0	5	2	3	1	6	3	20	(95.2)	90.5	
60～	18	2	0	4	1	4	2	3	1	1	16	(88.9)	41.5	
合計	242	5	3	12	17	38	49	44	30	44	237	(97.9)	89.9	
(%)		(2.1)	(1.2)	(5.0)	(7.0)	(15.7)	(20.2)	(18.2)	(12.4)	(18.2)	(97.9)			

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													
(歳)	(人)	<4	4	8	16	32	64	128	256	≥512	保有者数	保有率(%)	平均抗体価	
0～1	17	0	0	1	0	1	3	0	4	8	17	(100)	200.4	
2～3	21	1	1	0	0	2	2	2	1	12	20	(95.2)	207.9	
4～9	26	0	4	2	3	3	1	2	4	7	26	(100)	64.0	
10～14	22	7	3	6	4	1	1	0	0	0	15	(68.2)	10.6	
15～19	16	4	1	3	4	2	1	0	0	1	12	(75.0)	20.2	
20～24	25	6	5	4	2	5	2	1	0	0	19	(76.0)	14.9	
25～29	28	2	4	3	7	4	5	2	0	1	26	(92.9)	23.2	
30～39	23	6	2	5	4	3	3	0	0	0	17	(73.9)	16.0	
40～49	25	4	3	5	4	3	2	1	2	1	21	(84.0)	23.8	
50～59	21	3	1	5	4	1	4	2	1	0	18	(85.7)	25.4	
60～	18	1	2	2	2	5	3	1	1	1	17	(94.4)	32.0	
合計	242	34	26	36	34	30	27	11	13	31	208	(86.0)	35.1	
(%)		(14.0)	(10.7)	(14.9)	(14.0)	(12.4)	(11.2)	(4.5)	(5.4)	(12.8)	(86.0)			

回収し、ポアサイズ $0.45 \mu\text{m}$ 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($180 \mu\text{L}$ /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、またはデンカ生研)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、エコーウイルス11型、25型、30型、レオウイルス2型が分離された。

富山県内では、感染症発生動向調査における急性弛緩性麻痺患者の報告はなかった。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平成24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[4-6]。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VDPV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：令和元年7月から9月にかけて、高岡、新川、中部、砺波の各厚生センターおよび富山市保健所管内で、0～89歳の合計242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」[7]に準じて行った。なお、平成29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[8]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°C 30分間非働化した後、その $25 \mu\text{L}$ 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、 $100\text{TCID}_{50}/25 \mu\text{L}$ 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) $25 \mu\text{L}$ を加えてよく混和し、 35°C 、3時間の中和反応を行った。中和後、Vero細胞浮遊液($1 \sim 2 \times 10^5$ 細胞/ mL)を $100 \mu\text{L}$ ずつ加え、 35°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 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97.9% (237/242)で最も高く、次いで1型が94.2% (228/242)、3型が86.0% (208/242)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50～59歳が85.7%、40～49歳が88.0%、60歳以上が88.9%であったが、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60歳以上が88.9%であったが、それ以外の年齢区分は90%以上の抗体保有率であった。一方、3型は10～14歳が68.2%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[5]。

一方、抗体保有者の幾何平均抗体価は、全体では1型105.7倍、2型89.9倍、3型35.1倍であった。年齢区分別では、1型では50～59歳の38.8倍から0～1歳の224.8倍までを示した。2型では60歳以上の41.5倍から2～3歳の344.6倍までを示した。3型では10～14歳の10.6倍から2～3歳の207.9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では、1、2、3型のいずれも100%と高い抗体保有率を示した。一方、2回の生ワクチン接種では、1型で96.0%、2型で100%と高い抗体保有率を示したが、3型は78.0%と1、2型に比し低値を示した。

表4に1、2、3型ポリオウイルスに対する中和

表 3. ワクチン接種歴別 抗体保有状況

1型											
年齢区分 (歳)	検体数 (人)	生ワクチン接種歴あり		不活化ワクチン接種歴あり		接種歴あり		接種歴なし		接種歴不明	
		2回以上	1回	生1回不活化3回	4回以上	3回	回数不明	接種歴なし	接種歴不明	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(%)	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	17				4 / 4 (100)	11 / 12 (91.7)	1 / 1 (100)				
2～3	21				16 / 16 (100)	5 / 5 (100)					
4～9	26	7 / 7 (100)	1 / 1 (100)	5 / 5 (100)	11 / 11 (100)		1 / 1 (100)		2 / 2 (100)		2 / 2 (100)
10～14	22	19 / 19 (100)							2 / 2 (100)		0 / 1 (0)
15～19	16	14 / 14 (100)	1 / 1 (100)						0 / 1 (0)		14 / 14 (100)
20～24	25	8 / 10 (80.0)	1 / 1 (100)						27 / 27 (100)		27 / 27 (100)
25～29	28								19 / 21 (90.5)		20 / 23 (87.0)
30～39	23								17 / 20 (85.0)		17 / 20 (85.0)
40～49	25								13 / 15 (86.7)		114 / 125 (91.2)
50～59	21										
60～	18										
合計	242	48 / 50 (96.0)	3 / 3 (100)	5 / 5 (100)	31 / 31 (100)	16 / 17 (94.1)	9 / 9 (100)	2 / 2 (100)	114 / 125 (91.2)		
112 / 115 (97.4%)											
2型											
年齢区分 (歳)	検体数 (人)	生ワクチン接種歴あり		不活化ワクチン接種歴あり		接種歴あり		接種歴なし		接種歴不明	
		2回以上	1回	生1回不活化3回	4回以上	3回	回数不明	接種歴なし	接種歴不明	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(%)	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	17				4 / 4 (100)	12 / 12 (100)	1 / 1 (100)				
2～3	21				16 / 16 (100)	5 / 5 (100)					
4～9	26	7 / 7 (100)	1 / 1 (100)	5 / 5 (100)	11 / 11 (100)		1 / 1 (100)		2 / 2 (100)		2 / 2 (100)
10～14	22	19 / 19 (100)							1 / 1 (100)		1 / 1 (100)
15～19	16	14 / 14 (100)	1 / 1 (100)						14 / 14 (100)		27 / 27 (100)
20～24	25	10 / 10 (100)	1 / 1 (100)						19 / 21 (90.5)		19 / 21 (90.5)
25～29	28								23 / 23 (100)		23 / 23 (100)
30～39	23								19 / 20 (95.0)		19 / 20 (95.0)
40～49	25								13 / 15 (86.7)		120 / 125 (96.0)
50～59	21										
60～	18										
合計	242	50 / 50 (100)	3 / 3 (100)	5 / 5 (100)	31 / 31 (100)	17 / 17 (100)	9 / 9 (100)	2 / 2 (100)	120 / 125 (96.0)		
115 / 115 (100%)											
3型											
年齢区分 (歳)	検体数 (人)	生ワクチン接種歴あり		不活化ワクチン接種歴あり		接種歴あり		接種歴なし		接種歴不明	
		2回以上	1回	生1回不活化3回	4回以上	3回	回数不明	接種歴なし	接種歴不明	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(%)	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	17				4 / 4 (100)	12 / 12 (100)	1 / 1 (100)				
2～3	21				16 / 16 (100)	4 / 5 (80.0)					
4～9	26	7 / 7 (100)	1 / 1 (100)	5 / 5 (100)	11 / 11 (100)		0 / 1 (0)		2 / 2 (100)		2 / 2 (100)
10～14	22	14 / 19 (73.7)							1 / 2 (50.0)		1 / 2 (50.0)
15～19	16	11 / 14 (78.6)	0 / 1 (0)						1 / 1 (100)		1 / 1 (100)
20～24	25	7 / 10 (70.0)	0 / 1 (0)						12 / 14 (85.7)		25 / 27 (92.6)
25～29	28								15 / 21 (71.4)		19 / 23 (82.6)
30～39	23								17 / 20 (85.0)		17 / 20 (85.0)
40～49	25								14 / 15 (93.3)		106 / 125 (84.8)
50～59	21										
60～	18										
合計	242	39 / 50 (78.0)	1 / 3 (33.3)	5 / 5 (100)	31 / 31 (100)	16 / 17 (94.1)	8 / 9 (88.9)	2 / 2 (100)	106 / 125 (84.8)		
100 / 115 (87.0%)											

抗体の年齢区分別保有状況を示した。すべての型に対する抗体を保有している人の割合は、全体では81.4% (197/242) であった。年齢区分別では、4～9歳が100%と高かったが、10～14歳が68.2%、15～19歳が68.8%と比較的低い値を示した。同年齢層の3型に対する比較的低い中和抗体保有率（それぞれ68.2%、75.0%）を反映しているものと考えられた（表2）。

日本では、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[9]。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[5]。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[10]。

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（2011～2019年）における乳幼児（0～7歳）の抗体保有状況[11-18]を比較した。検体数は、表5に示す計603件であり、このうち、生ワクチン2回以上接種者は211名（35.0%）、不活化ワクチン4回以上接種者は154名（25.5%）であった。図1A、1Bに2011年から2019年までの乳幼児（0～7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。不活化ワクチン移行前の2011～2012年では、0～7歳の接種歴のある人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、2019年では0～6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。

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	17						1		16 (94.1)
2～3	21					1			20 (95.2)
4～9	26								26 (100)
10～14	22					7			15 (68.2)
15～19	16					4	1		11 (68.8)
20～24	25			1		5	1		18 (72.0)
25～29	28					2			26 (92.9)
30～39	23	2				4			17 (73.9)
40～49	25			1		3	2		19 (76.0)
50～59	21			1		2	2	1	15 (71.4)
60～	18		1				2	1	14 (77.8)
合計 (%)	242 (100)	2 (0.8)	1 (0.4)	3 (1.2)	0 (0)	28 (11.6)	9 (3.7)	2 (0.8)	197 (81.4)

表5. 乳幼児の血清検体数（2011～2019年）

年齢 (歳)	検体数(人)								
	2011年	2012年	2013年	2014年	2015年	2016年	2017年	2018年	2019年
0	18	11	10	7	6	9	8	11 (9)	5
1	15	23	15	18	17	13	8	11 (9)	12
2	15	19	12	14	10	18	11 (10)	11 (10)	15
3	12	14	10	12	12	4	8	8 (7)	6
4	7	8	5	9	4	7	3	7 (6)	1
5	5	3	7	5	4	9	4	3	6
6	2	6	2	3	9	5	2	4	2
7	6	4	5	5	6	3	6	2	6

カッコ内の数値は、2型の抗体検査に用いた検体数

図2に生ワクチン2回以上接種者と不活化ワクチン4回以上接種者の最終接種日からの経過期間別の抗体保有率(図2A, 2B)および抗体保有者の幾何平均抗体価(図2C, 2D)を示した。抗体保有率は、生ワクチン、不活化ワクチンともに接種後の経過期間別で変化しなかった。しかしながら、幾何平均抗体価は、生ワクチン、不活化ワクチンともに接種後の経過期間が経るごとに漸減する傾向がみられた。

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[19, 20]。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[21-23]。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。

2019年も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[1, 5]。また、世界全体の生ワクチン使用国で発生しているcVDPVによる症例の多くが2型ウイルスによることから、2016年5月には世界的に2型の生ワクチンが停止され、3価から2価(1型+3型)の生ワクチンに替えられた。生ワクチン使用国においては、少なくとも1回の不活化ワクチン接種が追加されている[1, 5]。

本調査結果は、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ることを示している。したがって、県内への野生株、cVDPVの侵入及び伝播の可能性は、現時点では低いものと考えられた。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

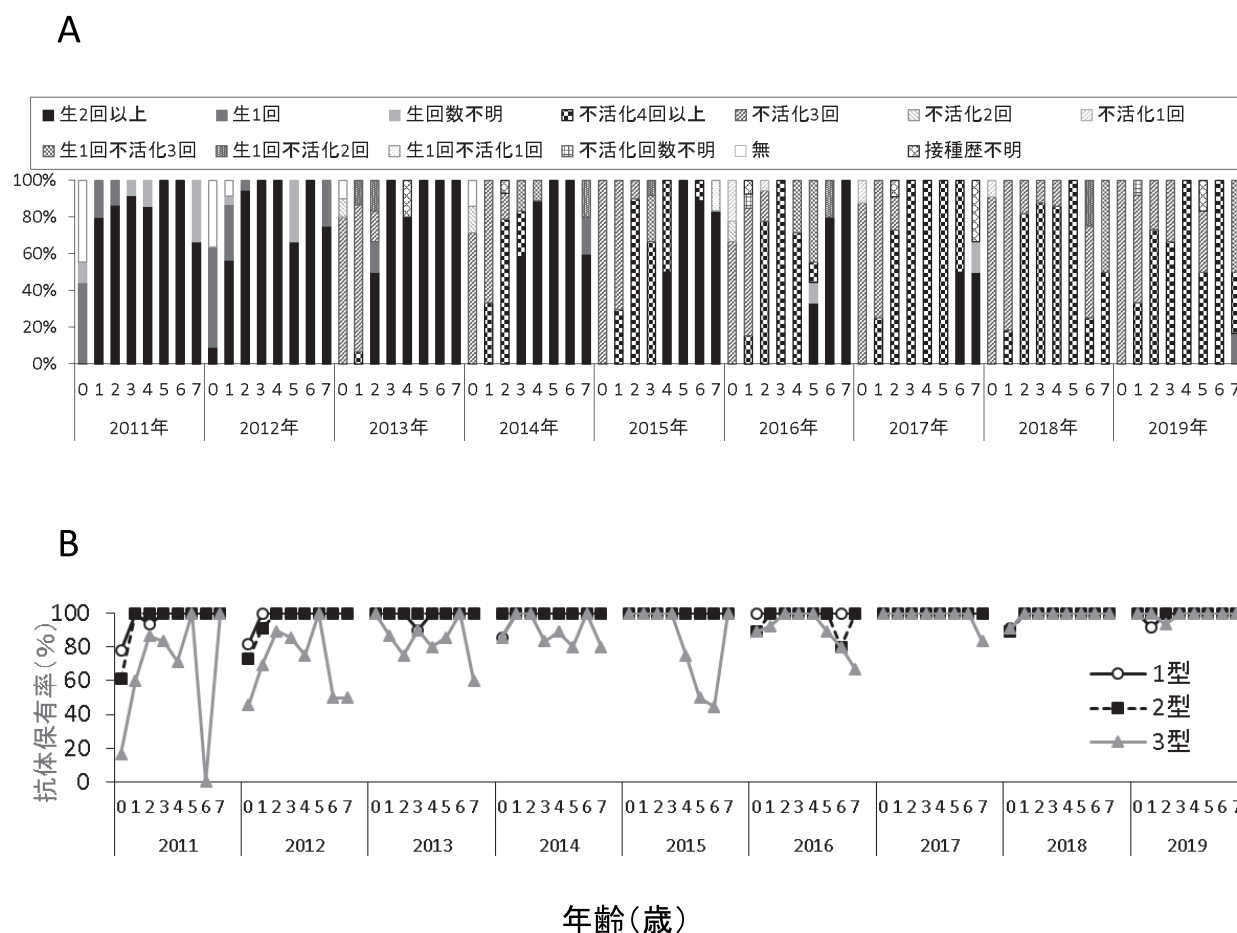


図1. 乳幼児におけるポリオワクチン接種歴と抗体保有状況(2011～2019年)。
A: ワクチン接種歴, B: 抗体保有率。

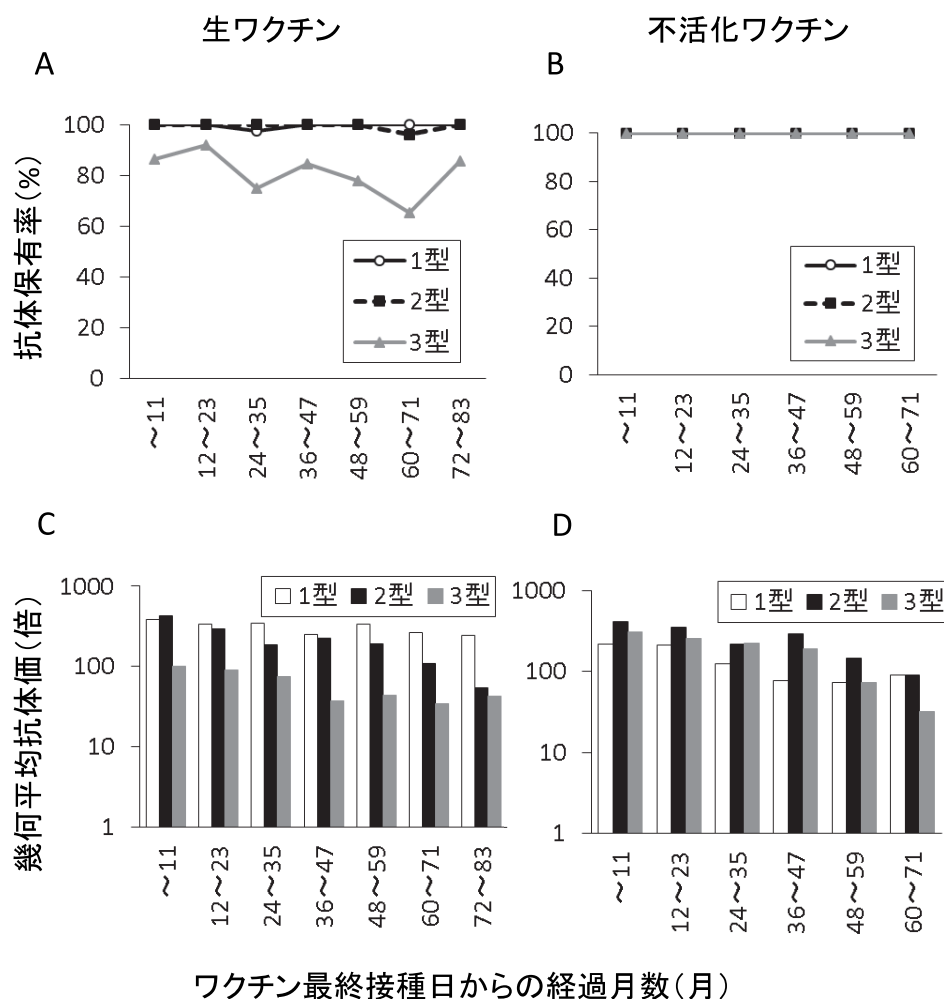


図 2. 生ワクチン 2 回以上接種者と不活化ワクチン 4 回以上接種者における最終接種日からの経過期間別の抗体保有率および抗体保有者の幾何平均抗体価。

は、ウイルスの侵入や地域伝播を防ぐために、今後もすべての型に対する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：平成 31 年 4 月～令和 2 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：令和元年 7 月から 9 月に採取された 0 歳から 89 歳までの 242 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 94.2 %，2 型 97.9 %，3 型 86.0 % であった。また、抗体保有者の幾何平均抗体価は 1 型 105.7 倍，2 型 89.9 倍，3 型 35.1 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 (2020). Weekly epidemiological record, 95, 229-240
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. 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
 5. 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
 6. 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
 7. 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 (2002). 感染症流行予測調査事業検査術式, 1-8
 8. 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
 9. 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
 10. 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
 11. 板持 (岩井) 雅恵, 堀元栄詞, 小渕正次, 他. (2012). 富山県衛生研究所年報 (平成 23 年度), 35, 62-67
 12. 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
 13. 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
 14. 長谷川澄代, 稲畑良, 小渕正次, 他. (2015). 富山県衛生研究所年報 (平成 26 年度), 38, 80-85
 15. 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
 16. 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
 17. 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
 18. 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
 19. Maladonado, Y.A., Pema-Cruz, V., Sanchez, M. et. al. (1997). J. Infect. Dis., 175, 545-553
 20. 土居穰, 鎗水宏, 山本浩, 他. (1993). 臨床とウイルス, 21, 123-131
 21. Modlin, J.F., Halsey, N.A., Thoms, M.L. (1997). J. Infect. Dis., 175, S228-234
 22. 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
 23. 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

日本脳炎流行予測調査における感染源調査(令和元年度)

佐賀由美子 嶋田 嵩久 稲崎 倫子 板持 雅恵
長谷川澄代 小渕 正次 三井千恵子¹ 大石 和徳

Epidemiological Surveillance of Japanese Encephalitis in Toyama Prefecture in the Fiscal Year 2019

Yumiko SAGA, Takahisa SHIMADA, Noriko INASAKI, Masae ITAMOCHI,
Sumiyo HASEGAWA, Masatsugu OBUCHI, Chieko MITSUI¹, and Kazunori OISHI

目的：過去5年間の国内における日本脳炎患者発生数は0～11人の間で推移している。また、過去の全国での日本脳炎流行予測調査の結果から、ウイルスは環境中に存在しているといえる[1-5]。近年においても県内でウイルスの存在が確認されており[6-9]、日本脳炎の脅威は続いている。そこで、令和元年度も本研究を継続し、日本脳炎ウイルスを媒介するコガタアカイエカ *Culex tritaeniorhynchus* の発生状況とウイルスの浸淫状況を調査したので報告する。

1. コガタアカイエカ雌成虫の発生調査

調査地と調査方法：蚊の捕集定点は平成30年[10]と同様の場所から「3. 小矢部」を除き、「5. 南砺」を加えた5定点とした(表1, 図1)。

調査期間および調査方法も平成30年とほぼ同様であった。すなわち、6月5日(第2週)から10月30日(第5週)まで、毎週水曜日のみトラップを一晩点灯し、捕集を行なった(週1捕集)。なお、電源タイマー(PT50DW デジタルプログラムタイマーⅡ, REVEX)によりライト

トラップが毎週水曜日18時から翌朝6時まで点灯するよう設定し、毎週木曜日に筆者らが捕集籠を回収・交換した。このようにして得られた捕集籠内の蚊類を、検査室にて分類・計数した。

結果：表2に、全調査定点における令和元年の成績を、図2に、コガタアカイエカ雌成虫の定点別捕集数の年次推移を示した。コガタアカイエカは、調査を開始した6月第2週から5定点全てにおいて捕集され、8月中旬から9月中旬にかけて捕集数が多くなった。「4. 射水」においては、7月上旬にも発生のピークがみられた。5定点全てにおいて、捕集数は9月下旬から顕著に減少した。令和元年の年間捕集数は、「4. 射水」が最も多く、「1. 黒部」、「2. 上市」と続いた。

表3に、平成3年以降のコガタアカイエカ雌成虫の定点別捕集数を示した。令和元年の捕集数は、過去の調査実績がない「5. 南砺」を除く4定点で平成27～30年よりも多かった。また、これら4定点の令和元年のピーク時の捕集数は、過去5年間で最も多かった(図2)。

表1. コガタアカイエカ捕集定点(畜舎)の概要(令和元年)

地点番号	略号	地名	飼育家畜
1	黒部	黒部市荻生	豚
2	上市	上市町広野	肉牛
3	婦中	富山市婦中町友坂	馬
4	射水	射水市今開発	乳牛
5	南砺	南砺市立野原西	肉牛

1. 富山県厚生部健康課

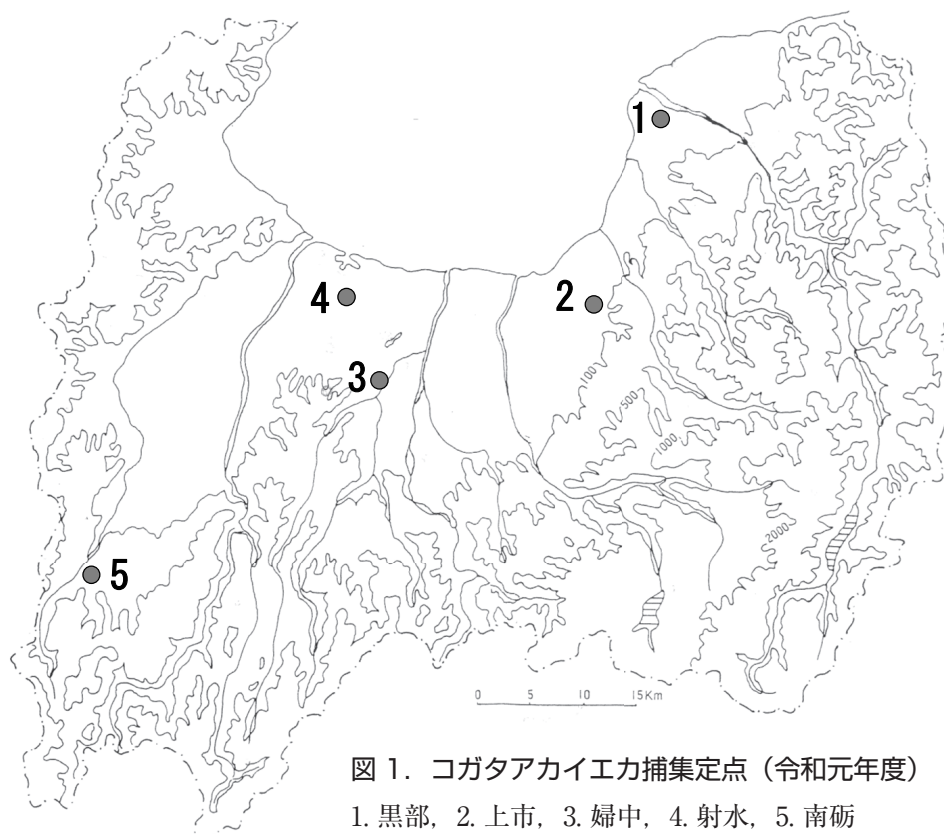


図 1. コガタアカイエカ捕集定点 (令和元年度)

1. 黒部, 2. 上市, 3. 婦中, 4. 射水, 5. 南砺

表 2. 5 定点 (畜舎) のライトトラップによるコガタアカイエカ雌成虫の捕集数 (令和元年)

調査日	調査地点					合計
	1. 黒部	2. 上市	3. 婦中	4. 射水	5. 南砺	
6月5日	169	22	48	647	8	894
12日	318	—	8	612	—	938
19日	217	170	26	1,678	18	2,109
26日	709	281	343	2,059	48	3,440
7月3日	314	—	47	780	78	1,219
10日	774	702	160	12,432	139	14,207
17日	349	—	80	1,516	—	1,945
24日	1,168	707	91	—	—	1,966
31日	1,022	1,734	176	1,552	66	4,550
8月7日	606	2,324	110	—	83	3,123
14日	1,843	3,125	1,987	—	332	7,287
21日	5,300	1,439	367	—	392	7,498
28日	4,100	4,272	629	6,622	479	16,102
9月4日	2,152	657	45	1,269	195	4,318
11日	2,978	3,288	419	7,404	1,375	15,464
18日	584	764	47	—	751	2,146
25日	177	—	35	65	—	277
10月2日	97	47	5	81	66	296
9日	44	—	0	12	397	453
16日	12	—	0	7	136	155
23日	16	5	0	6	18	45
30日	3	1	0	1	0	5
計	22,952	19,538	4,623	36,743	4,581	88,437

「—」はトラップの故障等による欠測を示す。

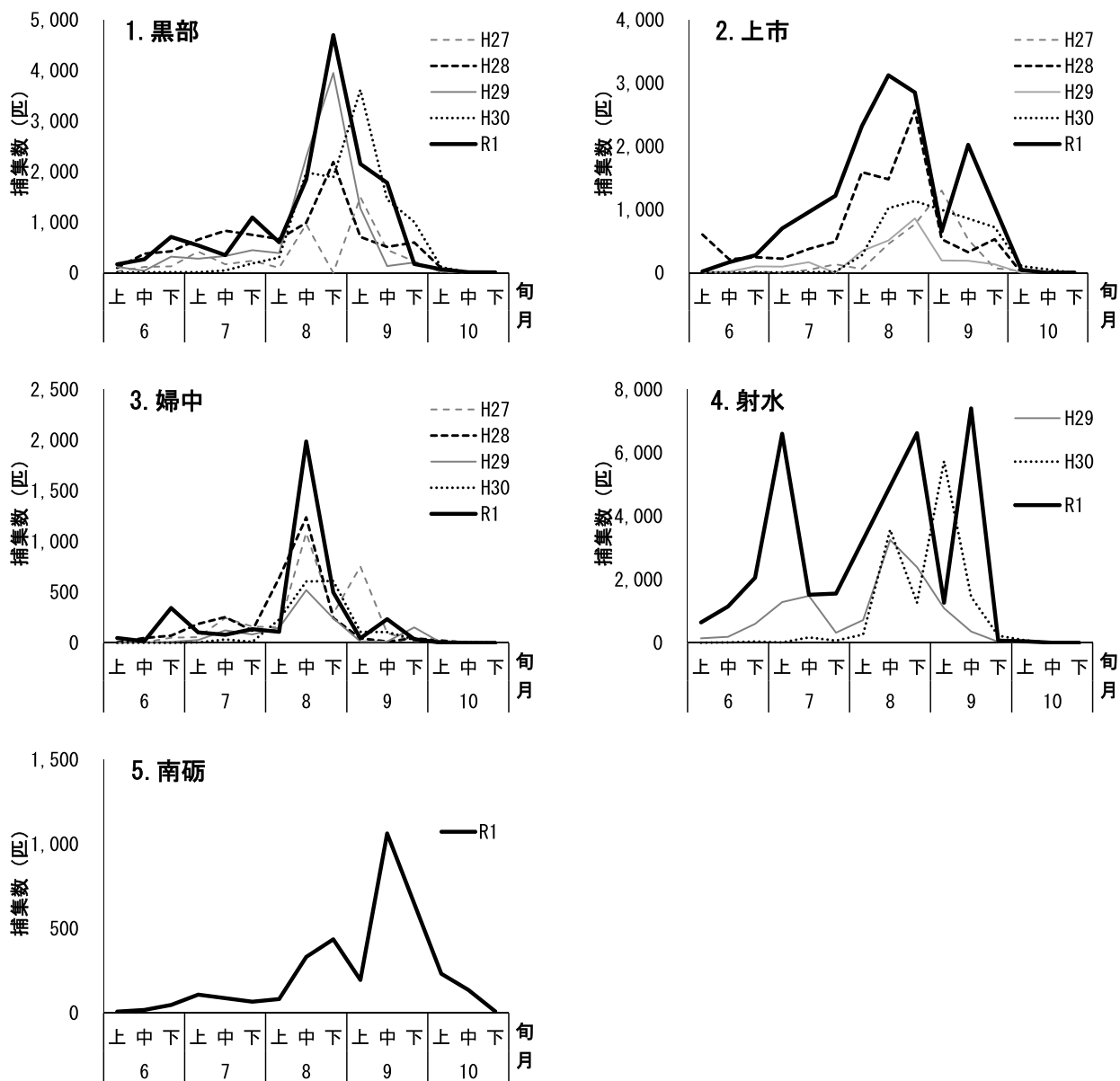


図 2. 5 定点におけるライトトラップによるコガタアカイエカ雌成虫の捕集数 (平成 27 ～令和元年)

「4. 射水」および「5. 南砺」は、各々調査実績のある平成 29 年または令和元年からの成績を示した。

表 3. 5 定点のライトトラップにおける平成 12 年以降のコガタアカイエカ雌成虫の年間捕集数

年	6月2週から 9月30日までの毎週水曜日に捕集した総数				
	1. 黒 部	2. 上 市	3. 婦 中	4. 射 水	5. 南 砺
平成12	1,181	2,965	—	—	—
平成13	1,443	6,574	—	—	—
平成14	2,187	1,288	—	—	—
平成15	2,181	195,869	8,555	25,219	—
平成16	4,880	225,945	12,733	20,421	—
平成17	8,392	295,817	11,424	34,968	—
平成18	891	16,462	3,780	10,909	—
平成19	13,819	203,488	16,337	104,019	—
平成20	10,089	35,478	23,581	78,568	—
平成21	5,011	6,119	12,423	46,180	—
平成22	8,758	14,074	50,790	—	—
平成23	36,900	20,612	36,508	—	—
平成24	5,883	4,836	16,359	—	—
平成25	11,498	7,268	20,513	—	—
平成26	1,282	880	4,323	—	—
平成27	6,214	4,000	4,234	—	—
平成28	10,068	12,131	3,931	—	—
平成29	13,988	4,223	1,873	16,857	—
平成30	14,463	4,638	2,728	16,013	—
令和元	22,780	19,485	4,618	36,636	3,964

2. 上市では平成20, 21年に定点(畜舎)の場所を変更し, 平成15年に畜舎が30mほど移設された.

4. 射水では平成29年に定点(畜舎)を変更した.

表 4. 豚血清における日本脳炎ウイルスのHI 抗体保有状況 (令和元年)

検体 採取日	抗体価								2-ME感受性 陽性数
	<10	×10	×20	×40	×80	×160	×320	≥640	
7月1日	10 (100)								
16日	10 (100)								
29, 30日	10 (100)								
8月5日	10 (100)								
12日	10 (100)								
26日	10 (100)								
9月2日	10 (100)								
17, 18日	10 (100)								
24日	9 (90)		1 (10)						
10月7日	10 (100)								
15日	10 (100)								
29日	10 (100)								
計	119 (99.2)	0 (0)	1 (0.8)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	

注 1.表中の数字は検体数を表し、括弧内の数字はパーセントを示す。

2.抗体価10倍以上を陽性とみなし、さらに40倍以上を示した血清について2-メルカプトエタノール (2-ME) 処理を行い、ウイルスの新鮮感染を検討した。

3.平成17年度から、2-ME処理により抗体価40倍から10倍未満に低下した時は2-ME感受性陽性とした。

Ⅱ. 豚血清の日本脳炎 HI 抗体保有調査

調査対象と検査方法：7月1日から10月29日までの約4ヶ月間、富山食肉総合センターに搬入された生後6か月の県内産（小矢部市、南砺市、立山町、黒部市）の豚を対象として、月3回、各10頭ずつから血液を採取し、合計120頭の日本脳炎ウイルスに対する抗体保有状況を調査した。抗体価の測定は例年と同様に感染症流行予測調査事業検査術式 [11] に従った。すなわち、アセトン処理を2回行うことにより、被検血清から非特異的赤血球凝集抑制物質を除去した後、日本脳炎CF、HI 試薬「生研」JaGAr01株（デンカ生研）を抗原として、赤血球凝集抑制（HI）反応により抗体価を測定した。血球はガチョウの赤血球を用い、マイクロタイター法で行った。抗体価10倍以上を抗体陽性とした。さらに、抗体価40倍以上を示した血清について37℃で1時間2-メルカ

プトエタノール (2-ME) 処理を行い、抗体価が8倍以上下がれば2-ME感受性陽性（= IgM 抗体陽性）とし、新鮮感染とみなした。

結果：令和元年のHI抗体価の測定結果を表4に示した。令和元年は、9月下旬に抗体陽性の豚が10%確認されたが、その他の期間には抗体陽性の豚は確認されなかった。

Ⅲ. 蚊と豚からの日本脳炎ウイルス分離

調査対象と検査方法：令和元年5月から9月にかけて、県内の富山空港、富山新港、伏木港、富山港、射水市牛舎、宇奈月温泉で捕集された蚊をウイルス分離に用いた。また、抗体調査に用いた豚血清のうち、8月から10月に採取した豚血清90検体についてもウイルス分離を行った。分離には、ヒトスジシマカ由来のC6/36細胞とアフリ

カミドリザル由来のVero9013細胞を用いた、細胞変性が現れた検体の培養上清について、日本脳炎ウイルスNS3領域を対象としたリアルタイムRT-PCR[12]を実施した。

結果：捕集蚊48プール(369個体)および豚血清90検体から日本脳炎ウイルスは分離されなかった。

考 察

令和元年の調査では、コガタアカイエカの捕集数は、平成27～30年と比較して多かった。抗体陽性の豚は1頭確認された。蚊および豚血清から日本脳炎ウイルスは分離されなかった。

これまでの調査結果[6-10,13-14]より、蚊および豚における日本脳炎ウイルスの流行は小規模な年と大規模な年があると考えられる。平成26～30年の調査における採血週あたりの豚のHI抗体保有率は、各々0～5%, 0～10%, 0～55%, 0～25%, 0%であった[6-10]。また、過去5年間の調査では、平成27, 28, 29年に蚊または豚血清から日本脳炎ウイルスが分離され、平成26, 30年はウイルスが分離されていない[6-10]。

以上のことから、過去5年間と比較して、令和元年の蚊および豚における日本脳炎ウイルスの流行は、流行の規模が大きかった平成28年や平成29年に比べて小規模であったと推測された。さらに、令和元年に抗体を保有する豚が確認されたのは9月下旬であったが、この時期にはコガタアカイエカの発生数が顕著に減少していた。したがって、令和元年における日本脳炎ウイルスが蚊からヒトへ感染する機会は、比較的少なかったと推測された。

謝 辞

本調査の実施にあたり、ご協力いただいた各定畜舎、関係厚生センター・支所および食肉総合センター、食肉検査所の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, 国立感染症研究所感染症情報センター (2016). 平成25年度感染症流行予測調査報告書, 126-153
2. 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 (2016). 平成26年度感染症流行予測調査報告書, 120-147
3. 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 (2017). 平成27年度感染症流行予測調査報告書, 118-144
4. 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 (2018). 平成28年度感染症流行予測調査報告書, 122-148
5. 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 (2019). 平成29年度感染症流行予測調査報告書, 127-144
6. 稲崎倫子, 嶋 一世, 渡辺 護, 大平恵吾 (2015). 富山衛研年報, 38, 69-75
7. 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
8. 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
9. 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
10. 佐賀由美子, 名古屋真弓, 嶋田嵩久, 他. (2019). 富山衛研年報, 42, 78-83
11. 厚生労働省健康局結核感染症課 (2002). 感染症流行予測調査事業検査術式, 27-39, 東京
12. Huang J L., Lin H T, Wang Y M, et al. (2004). J. Med. Virol., 74, 589-96
13. Watanabe M, Hasegawa S, Obara M, et al. (2011) Long-term analyses of the population dynamics of *Culex tritaeniorhynchus* and *Anopheles sinensis*, and serological surveys of Japanese encephalitis virus among swine in Toyama Prefecture, Japan, from 1969 to 2003 - a review of surveys for the prediction of epidemics of Japanese encephalitis in Toyama Prefecture over 35 years -. 159 pp. Skarafactory. Ltd., Toyama
14. Obara M, Yamauchi T, Watanabe M, et al. (2011). Am. J. Trop. Med. Hyg., 84, 695-708

日本脳炎流行予測調査における感受性調査(令和元年度)

嵩田 嵩久 長谷川澄代 佐賀由美子 板持 雅恵
稲崎 倫子 小渕 正次 井川 朋子¹ 岩渕 有紀²
高森 徹³ 関 理恵子⁴ 石川 智子⁵ 三井千恵子⁶
大石 和徳

Serological Investigation of Japanese Encephalitis in Toyama Prefecture in the Fiscal Year 2019

Takahisa SHIMADA, Sumiyo HASEGAWA, Yumiko SAGA, Masae ITAMOCHI,
Noriko INASAKI, Masatsugu OBUCHI, Tomoko IKAWA¹, Yuki IWABUCHI²,
Toru TAKAMORI³, Rieko SEKI⁴, Tomoko ISHIKAWA⁵,
Chieko MITSU⁶, and Kazunori OISHI

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：令和元年7月から9月に、新川、中部、高岡、砺波の各厚生センターおよび富山市保健所管内で、合計242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)/25 μ L に調整したウイルス液（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：242名のうち、日本脳炎ウイルスに対する抗体陽性者は158名(65.3%)であった。図1に年齢群別の抗体保有率を示した。年齢

群別に見ると、5～39歳では92.0%以上と高い抗体保有率を示した。これに対し、0～4歳では15.4%、40～49歳では28.0%、50～59歳では19.0%、60歳以上では44.4%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のは、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79.5% (31/39) であった（図3、表1）。また、0～4歳の年齢群で、ワクチン接種歴あり中の抗体陽性者の割合は75% (3/4) であり、ワクチン接種歴なし中の抗体陽性者の割合は9.7% (3/31) 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。60歳以上の年齢群で40～59歳の年代群より抗体保有率がやや増加するのは、60歳以上の年

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. 富山県厚生部健康課

年齢群では日本脳炎ウイルスに自然感染する機会が多かっ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を見ると、「接種歴なし」の中に、抗体陽性者が9名(21.4%)存在した。これら抗体陽性者9名に関しては日本脳炎ウイルスに自然感染した可能性が考えられた。なお、この9名うち0歳8ヶ月齢の1名に関しては、母親からの移行抗体が残存したために抗体陽性となった可能性も考えられた。この9名の日本脳炎の罹患歴は7名が「なし」、2

名が「不明」であった。日本脳炎の罹患歴が「なし」であった7名については不顕性感染であったと推定された。

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]。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65.3%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。また、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。富山県では平成9年度を最後に日本脳炎患者は発生していないものの[8]、豚の抗体保有調査やウイルス分離調査において、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[8-12]。

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、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. 稲崎倫子, 嶋 一世, 小淵正次, 他. (2015). 富山衛研年報, 38, 76-79
2. 名古屋真弓, 稲崎倫子, 小淵正次, 他. (2016). 富山衛研年報, 39, 76-79
3. 稲崎倫子, 青柳由美子, 米田哲也, 他. (2017). 富山衛研年報, 40, 75-77
4. 稲崎倫子, 青柳由美子, 米田哲也, 他. (2018). 富山衛研年報, 41, 75-77
5. 名古屋真弓, 嶋田嵩久, 板持雅恵, 他. (2019). 富山衛研年報, 42, 84-86
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 (2019). 平成29年度感染症流行予測調査報告書, 117-144
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

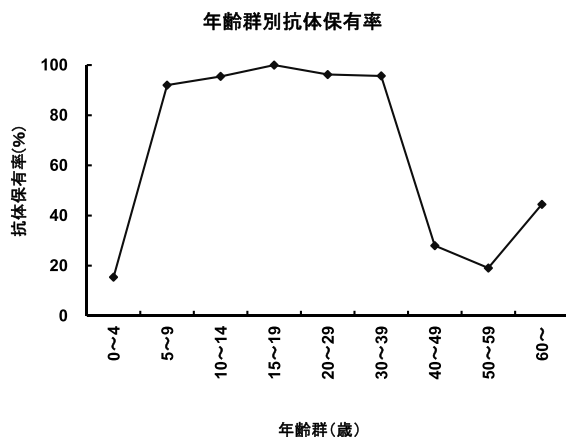


図 1. 令和元年度の年齢群別抗体保有率

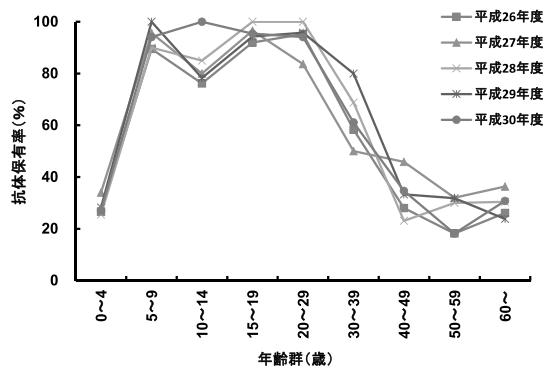


図 2. 平成 26 ～ 30 年度の年齢群別抗体保有率

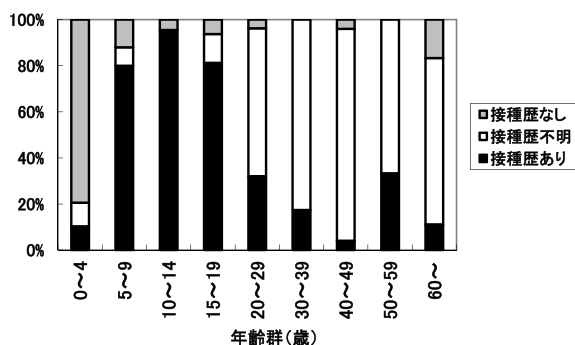


図 3. 令和元年度の年齢群別ワクチン接種歴

表 1. 年齢群別およびワクチン接種歴別の抗体保有率

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	3 / 4	75.0%		3 / 31	9.7%		0 / 4	0%		6 / 39	15.4%	
0～2	0 / 0			3 / 28	10.7%		0 / 4	0%		3 / 32	9.4%	
3	2 / 3	66.7%		0 / 3	0%		0 / 0			2 / 6	33.3%	
4	1 / 1	100%		0 / 0			0 / 0			1 / 1	100%	
5～9	20 / 20	100%		1 / 3	33%		2 / 2	100%		23 / 25	92.0%	
10～14	21 / 21	100%		0 / 1	0%		0 / 0			21 / 22	95%	
15～19	13 / 13	100%		1 / 1	100%		2 / 2	100%		16 / 16	100%	
20～29	16 / 17	94.1%		2 / 2	100%		33 / 34	97.1%		51 / 53	96.2%	
30～39	3 / 4	75.0%		0 / 0			19 / 19	100%		22 / 23	95.7%	
40～49	0 / 1	0%		0 / 1	0%		7 / 23	30.4%		7 / 25	28.0%	
50～59	1 / 7	14%		0 / 0			3 / 14	21.4%		4 / 21	19.0%	
60～	2 / 2	100%		2 / 3	67%		4 / 13	30.8%		8 / 18	44.4%	
計	79 / 89	88.8%		9 / 42	21.4%		70 / 111	63.1%		158 / 242	65.3%	

9. 稲崎倫子, 嶋 一世, 渡辺 護, 他. (2015). 富山衛研年報, 38, 69-75
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, 稲崎倫子, 青柳由美子, 他. (2017). 富山衛研年報, 40, 68-74
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

インフルエンザ流行予測調査(令和元年度)

小渕 正次	五十嵐笑子	鳶田 嵩久	稲崎 倫子
佐賀由美子	長谷川澄代	板持 雅恵	井川 朋子 ¹
岩渕 有紀 ²	高森 徹 ³	関 理恵子 ⁴	石川 智子 ⁵
	三井千恵子 ⁶	大石 和徳	

Serological Investigation of Influenza Virus Infection in Toyama Prefecture in the Fiscal Year 2019

Masatsugu OBUCHI, Emiko IGARASHI, Takahisa SHIMADA,
Noriko INASAKI, Yumiko SAGA, Sumiyo HASEGAWA, Masae ITAMOCHI,
Tomoko IKAWA¹, Yuki IWABUCHI², Toru TAKAMORI³, Rieko SEKI⁴,
Tomoko ISHIKAWA⁵, Chieko MITSUI⁶, and Kazunori OISHI

インフルエンザの流行開始前、かつワクチン接種前のインフルエンザウイルスに対する県民の抗体保有状況を把握し、今後の流行予測および注意喚起を促すことを目的として、調査を行った。その調査結果を報告する。

なお本調査は予防接種法に基づき、厚生労働省結核感染症課が主体となり、全国の地方衛生研究所、保健所、医療機関等が協力して実施した。

対象および方法

2019年7～9月に調査を行った。令和元年度は、県内住民242名について調査を行った。年齢群別調査数は0～4歳：39名、5～9歳：25名、10～14歳：22名、15～19歳：16名、20～29歳：53名、30～39歳：23名、40～49歳：25名、50～59歳：21名、60歳以上：18名であった。

検査方法は、調査対象者から採血し、血清中のインフルエンザウイルス赤血球凝集抑制(HI)抗体価を測定した。抗体価の測定は、「感染症流行予測調査事業検査術式(平成14年発行)」に準じて行い、血清希釈10倍を最低希釈倍数とした。

抗原は、次の4種類を使用した(2019/20シーズンワクチン株)。

1. A/Brisbane/02/2018 (IVR - 190) (H1N1)pdm09
2. A/Kansas/14/2017 (X-327) (H3N2)
3. B/Phuket/3073/2013 (山形系統)

4. B/Maryland/15/2016 (NYMC BX-69A) (ビクトリア系統)

抗原はデンカ生研製を使用した。血球は1, 3, 4の抗原に対して0.5%ニワトリ血球浮遊液を、2の抗原に対しては0.75%モルモット血球浮遊液を使用した。

調査の協力が得られた242名を対象に、2019/20シーズンの予防接種歴とインフルエンザ罹患歴について、年度末にアンケート調査を行った。調査項目は、ワクチン接種回数と接種年月日、インフルエンザの発症年月日と検出された型とした。

結 果

1. 年齢群別抗体保有状況

HI抗体価10倍未満～2560倍の抗体保有状況およびHI抗体価40倍以上の抗体保有率を年齢群別に示した(表1)。なお、本稿においては、抗体保有率の高低について60%以上を「高い」、40～59%を「比較的高い」、25～39%を「中程度」、10～24%を「比較的低い」、5～9%を「低い」、5%未満を「極めて低い」として以下の表現に用いた。

- (1) A/Brisbane/02/2018 (H1pdm09) に対する抗体保有率

本株に対するHI抗体価40倍以上の抗体保有率は平均27.7%であった。年齢群別では、5～9歳

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. 富山県厚生部健康課

表1. 年齢群別インフルエンザ HI 抗体保有状況

A/Brisbane/02/2018 (H1pdm09)

年齢群	人数	各HI抗体価別人数										40倍以上 抗体保有者(率)	
		<10	10	20	40	80	160	320	640	1280	2560	人数	%
0-4	39	33	3	2	1	0	0	0	0	0	0	1	2.6
5-9	25	6	4	4	6	4	1	0	0	0	0	11	44.0
10-14	22	4	8	1	6	3	0	0	0	0	0	9	40.9
15-19	16	3	2	6	1	4	0	0	0	0	0	5	31.3
20-29	53	7	14	10	13	6	2	1	0	0	0	22	41.5
30-39	23	3	6	4	8	1	0	0	0	1	0	10	43.5
40-49	25	16	5	2	2	0	0	0	0	0	0	2	8.0
50-59	21	11	7	1	0	1	1	0	0	0	0	2	9.5
≥60	18	7	3	3	3	2	0	0	0	0	0	5	27.8
合計	242	90	52	33	40	21	4	1	0	1	0	67	27.7

A/Kansas/14/2017 (H3N2)

年齢群	人数	各HI抗体価別人数											40倍以上 抗体保有者(率)	
		<10	10	20	40	80	160	320	640	1280	2560	人数	%	
0-4	39	4	18	16	1	0	0	0	0	0	0	1	2.6	
5-9	25	0	6	8	10	1	0	0	0	0	0	11	44.0	
10-14	22	0	7	6	7	2	0	0	0	0	0	9	40.9	
15-19	16	0	2	2	7	4	1	0	0	0	0	12	75.0	
20-29	53	1	27	15	7	3	0	0	0	0	0	10	18.9	
30-39	23	1	14	7	1	0	0	0	0	0	0	1	4.3	
40-49	25	2	17	1	5	0	0	0	0	0	0	5	20.0	
50-59	21	3	11	4	2	0	1	0	0	0	0	3	14.3	
≥60	18	0	7	5	6	0	0	0	0	0	0	6	33.3	
合計	242	11	109	64	46	10	2	0	0	0	0	58	24.0	

B/Phuket/3073/2013 (山形系統)

年齢群	人数	各HI抗体価別人数											40倍以上 抗体保有者(率)	
		<10	10	20	40	80	160	320	640	1280	2560	人数	%	
0-4	39	29	9	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0
5-9	25	6	7	5	4	2	1	0	0	0	0	0	7	28.0
10-14	22	3	6	3	9	1	0	0	0	0	0	0	10	45.5
15-19	16	1	8	4	2	1	0	0	0	0	0	0	3	18.8
20-29	53	0	6	15	11	19	2	0	0	0	0	0	32	60.4
30-39	23	0	3	6	12	1	1	0	0	0	0	0	14	60.9
40-49	25	4	8	8	4	0	1	0	0	0	0	0	5	20.0
50-59	21	4	3	9	4	1	0	0	0	0	0	0	5	23.8
≥60	18	4	7	3	3	1	0	0	0	0	0	0	4	22.2
合計	242	51	57	54	49	26	5	0	0	0	0	0	80	33.1

B/Maryland/15/2016(NYMC BX-69A)(ビクトリア系統)

年齢群	人数	各HI抗体価別人数											40倍以上 抗体保有者(率)	
		<10	10	20	40	80	160	320	640	1280	2560	人数	%	
0-4	39	37	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0
5-9	25	12	11	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0
10-14	22	4	8	5	1	4	0	0	0	0	0	5	22.7	
15-19	16	3	6	5	1	0	1	0	0	0	0	2	12.5	
20-29	53	11	17	13	10	2	0	0	0	0	0	12	22.6	
30-39	23	4	7	6	5	1	0	0	0	0	0	6	26.1	
40-49	25	1	3	7	9	5	0	0	0	0	0	14	56.0	
50-59	21	4	3	9	3	2	0	0	0	0	0	5	23.8	
≥60	18	6	5	2	3	2	0	0	0	0	0	5	27.8	
合計	242	82	62	49	32	16	1	0	0	0	0	49	20.2	

表2. 予防接種歴別 HI 抗体保有率 (抗体価 40 倍以上)

抗原		A/Brisbane/02/2018 (H1pdm09)		A/Kansas/14/2017 (H3N2)		B/Phuket/3073/2013 (山形系統)		B/Maryland/15/2016(NYMC BX-69A)(ビクトリア系統)	
予防接種		有	無	有	無	有	無	有	無
年齢区分	0-4	0.0%	5.9%	5.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	5-9	42.9%	44.4%	50.0%	33.3%	35.7%	11.1%	0.0%	0.0%
	10-14	50.0%	27.3%	37.5%	36.4%	37.5%	45.5%	12.5%	27.3%
	15-19	30.0%	20.0%	70.0%	80.0%	20.0%	0.0%	10.0%	0.0%
	20-29	50.0%	22.7%	28.6%	0.0%	64.3%	50.0%	21.4%	18.2%
	30-39	45.5%	41.7%	9.1%	0.0%	54.5%	66.7%	45.5%	8.3%
	40-49	11.1%	8.3%	22.2%	16.7%	33.3%	16.7%	66.7%	50.0%
	50-59	14.3%	9.1%	28.6%	9.1%	28.6%	18.2%	42.9%	18.2%
	≥60	25.0%	0.0%	33.3%	25.0%	16.7%	0.0%	16.7%	25.0%
全体		31.1%	20.4%	29.4%	14.6%	34.5%	28.2%	20.2%	16.5%

表3. 年齢別ワクチン接種者 (率) および罹患率 (率)

年齢群	回答人数	ワクチン接種者 (率)		罹患率 (率)			
				ワクチン接種有		ワクチン接種無	
		人数	%	人数	%	人数	%
0-4	25	18	72.0%	5	27.8%	2	28.6%
5-9	11	5	45.5%	2	40.0%	0	0.0%
10-14	15	7	46.7%	2	28.6%	1	12.5%
15-19	13	6	46.2%	1	16.7%	0	0.0%
20-29	24	17	70.8%	0	0.0%	0	0.0%
30-39	16	10	62.5%	0	0.0%	0	0.0%
40-49	18	7	38.9%	2	28.6%	3	27.3%
50-59	15	7	46.7%	1	14.3%	2	25.0%
≥60	13	10	76.9%	1	10.0%	0	0.0%
全体	150	87	58.0%	14	16.1%	8	12.7%

44.0%, 30～39歳 43.5%, 20～29歳 41.5%, 10～14歳 40.9%と比較的高く, 15～19歳, 60歳以上の群ではそれぞれ31.3%, 27.8%と中程度であった。50～59歳, 40～49歳の群ではそれぞれ9.5%, 8.0%と低かった。一方, 0～4歳の群では2.6%と極めて低かった。

(2) A/Kansas/14/2017 (H3N2) に対する抗体保有率

本株に対する HI 抗体価 40 倍以上の抗体保有率は平均 24.0%であった。年齢群別では, 15～19歳の群が75.0%と高かった。5～9歳, 10～14歳の群では, 44.0%, 40.9%と比較的高く, 60歳以上では33.3%と中程度であった。40～49歳, 20～29歳, 50～59歳, の群ではそれぞれ, 20.0%, 18.9%, 14.3%と比較的低く, 30～39歳, 0～4歳の群では4.3%, 2.6%と極めて低かった。

(3) B/Phuket/3073/2013 (山形系統) に対する抗体保有率

本株に対する HI 抗体価 40 倍以上の抗体保有率は平均 33.1%であった。年齢群別では, 30～39歳, 20～29歳の群では, それぞれ60.9%, 60.4%と高く, 10～14歳, の群でも 45.5%と比較的高かった。5～9歳の群では28.0%と中程度であった。一方, 50～59歳, 60歳以上, 40～49歳, 15～19歳の群では, それぞれ23.8%, 22.2%, 20.0%, 18.8%と比較的低く, 0～4歳の群では0%と極めて低かった。

(4) B/Maryland/15/2016 (NYMC BX-69A) (ビクトリア系統) に対する抗体保有率

本株に対する HI 抗体価 40 倍以上の抗体保有率は平均 20.2%であった。年齢群別では, 40～49歳の群が56.0%と比較的高かった。60歳以上, 30

～39歳の群では、それぞれ27.8%、26.1%と中程度であった。一方、50～59歳、10～14歳、20～29歳、15～19歳の群では、それぞれ23.8%、22.7%、22.6%、12.5%と比較的低く、0～4歳および5～9歳の群では、いずれも0%と極めて低かった。

2. 予防接種歴別抗体保有状況

調査対象者242名中、予防接種歴不明の20名を除く222名におけるインフルエンザワクチン接種率（採血時に2018/19シーズンのワクチン接種歴ありと回答した者）は53.6%（119名）であった。年齢群別の接種率は33.3（50～59歳）～80.0（60歳以上）%で、各年齢群間で最大46.7ポイントの差がみられた。

予防接種歴別抗体保有率を表2に示す。全年齢群における平均抗体保有率を予防接種歴別に見ると、A/Brisbane/02/2018（H1pdm09）で31.9%：20.4%（接種歴有群：接種歴無群、以下同）、A/Kansas/14/2017（H3N2）で29.4%：14.6%、B/Phuket/3073/2013（山形系統）で53.5%：28.2%、B/Maryland/15/2016（NYMC BX-69A）（ビクトリア系統）で20.2%：16.5%と、接種歴有群は無群と比較して高い傾向がみられた。

3. ワクチン接種歴および罹患状況

回答が得られたのは、242名中150名で回答率は、62.0%であった。ワクチン接種率は、58.0%であった。年齢群別では60歳以上の群が、76.9%と最も高く、40～49歳の群が38.9%と最も低かった。全年齢群における罹患率をワクチン接種の有無で見ると、接種歴有群16.1%、接種歴無群12.7%であった（表3）。

考 察

年齢群別抗体保有率では、昨年度の調査結果[1]と比較するとA型に対する抗体保有率の低下がみられた。これは、A型のワクチン株が2種類とも変更となったため、抗体保有者が減少したためと考えられる。また、従来からの調査と同様に、0～4歳の年齢群においては、他の年齢群よりも抗体保有率が低いことから、インフルエンザに対する注意が必要であると考えられた。

予防接種歴別抗体保有率では、2019/20シーズンのワクチン株がA型で2種類変更したことにより、昨年よりも抗体保有率が大きく低下したが、いずれの株においても接種歴有群が接種歴無群よりも高い傾向がみられた。このことは、予防接種が抗体価の維持にも一定の効果があることを示唆している。

年度末のアンケート調査では、5～9歳、10～14歳、15～19歳、40～49歳および50～59歳の群の接種率は50%以下であった。特に40～49歳の群は38.9%であったことから、接種率が低い年齢群に対して、ワクチン接種を呼びかける必要があると考えられる。

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多数の関係各位に深謝いたします。

文 献

1. 米田哲也, 小渕正次, 畠田嵩久, 他. (2019). 富山県衛研年報, 42, 95-98

インフルエンザ発生動向調査(2019/20 シーズン)

小渕 正次	五十嵐笑子	鳶田 嵩久	稲崎 倫子
佐賀由美子	長谷川澄代	板持 雅恵	井川 朋子 ¹
岩渕 有紀 ²	高森 徹 ³	関 理恵子 ⁴	石川 智子 ⁵
	三井千恵子 ⁶	大石 和徳	

Epidemiological Surveillance of Influenza Virus Infection in Toyama Prefecture, 2019-2020

Masatsugu OBUCHI, Emiko IGARASHI, Takahisa SHIMADA,
Noriko INASAKI, Yumiko SAGA, Sumiyo HASEGAWA, Masae ITAMOCHI,
Tomoko IKAWA¹, Yuki IWABUCHI², Toru TAKAMORI³, Rieko SEKI⁴,
Tomoko ISHIKAWA⁵, Chieko MITSUI⁶, and Kazunori OISHI

感染症法に基づく感染症発生動向調査にしたがい、インフルエンザの発生状況の正確な把握と分析を行い、その結果を県民や医療機関へ迅速に提供・公開することにより、インフルエンザのまん延を防止することを目的として調査を実施した。

2019/20 シーズンの患者発生状況およびウイルスの検出状況について報告する。

材料と方法

指定提出機関として、黒部市民病院（黒部市）、植野内科医院（立山町）、しむら小児科クリニック（高岡市）、木田小児科医院（射水市）、力耕会金井医院（砺波市）、柳下小児科内科医院（砺波市）、中島こどもクリニック（富山市）、しんたにこどもクリニック（富山市）、その他に、厚生連高岡病院（高岡市）、市立砺波総合病院（砺波市）の協力を得て、合計95件（2019年9月2日～2020年3月6日採取）の検体について検査を行った。

検査方法は、患者から採取した鼻腔拭い液からRNAを抽出し、リアルタイムRT-PCRによるウイルス遺伝子の検出によって型・亜型の同定を行った[1]。インフルエンザウイルス陰性の検体については、ライノウイルス、RSウイルス、ヒトメタニューモウイルス、パラインフルエンザウイルス1～4型、コロナウイルス、アデノウイルス、エンテロウイルス、ヒトボカウイルスを対象

としたリアルタイム RT-PCR を行った[2]。

結果および考察

1. インフルエンザ患者発生状況

2019/20 シーズンにおけるインフルエンザ患者の最初の報告は2019年第36週（9/3～9/9）であった。散発流行の後、2019年第46週（11/11～11/17）には定点医療機関当たり3.00人となり、流行が始まった。2019/20 シーズンの富山県におけるインフルエンザの流行開始時期は、前シーズンと比べて2週早かった[3]。その後、患者報告数が増加し、2019年第48週（11/25～12/1）に注意報レベル（10人/定点）を超え、2019年第51週（12/9～12/15）にピークに達した（26.88人/定点）。ピークの時期は例年よりもかなり早く、前シーズンと比べて5週早かった。ピーク値は過去5シーズンで最も低く、シーズンを通して警報レベル（30人/定点）を超えることはなかった（図1）。

その後は急激に減少し、2019年第14週（3/30～4/5）には定点医療機関当たり0.48人となり、流行期が終わった。流行期の終了も前シーズンより4週早かった。

「集団かぜ」による学級閉鎖等の措置は、2019年10月7日（第41週）から2020年3月1日（第9週）までに延べ150施設でとられた。昨シーズンと比較すると29件少なかった。その内

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. 富山県厚生部健康課

(人/定点)

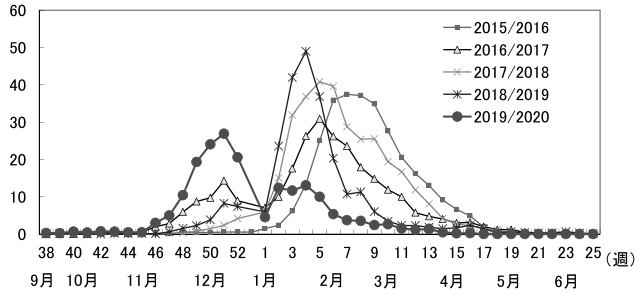


図1. 過去5シーズンの患者報告数の推移 (富山県)

施設数

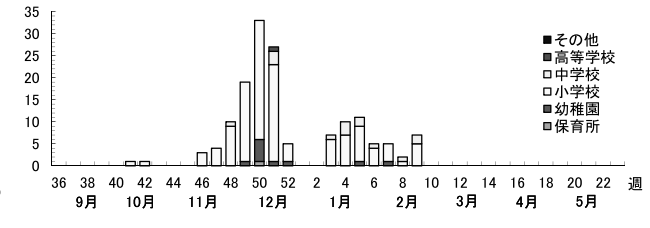


図2. インフルエンザ様疾患の集団発生 (2019/20 シーズン)

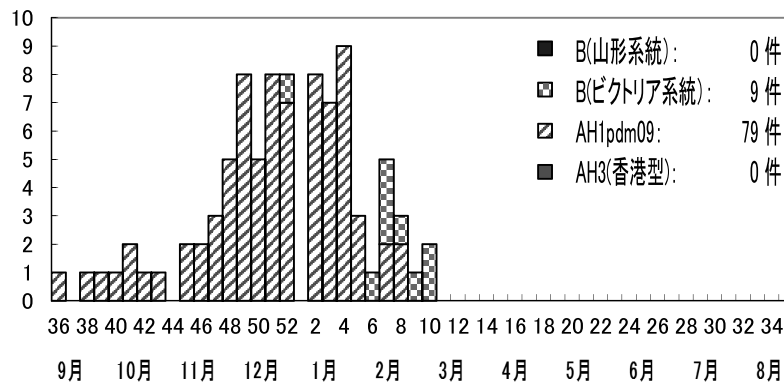


図3. 週別・型別インフルエンザウイルス検出数 (2019/20 シーズン)

表 1. 施設別インフルエンザウイルス検出数

管轄厚生 センター・ 保健所等	検体採取施設	採取日	検体数	検出数	型・亜型			
					AH1pdm	AH3	B(山形 系統)	B(ビクトリ ア系統)
新川	黒部市民病院	2020.1.6～ 2020.2.2	5	5	5	0	0	0
中部	植野内科医院	2019.9.17～ 2020.2.16	12	12	12	0	0	0
高岡	厚生連高岡病院	2019.12.5～ 2019.12.24	2	2	2	0	0	0
高岡	木田小児科医院	2020.1.8～ 2020.3.6	4	2	1	0	0	1
高岡	しむら小児科クリニック	2019.9.26～ 2020.2.14	15	12	11	0	0	1
砺波	力耕会 金井病院	2019.10.24～ 2020.1.30	19	18	18	0	0	0
砺波	市立砺波総合病院	2019.12.3	1	1	1	0	0	0
砺波	柳下小児科内科医院	2019.11.25～ 2020.2.27	9	9	8	0	0	1
富山市	中島こどもクリニック	2019.12.7～ 2020.2.15	8	8	8	0	0	0
富山市	しんたにこどもクリニック	2019.9.2～ 2020.3.2	20	19	13	0	0	6
合計			95	88	79	0	0	9

訳は、保育園・幼稚園が11施設、小学校が124施設、中学校14施設、高等学校が1施設であった(図2)。集団かぜによる累積患者数は2,587名であり、前シーズンより約1,000名少なかった。学級閉鎖等の措置数のピークは、患者報告数のピークと近い2019年第50週であり、前シーズンと比べて6週早かった。2019/20シーズンは、2月26日(第9週)を最後に集団発生はみられなかった。前シーズンと比べて流行期が短く学級閉鎖等の措置数や累積患者数が少なかったのは、新型コロナウイルスの流行に伴う感染対策の徹底と2020年3月から始まった全国一斉休校の影響と考えられる。

2. インフルエンザウイルスの検出状況

95検体について、インフルエンザウイルスの遺伝子検出を試みた。成績を表1に示す。ウイルスの型・亜型別では、AH1pdm09が79件(89.8%)、AH3亜型が0件(0%)、B型(山形系統)が0件(0%)、B型(ビクトリア系統)が9件(10.2%)の合計88件が検出された。以上の結果から、2019/20シーズンはAH1pdm09が主流であったことが示された。

週別の検出状況を見ると、シーズン初めからAH1pdm09のみ検出され、シーズンを通してAH3型は検出されなかった。B型は2019年第52週に1件検出された。

しかし、その後は2020年第6週以降8件検出されたのみであった(図3)。検出されたB型はいずれもビクトリア系統で、B型における山形系統

とビクトリア系統の割合は、前シーズンと同様ビクトリア系統が多かった。

インフルエンザウイルスが陰性だった7検体のうち、2検体(2月採取)からヒトメタニューモウイルスが検出された。これらは、いずれもインフルエンザ様疾患の検体であった。しかしながら、検体数が少ないことや、検体搬入が一部の医療機関に限られていることなどから、これらウイルスの地域流行については不明である。

謝 辞

検査材料の採取と臨床症状の調査にご協力いただいた黒部市民病院、植野内科医院、厚生連高岡病院、木田小児科医院、しむら小児科クリニック、力耕会金井医院、市立砺波総合病院、柳下小児科内科医院、中島こどもクリニック、しんたにこどもクリニックに深謝いたします。また、ご協力いただいた多数の関係各位に深謝いたします。

文 献

1. インフルエンザ診断マニュアル第3版(平成26年9月 国立感染症研究所監修)
2. Obuchi M, Yagi S, Oguri A, et al. (2015). Jpn J Infect Dis., 68, 259-261
3. 米田哲也, 小渕正次, 寫田嵩久, 他. (2019). 富山県衛研年報, 42, 99-101

動物由来感染症浸淫状況調査(令和元年度)

嵩田 嵩久 佐賀由美子 稲崎 倫子 板持 雅恵
 小淵 正次 高梨 善雄¹ 服部 直樹¹ 飯野志津子¹
 油本 絢子¹ 大石 和徳

 Epidemiological Surveillance of Zoonosis in Toyama Prefecture
 in the Fiscal Year 2019

Takahisa SHIMADA, Yumiko SAGA, Noriko INASAKI, Masae ITAMOCHI,
 Masatsugu OBUCHI, Yoshio TAKANASHI¹, Naoki HATTORI¹,
 Shizuko IINO¹, Ayako ABURAMOTO¹, and Kazunori OISHI

国内においては、デング熱、ウエストナイルウイルス感染症などの蚊媒介性ウイルス性感染症や腎症候性出血熱、ハンタウイルス肺症候群などは流行していない。しかしながら、媒介蚊や宿主となるヒトや鳥類、げっ歯類などの移動に伴い、ウイルスが国内へ持ち込まれる可能性がある。

このような背景から、ウイルスの海外からの侵入状況を監視することを目的として、蚊からの蚊媒介ウイルス検出および野生げっ歯類からのハンタウイルス抗体検出を行った。なお、検出対象とする蚊媒介性ウイルスはウエストナイルウイルス、

デングウイルス、ジカウイルス、チクングニアウイルスとした。

材料と方法

I. 蚊からのウイルス分離

令和元年5～9月に、県内の富山空港、港湾地区、畜舎、観光地の計6地点で捕集した蚊をウイルス分離に供した(表1)。ウイルス分離は、以下の方法により行った。まず、捕集蚊を細胞維持培地で摩砕し、ヒトスジシマカ由来のC6/36細

表1. ウイルス分離に用いた蚊

種名	地点別の蚊の個体数(検体数)						合計
	港湾			空港	観光地	畜舎	
	富山新港	伏木港	富山港	富山空港	宇奈月温泉	牛舎(射水市)	
コガタアカイエカ	1 (1)	1 (1)	0	9 (3)	0	136 (3)	147 (8)
アカイエカ群	19 (5)	4 (2)	27 (5)	75 (9)	0	1 (1)	126 (22)
ヒトスジシマカ	25 (3)	2 (2)	23 (4)	43 (6)	1 (1)	0	94 (16)
カラツイエカ	0	0	0	1 (1)	0	0	1 (1)
シロカタヤブカ	0	0	0	0 0	1 (1)	0	1 (1)
合計	45 (9)	7 (5)	50 (9)	128 (19)	2 (2)	137 (4)	369 (48)

表2. 野生げっ歯類におけるハンタウイルス抗体検出

番号	捕獲月	調査地点	種類	性別	ELISA	IFA		
						HTN	PUU	SEO
2064	2019年11月	新港	ハツカネズミ	♂	要検討	< 16	< 16	< 16
2065	2019年11月	新港	ハツカネズミ	♂	陰性	< 16	< 16	< 16
2066	2019年11月	新港	ハツカネズミ	♂	要検討	< 16	< 16	< 16

1. 新潟検疫所富山空港出張所

胞およびアフリカミドリザル由来のVero9013細胞に接種した。7 ± 1 日間隔で培養上清を新しい細胞に接種することを2回繰り返し、細胞変性効果を指標にウイルスを分離した。ウイルスが分離された培養上清からRNAを抽出し、遺伝子検出に用いた。遺伝子検出には、ウエストナイルウイルス、デングウイルス、ジカウイルス、チクングニアウイルスを対象としたリアルタイム RT-PCR[1, 2, 3, 4]を用いた。

II. 野生げっ歯類の抗体調査

令和元年5月から11月に、富山空港、富山新港、伏木港、富山港においてシャーマントラップまたは捕獲籠を用いて野生げっ歯類の捕獲を行った。捕獲されたハツカネズミ3頭の血清を用いて、腎症候性出血熱およびハンタウイルス肺症候群の原因ウイルスを対象としたELISA法[5]により抗体検出を行った。ELISA法で吸光度の高かった検体については、間接蛍光抗体法（IFA法）による抗体価の測定を行った。IFA法の抗原は、腎症候性出血熱のHantaan型、Puumala型及びSeoul型を用い、抗体価16倍以上を陽性とした。

結 果

I. 蚊からのウイルス分離

捕集した蚊48検体（369個体）について日本脳炎ウイルス、ウエストナイルウイルス、デングウイルス、ジカウイルス、チクングニアウイルスの分離を行ったところ、いずれの蚊からもウイルスは分離されなかった。

II. 野生げっ歯類の抗体調査

令和元年11月に捕獲されたハツカネズミ3検体についてELISA法でハンタウイルスに対する抗体検出を行ったところ、2検体で吸光度が陰性対照より高かった。IFA法による追加検査を行ったところ、いずれも抗体陰性であった（表3）。

考 察

今回の調査ではこれまでの調査と同様に、海外から県内への蚊媒介性ウイルスおよびハンタウイルスの侵入は確認されなかった。

しかしながら、平成26年8月にはデング熱の国内感染事例が確認され、その後2か月余りで東京都を中心に162例の患者が報告された[6]。令和

元年にもデング熱の国内感染事例が4例報告されている[7]。そのうち3例は同じ学校の生徒であり、修学旅行先の奈良市内または京都市内で感染したと推定されている[7]。また、令和元年には、ネパールから帰国後にデング熱を発症した同居家族を吸血した蚊を介して感染したと推定されるデング熱症例も那覇市から報告されている[7]。ジカ熱もデング熱と同様、国内に広く分布するヒトスジシマカによって媒介される[7]ことから、ジカウイルスが日本に持ち込まれた場合、流行する可能性は否めない。また、ウエストナイルウイルスが米国に侵入した例[9-10]および1980年代に全国の港湾地区でハンタウイルスに対する抗体を持つネズミが確認された例[11]など、動物由来感染症が国外から侵入する例が過去に多数確認されている。これらのことから、今後も海外からの動物由来感染症の侵入に備え、引き続き監視体制を維持する必要があると考えられる。

謝 辞

本調査の実施にあたり、ご協力いただいた北海道大学獣医学部 荏和宏明先生、定点畜舎、国立感染症研究所昆虫医科学部、国立感染症研究所ウイルス第一部第二室の各位に深謝いたします。

文 献

1. Lanciotti RS, Kerst AJ, Nasci RS, et al. (2000). J Clin Microbiol., 38, 4066-4071
2. 国立感染症研究所. デングウイルス感染症診断マニュアル. (2014). <http://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/Dengue2014.pdf> (2020年7月2日アクセス可能)
3. Lanciotti RS, Kosoy OL, Laven JJ, et al. (2008). Emerg Infect Dis., 14, 1232-1239
4. 国立感染症研究所. チクングニアウイルス検査マニュアル. (2013). <https://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/CHIKV.v1.1.pdf> (2020年7月2日アクセス可能)
5. Sanada T, Kariwa H, Saasa N, et al. (2012). J Vet Med Sci., 74, 1237-1242
6. 国立感染症研究所. (2015). IASR, 36, 33-35
7. 国立感染症研究所. (2020). IASR, 41, 89-101
8. 厚生労働省. (2019). デング熱の国内感染が疑われる症例の発生について、令和元年9月20日健感発 0920 第3号厚生労働省健康局長

通知

9. Asnis DS, Conetta R, Teixeira AA, et al. (2000) . Clin Infect Dis., 30,413-418
10. Petersen LR, Roehrig JT. (2001) . Emerg Infect Dis., 74, 611-614
11. 有川二郎 (1999). 日獣会誌, 52, 225-229

感染症媒介蚊の生息状況調査(令和元年)

佐賀由美子 鳶田 嵩久 稲崎 倫子 板持 雅恵
長谷川澄代 小渕 正次 大石 和徳

Distribution of Mosquitoes in Toyama Prefecture, 2019

Yumiko SAGA, Takahisa SHIMADA, Noriko INASAKI, Masae ITAMOCHI,
Sumiyo HASEGAWA, Masatsugu OBUCHI, and Kazunori OISHI

蚊媒介ウイルス感染症には、デング熱、チクングニア熱、ジカウイルス感染症、日本脳炎、ウエストナイル熱などがある。国内では、毎年少数ではあるが日本脳炎の国内発生が報告されている他、デング熱やチクングニア熱などの輸入症例が継続的に報告されており、特にデング熱の輸入症例は近年増加傾向にある[1]。平成26年には、デング熱の国内感染症例が69年ぶりに発生し、最終的に162例が報告された[2]。令和元年にもデング熱の国内感染4症例が発生した[3]。国内にも広く分布するヒトスジシマカ *Aedes albopictus* によって媒介されるデング熱、チクングニア熱、ジカウイルス感染症は、ヒト→蚊→ヒトの感染環を持つため、散发例に止まらず地域流行する恐れがあり、重点的に対策を行う必要がある。

今回、デング熱などの蚊媒介感染症対策の基礎資料とすることを目的に、蚊の発生活動を調査した。なお、これまでの調査結果などから県内の観光地において蚊媒介感染症の地域流行が起こるリスクは低いと考えられたため、今年度は観光地における蚊の生息状況の調査は実施しなかった。

材料と方法

令和元年5～10月に週1回、太閤山ランド(富山県民福祉公園, 富山県射水市)で調査を行った(図1)。蚊の捕集は、CDC ライトトラッ

プ512型(John W. Hock 社製)の豆電球を外して吸引トラップとして用い、誘引源のドライアイス約1kgと共に地上約1～1.5mの高さに設置し、一晩作動させて行った。蚊の発生が少ない5月および10月第3週以降は8分間人囀法も併用した。このようにして得られた蚊類を、検査室にて分類・計数した。

結 果

太閤山ランドにおける種別捕集数を表1に示した。5属8種518個体の蚊が捕集された。優占して捕集された種はヒトスジシマカ(捕集割合52.5%)であった。他に捕集された種も過去の調査と同様で、特筆すべき種は捕集されなかった。

太閤山ランドにおける令和元年のヒトスジシマカの発生は5月下旬から10月下旬にかけて観察さ



図1. 蚊の生息状況調査地点

表1. 太閤山ランドにおける蚊の種別捕集数

調査 方法	<i>Aedes</i> 属				<i>Culex</i> 属				<i>Tripteroides</i> 属		<i>Armigeres</i> 属		<i>Uranotaenia</i> 属		計		
	ヒトスジ シマカ		ヤマトヤブカ		アカイエカ		コガタ アカイエカ		ハマダラ イエカ		キンバラ ナガハシカ		オオクロ ヤブカ			フタクロ ホシチビカ	
	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂		♀	♂
トラップ	251	1	1	0	106	1	76	0	0	2	29	4	16	0	7	0	494
人囀法	11	9	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	24
計	262	10	1	0	106	2	76	0	0	2	30	5	16	0	8	0	518

れた。ヒトスジシマカが多数捕集された期間は、7月中旬から10月中旬であった（表2、図2）。

太閤山ランドにおける平成29～令和元年のヒトスジシマカ雌成虫の捕集数の推移を比較すると、令和元年の捕集数が多くなる時期は7月中旬と過去3年に比較して早かったが、ピーク時の捕集数は平成30年より少なく、平成28年および29年と同程度であった（図2）。

考 察

県内におけるヒトスジシマカの令和元年の発生は、5月下旬から10月中旬にかけて確認され、この期間にヒトへの吸血リスクがあることが示された。ヒトスジシマカの発生ピークの時期は地点や年次によって変動がみられるが、これまでの調査結果[4-7]を総合すると、ヒトスジシマカの発生が多くなるのは、7月から10月上旬の期間であっ

た。この期間は、蚊媒介性感染症対策を講じる上で最も注意すべき期間である。

ヒトスジシマカの幼虫の発育速度は発生源の水温に依存するため[8]、気温が高くなると成虫に羽化するまでの期間が短縮される。現在のところ、県内でヒトスジシマカの成虫が確認され始める時期は5月中旬から5月下旬であるが、今後、温暖化が進行した場合、時期が早まる可能性がある。また、ヒトスジシマカの発生源は竹の切り株などの小さな水溜まりであることから、発生数の増減には気温に加えて降雨の影響を受ける。そのため、ヒトスジシマカの発生状況は地域変動や年次変動が大きく、生息状況の調査は地域ごとに単年ではなく複数年にわたって行うことが望ましい。デング熱などの蚊媒介感染症対策を講じる際の基礎資料とするために、今後も継続してヒトスジシマカの発生状況を調査する必要がある。

観光地においては、海外からの観光客によって

表2. 太閤山ランドにおけるヒトスジシマカ雌成虫の調査日別捕集数

表2-1. 令和元年5月～7月														
調査地点(調査方法)	5月				6月				7月					
	1週	2週	3週	4週	1週	2週	3週	4週	1週	2週	3週	4週	5週	
地点1(CDCトラップ)	0	0	0	2	2	0	0	1	0	*	30	11	21	
地点2(CDCトラップ)	0	0	0	0	0	3	0	1	2	9	8	5	8	
地点1(8分間人囃法)	0	0	1	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
計	0	0	1	4	2	3	0	2	2	9	38	16	29	
-: 調査実施せず * : トラップの故障等による欠測														

表2-2. 令和元年8月～10月														
調査地点(調査方法)	8月				9月				10月					計
	1週	2週	3週	4週	1週	2週	3週	4週	1週	2週	3週	4週	5週	
地点1(CDCトラップ)	15	17	8	0	6	13	13	8	14	1	10	2	7	181
地点2(CDCトラップ)	4	4	3	0	3	*	0	4	3	6	2	1	4	70
地点1(8分間人囃法)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	2	3	11
計	19	21	11	0	9	13	13	12	17	7	15	5	14	262
-: 調査実施せず * : トラップの故障等による欠測														

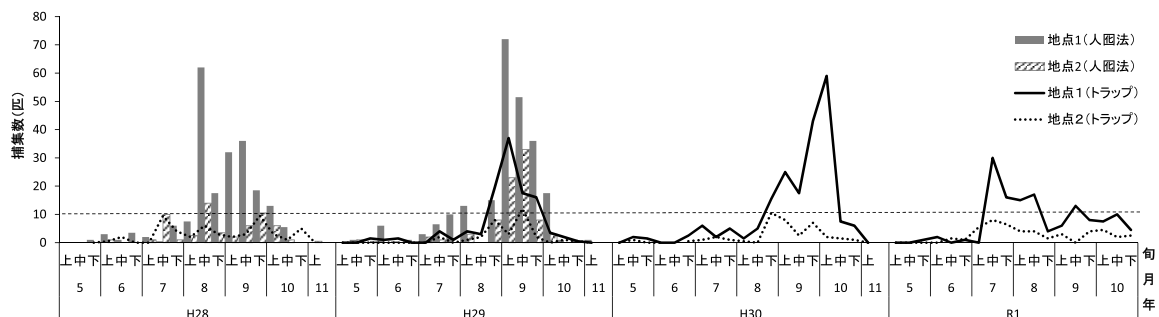


図2. 太閤山ランドにおけるヒトスジシマカ雌成虫の年次別季節消長（平成28～令和元年）

平成28年は地点1で人囃法、地点2で人囃法とCDCトラップを、平成29年は地点1、2ともに人囃法とCDCトラップを、平成30～令和元年は地点1、2ともにCDCトラップを用いて調査した。グラフ中の水平線（---）は捕集数が多いと判断する目安（10匹）を示した。

蚊媒介ウイルスが持ち込まれる可能性がある。平成 26 年には、観光客の多い東京都の代々木公園を中心にデング熱の国内流行が発生し、最終的に 162 例の国内感染例が報告された[2]。平成 26 年に代々木公園などにおいて感染が拡大した要因としては、ヒトスジシマカの生息密度の高さに加え、長期間滞在する人や日常的に散歩を行う人などが多数存在したことが挙げられる。すなわち、ウイルス血症になったヒトを蚊が刺咬し、多くのウイルス保有蚊が発生したと考えれた。一方、県内観光地においては、これまでの調査の結果、ヒトスジシマカの生息密度が高く、かつ多くの人が日常的に訪問する地点はなかった。したがって、県内の観光地において蚊媒介感染症の地域流行が起こるリスクは低いと考えられた。そのため、今年度は県内観光地における蚊の生息状況の調査は行わなかった。しかしながら、ヒトスジシマカの生息密度は風通しなどわずかな環境条件の違いにより狭い場所であっても大きく異なるとの報告[9]があることから、今後の環境条件の変化によってはその生息密度が高くなる可能性がある。したがって、観光地における蚊の生息状況についても定期的に調査する必要がある。

文 献

1. 国立感染症研究所. 感染症発生動向調査週報. 1998. <https://www.niid.go.jp/niid/ja/idwr.html> (2020 年 7 月 1 日アクセス可能)
2. 国立感染症研究所. (2015). IASR, 36, 33-34
3. 国立感染症研究所. (2020). IASR, 41, 89-96
4. 佐賀由美子, 畠田嵩久, 名古屋真弓, 他. (2019). 富山県衛生研究所年報, 42, 107-109
5. 佐賀由美子, 長谷川澄代, 稲崎倫子, 他. (2018). 富山県衛生研究所年報, 41, 109-113
6. 佐賀由美子, 名古屋真弓, 稲崎倫子, 他. (2017). 富山県衛生研究所年報, 40, 104-109
7. 佐賀由美子, 名古屋真弓, 稲崎倫子, 他. (2016). 富山県衛生研究所年報, 39, 93-96
8. 津田良夫. (2013). 蚊の観察と生態調査, 47-48, 北隆館
9. Tuda Y, Kim K. (2012). Med. Entomol. Zool., 63, 223-230

令和元年度富山県病原体等検査の精度管理調査 －チフス菌の同定－

磯部 順子 前西 絵美 内田 薫 金谷 潤一
木全 恵子 綿引 正則 大石 和徳

Quality Control of the Bacterial Testing of Pathogen in Toyama Prefecture (2019) － Identification of *Salmonella* Typhi －

Junko ISOBE, Emi MAENISHI, Kaoru UCHIDA, Jun-ichi KANATANI,
Keiko KIMATA, Masanori WATAHIKI, Etsuko YUNOKI, 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。令和元年度の調査は、三類感染症に位置づけられているチフスの診断根拠となる「チフス菌の同定」を項目とした。検査用試料は、衛生研究所で培地に菌を接種し、各検査施設に配布した。結果は、各々の報告書から集計・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、砺波厚生センターおよび衛生研究所の5機関を対象とし、令和2年1月28日～2月21日に実施した。

検査項目はチフス菌・パラチフス菌を疑う菌を同定することとした。市販のカジトン培地（栄研化学）に表1の菌を接種して配布した。

表1. 配布試料と接種菌名

試料名	接種菌名
A	<i>Salmonella</i> Enteritidis
B	<i>Salmonella</i> Infantis
C	<i>Salmonella</i> Dublin

チフス菌、パラチフス菌は国立感染症研究所で規定するバイオセーフティレベル3 (BSL3) であることから、P3レベルの実験室で取り扱うことが定められている。そのため、本調査では、チフス菌、パラチフス菌ではなく、生化学性状等が似ているため、誤同定する可能性があるサルモネラを検体とした。配布した菌の性状等は衛生研究所で確認した。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：各機関の成績は表2に示した。すべての機関で、検体A、B、Cのいずれもチフス菌、パラチフス菌を否定し、正しく回答した。結果の詳細を次に示す（表3－5）。

① 供試菌の選択

配布したチフス疑い菌株（以下供試菌）を始めに純培養菌にする工程で、非選択培地と選択培地の両方に培養して発育菌を観察することが重要となる。非選択培地上で確認するポイントは、発育した集落が単一性状（湿潤、辺縁、厚みなど）を示しているかという点である。集落の大きさは平板上の発育密度によって変わるので観察には注意が必要である。一方、選択分離培地での確認ポイントは、集落がチフス菌、あるいはパラチフス菌の特徴を示す、すべてが単一の特徴を示すという点である。この観察でいずれの培地においてもチフス菌様の単一性状の集落が観察された場合、純培養菌と推定され、次の工程に進むことができる。この段階で、菌の混在が疑われた場合は、選択分離培地上のチフス菌の特徴を示す単独集落の上部から培地に触れないように釣菌し、非選択培地および性状確認用の培地（TSI、LIM）等に接種して、同定を進めることになる。したがって、供試菌を寒天平板に培養する段階で、単独集落が得られるような塗抹手技が重要となる。実際の検査では、寒天平板培養菌が搬入されることもあるが、その検査方法はここに示した手順と同様となる。選択分離培地は、1機関を除き、SS寒天培地、DHL寒天培地、クロモアガーサルモネラを併用していた。硫化水素の産生性を指標とする培地としてSS、DHL寒天培地を使用したと思われる。

硫化水素はチフス菌がわずかに産生、パラチフス A 菌は全く産生しないという特徴があるため、その点を観察できる培地は有用である。しかしながら、硫化水素の産生性が低いサルモネラもあり、チフス菌が疑われるケースも散見されるので、注意を要する。クロモアガーサルモネラ培地では、一般的なサルモネラと同様、チフス菌、パラチフス菌も藤色となる。硫化水素産生性は確認できないが、培地の pH に影響されることなく、集落の色調を指標とすることができる点は極めて有用である。サルモネラで藤色になる機序は明らかではない。

② 血清凝集試験

血清凝集試験の結果は、いずれの機関も検体 A と C でサルモネラ免疫血清 O9 に凝集を認め、検体 B では O9, O2 どちらにも凝集を認めず、正しく回答されていた。血清凝集試験はチフス菌に限らず、様々な細菌検査で実施される手技である。原理は抗原抗体反応で、手技は容易であるが、供試する菌の濃度、量、滴下する抗血清の量などの最適比を日頃から習得しておくことが大事である。初心者において菌濃度や血清の添加量により偽陰性となる場合がしばしば認められる。

一方、チフス菌の特徴である Vi 抗原と抗血清との凝集性について、すべての機関が凝集を認めなかったと回答した。Vi 抗原は、チフス菌、パラチフス (C) 菌と一部の *Salmonella* Dublin のみが保有するとされ、とりわけチフス菌については、人からの新鮮分離株には認められるが、人工培地で継代された菌では Vi フェージの脱落によりその凝集性は失われることが多い。一方、新鮮分離されたチフス菌において、しばしば Vi 血清のみに凝集し、O9 抗血清との凝集反応が阻害される場合があり、注意が必要である。このような結果が得られた場合には 100℃での加熱により Vi 抗原を遊離させて、O 抗原との凝集試験を行う必要がある。

H 抗原については、検体 A, C は免疫血清 O9 と凝集しているのでチフス菌を疑い、サルモネラ免疫血清 H-d との凝集性を確認しなければならない。1 機関は性状検査でチフス菌を否定したことから H-d との凝集試験は未実施であった。他の 4 機関はすべてで H-d との凝集性は陰性と回答した。チフス菌では、他のサルモネラに比べて運動性が弱いことが知られており、H 免疫血清との凝集性の判定には注意が必要である。H-d,あるいは H-a

と凝集しないことだけでチフス菌を否定はできない。できれば、H-d や H-a だけでなく、市販されている他の血清との凝集性を確認するのが望ましい。チフスが強く疑われる菌で H-d や H-a に凝集しない場合、SOP にあるように運動性を高める培養 (25℃培養、クレイギー管の使用等) を行うのが望ましい。H 免疫血清との凝集反応は、50℃の恒温水槽で実施するが、その温度、使用した機器名など記載されていない機関が多かった。凝集が認められない場合に温度条件を確認する必要があるため、記録を残すべきである。

③ 生化学性状試験

チフス菌、パラチフス菌は、硫化水素産生性、ガス産生性、リジンデカルボキシラーゼ産生性、運動性などのおもな性状を TSI と LIM 培地ではほぼ判別できる。チフス菌、パラチフス菌の生化学性状でもっとも特徴的なのは、硫化水素の産生性が一般的なサルモネラに比べ、極めて弱いか、産生しないという点にある。したがって、TSI での発育状況の観察は重要となる。今回の供試菌の中に含まれていたサルモネラのように、硫化水素を産生しない株も存在すること、赤痢菌もよく似た性状となることから、とりわけパラチフス菌での性状観察は重要である。

TSI については、腸内細菌の硫化水素産生性の判定に欠くことのできない培地である。元来、腸内細菌はそのほとんどが硫化水素産生性であるが、その産生性は強、中等、弱産生に分けられる。これらのうちの強産生性菌のみが黒変するように開発されたのが TSI 培地である。それゆえ、硫化水素の産生性の結果は、TSI 培地での性状であることを記載するのが望ましい。

④ 陽性コントロール

細菌分離を行う際、培地の精度を確認するために陽性コントロールを同時に検査するのが基本である。しかしながら、チフス菌とパラチフス菌の場合、バイオセーフティレベル 3 (BSL3) であるため、P3 実験室で検査を行わなければならない。したがって、P3 施設のない機関ではチフス菌疑い株の検査に陽性コントロールを置くことは不可能である。1 機関では、一般的なサルモネラの株 (O9) をコントロールとして検査を実施していた。これにより、選択培地の精度、生化学性状のための培地や試薬、免疫血清の精度なども確認できるため、有用な手技であると思われた。残念ながら、

パラチフス菌のO抗原と同じ「O2」のサルモネラは入手困難であるので、免疫血清の精度を確認するのは難しいかもしれない。

考察：富山県ではチフス、パラチフスは3～5年に1例程度の報告があるのみの希少感染症となっている。しかしながら、海外からの観光客や技能訓練生などが増加している現状では、検査体制を

整えておく必要がある。また、感染症法において、チフスとパラチフスは3類感染症に位置付けられているため、その根拠となる起因菌の同定は迅速かつ正確でなければならない。陽性コントロールでも述べたが、BSL 3と決められている菌種で困難である。今回の供試菌のような性状を示す菌株を用いて、日頃からチフス菌を同定する手順、技術を習得しておくことが必要である。

表 2. 精度管理報告書のまとめ

A		B		C	
チフス菌	パラチフス菌	チフス菌	パラチフス菌	チフス菌	パラチフス菌
1 否定	否定	否定	否定	否定	否定
2 否定	否定	否定	否定	否定	否定
3 否定	否定	否定	否定	否定	否定
4 否定	否定	否定	否定	否定	否定
(サルモネラ属菌09群)		(サルモネラ属菌07群)		(サルモネラ09群)	
5 否定	否定	否定	否定	否定	否定

表 3. 検体 A の結果

機関名	Typhi	ParaA	培地名	色調	使用培地	色調	使用培地	色調	使用培地	色調
1	否定	否定	羊血寒	灰色	SS	中心黒	DHL	中心黒	クロモアガーサルモネラ	藤色
2	否定	否定	TSA	灰色	SS	半透	DHL	半透明	クロモアガーサルモネラ	藤色
3	否定	否定	羊血寒	無色 半透明	SS	無色 半透明 中心部黒	DHL	無色 半透明 中心部黒	クロモアガーサルモネラ	藤色
4	否定	否定	血液寒天	白色	SS	透明・中心部 わずかに黒	DHL	透明・中心部 わずかに黒	クロモアガーサルモネラ	藤色
5	否定	否定	TSA	白色			未使用		クロモアガーサルモネラ	藤色

TSI	LIM	スリット	アラビノース	キシロース	クエン酸	マロン酸	オルニチン	VP	ONPG	オキシダーゼ	O2	O9	Vi	Hd	Ha
-,+,-,+w	+, -, +	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
-,+,-,+w	+, -, +	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
-,+,-,+w	+, -, +	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	NT
-,+,-,+w	+, -, +	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	NT
-,+,-,+w	+, -, +	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	NT

表 4. 検体 B の結果

機関名	Typhi	ParaA	培地名	色調	培地名	色調	培地名	色調	培地名	色調
1	否定	否定	TSA	白	S S	白	D H L	白	クロモアガーサルモネラ	藤色
2	否定	否定	TSA	灰白	S S	半透	D H L	半透明	クロモアガーサルモネラ	藤色ラフ
3	否定	否定	羊血寒	白色半透明	S S	無色半透明 中心部黒色	D H L	無色半透明 中心部黒色	クロモアガーサルモネラ	藤色
4	否定	否定	血液寒天	白	S S	無色透明	D H L	無色透明	クロモアガーサルモネラ	藤色
5	否定	否定	TSA	白			未使用		クロモアガーサルモネラ	藤色

TSI	LIM	スルシット	アラビノース	キシロース	クエン酸	マロン酸	オルニチン	V P	ONPG	オキシドール	02	09	Vi	Hd	Ha
- , + , + , + , - , +	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
- , + , + , + , - , +	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	07
- , + , + , + , - , +	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	07
- , + , + , + , - , +	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	07
- , + , + , + , - , +	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	07

表 5. 検体 C の結果

機関名	Typhi	ParaA	培地名	色調	培地名	色調	培地名	色調	培地名	色調
1	否定	否定	TSA	灰色	S S	中心黒	D H L	中心黒	クロモアガーサルモネラ	藤色
2	否定	否定	TSA	灰色	S S	半透明	D H L	半透明	クロモアガーサルモネラ	藤色ラフ
3	否定	否定	羊血寒	白色半透明	S S	無色半透明 中心部黒色	D H L	透明 中心部黒	クロモアガーサルモネラ	藤色
4	否定	否定	血液寒天	白色	S S	透明無色	D H L	透明 中心部黒	クロモアガーサルモネラ	藤色
5	否定	否定	TSA	白			未使用		クロモアガーサルモネラ	藤色

TSI	LIM	スルシット	アラビノース	キシロース	クエン酸	マロン酸	オルニチン	V P	ONPG	オキシドール	02	09	Vi	Hd	Ha
- , + , + , + , - , +	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
- , + , + , + , - , +	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
- , + , + , + , - , +	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
- , + , + , + , - , +	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
- , + , + , + , - , +	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-

富山県内の腸管出血性大腸菌感染症発生状況(2019)

木全 恵子 内田 薫 金谷 潤一 加藤 智子
前西 絵美 綿引 正則 磯部 順子 宮寺 志保¹
頼成 明奈² 大石 和徳

Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Infectious Diseases Detected in Toyama Prefecture, 2019

Keiko KIMATA, Kaoru UCHIDA, Jun-ichi KANATANI, Tomoko KATO, Emi MAENISHI, Masanori WATAHIKI, Junko ISOBE, Shiho MIYADERA¹, Akina RAIJOU², and Kazunori OISHI

2019年1月から12月までに富山県において発生した腸管出血性大腸菌（EHEC）感染事例は25件、感染者は31名であった。これらの内訳は、EHEC O157感染事例が14件、17名、EHEC O26感染事例が7件、9名、EHEC Og8, Og91, Og182感染事例がそれぞれ1件、1名、2種類のO血清群のEHECが分離されたEHEC Og78・Og87感染事例が1件、2名であった（表1）。なお遺伝子型別により決定したO血清群をOgと表記した。以下にこれらの感染事例についてその概要、疫学的解析結果を報告する。

表1. 富山県腸管出血性大腸菌感染症発生状況 (2019)

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}	毒素遺伝子型
1	2019.1	1	散発	Og182:H25	stx1
2	2019.3	1	散発	O157:HNM	stx1stx2
3	2019.4	1	散発	O26:H11	stx1
4	2019.4	1	散発	O26:H11	stx1
5	2019.4	1	散発	O157:HNM	stx1stx2
6	2019.4	1	散発	O26:H11	stx1
7	2019.5	2	集団	O26:H11	stx1
8	2019.5	1	散発	O26:H11	stx2
9	2019.6	1	散発	O157:HNM	stx1stx2
10	2019.7	1	散発	O157:H7	stx1stx2
11	2019.7	4	集団	O157:H7	stx1stx2
12	2019.8	1	散発	O157:H7	stx2
13 ^{*2}	2019.8	2	集団	Og78:Hg19 Og87:Hg16	stx1stx2 stx2
14	2019.9	1	散発	O157:HNM	stx1stx2
15	2019.9	1	散発	O26:H11	stx1
16	2019.9	2	集団	O26:H11	stx1
17	2019.10	1	散発	O157:H7	stx1stx2
18	2019.10	1	散発	O157:H7	stx1stx2
19	2019.10	1	散発	O157:H7	stx1stx2
20	2019.10	1	散発	O157:H7	stx1stx2
21	2019.10	1	散発	O157:H7	stx2
22	2019.10	1	散発	Og91:HNM	stx1stx2
23	2019.10	1	散発	Og8:H19	stx2
24	2019.11	1	散発	O157:H7	stx1stx2
25	2019.11	1	散発	O157:H7	stx2
O157 14件(17名), O26 7件(9名), Og182 1件(1名), Og91 1件(1名), Og8 1件(1名), Og78・Og87 1件*(2名) 計25件(31名)					

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

^{*2} 同一集団内で2種類のO血清群のEHECが分離された

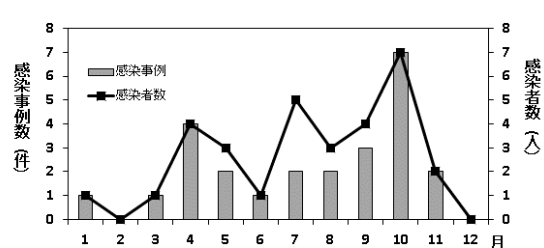


図1. 富山県における腸管出血性大腸菌感染症月別発生傾向 (2019)

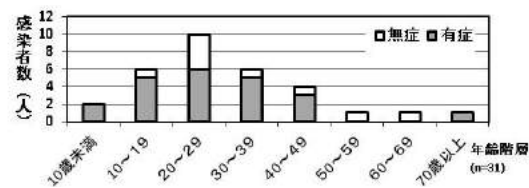


図2. 年齢別腸管出血性大腸菌感染症発生状況

2019年におけるEHEC感染症発生状況：2019年の富山県におけるEHEC感染症の事例数、感染者数はそれぞれ前年（19件、26名）比1.3、1.19で、事例数、感染者数ともに増加していた。発生形態は、集団感染（家族内感染を含む）4件、散発21件で、前年に比べ、集団感染は0.8倍、散発は1.5倍であった（表1）。事例13は2名の感染者からそれぞれ異なるO血清群のEHECが分離された。また、事例18および事例19は血清中のO157抗原凝集抗体の検出によって腸管出血性大腸菌感染症と診断された事例であった。

EHEC感染症の事例数及び感染者数の月別動向を図1に示した。2019年は、4月に4件、感染者4名、7月に2件、感染者5名、10月に7件、感染者7名であった。夏季にEHEC感染症が多発した前年と異なり、本年は春季、秋季にもEHEC

感染症が多発した。

感染者 31 名における有症者の割合は71.0% (22 名)であった。年代ごとの感染者数は20 歳 代が32.3%(10 名)と全体の3 割近くを占めていた (図 2)。また、男女比は男性 35.5%，女性 64.5%で、6 割が女性であった。

分離株の薬剤感受性：表 1 の各事例の代表株 25 株 (事例 13 の Og78 と Og87 を含む) について、薬剤感受性試験を行った。対象とした薬剤は12 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、テトラサイクリン、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) で、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。

供試菌株は全て、上記 12 薬剤に感受性であった。

分離株の病原因子：各事例の分離株について (表 1)、接着因子遺伝子 *eae*、ペロ毒素遺伝子 *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。

ペロ毒素遺伝子型は表 1 のとおりであり、*stx1* *stx2* 保有型が12 株、*stx2* 保有型が6 株、*stx1* 保有型が7 株であった。事例 13、事例 22、事例 23

の分離株は *eae* を保有していなかった。また、*astA* は事例 1、事例 9 の分離株から検出された。

O157、O26、O111 の MLVA による遺伝子型別：2018 年から当所において O157、O26、O111 の multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis (MLVA) による遺伝子型別を実施している。MLVA はゲノム上の 17 の標的遺伝子座にお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方法である [1]。この解析では、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」として標記している。また、互いに 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考えられる [2]。

表 2 に O157、O26、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、国立感染症研究所により付与された MLVA の遺伝子型 (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 3、事例 4、事例 6 よび事例 9 について標的遺伝子座 O157-37 または O157-9 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

表 2. MLVA における各標的遺伝子座反復配列数

O157

事例 No.	血清型	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	MLVA type	MLVA comp
2	O157	2	-2	1	4	-2	6	6	-2	-2	-2	9	18	4	12	6	6	3	19m0033	
5	O157	2	-2	1	4	-2	4	5	-2	-2	-2	9	11	3	5	6	6	3	18m0541	
9	O157	2	-2	1	4	-2	8	6	-2	-2	12	9	10/13	2	5	6	5	6	19m0089	19c022
10	O157	2	-2	1	4	-2	6	4	12	-2	9	12	8	4	7	5	6	6	18m0576	
11-1 ^{*1}	O157	2	-2	1	4	-2	7	4	10	-2	12	12	7	6	6	6	6	7	19m0230	19c029
11-2 ^{*1}	O157	2	-2	1	4	-2	7	4	10	-2	13	12	7	6	6	6	6	7	19m0231	19c029
12	O157	2	-2	1	6	-2	3	4	-2	-2	17	9	-2	3	5	7	-2	8	18m0468	
14	O157	2	-2	1	4	-2	10	6	-2	-2	16	9	13	3	5	6	4	5	19m0322	
17	O157	2	-2	1	3	-2	6	4	2	-2	9	12	11	6	8	6	6	6	17m0341	19c047
19	O157	2	-2	1	3	-2	6	4	2	-2	9	12	11	6	8	6	6	6	17m0341	19c047
20	O157	2	-2	1	4	-2	5	4	-2	-2	8	12	12	8	7	6	3	7	18m0448	
21	O157	2	-2	1	4	-2	12	6	-2	-2	4	9	-2	3	5	7	6	5	19m0489	
24	O157	2	-2	1	4	-2	5	4	-2	-2	9	12	12	8	7	6	3	6	16m0039	19c026
25	O157	2	-2	1	3	-2	10	5	-2	-2	4	9	-2	4	5	8	6	5	18m0585	

*1 事例11では同一感染事例で2種類のMLVA型が検出された。

O26

事例 No.	血清型	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	MLVA type	MLVA comp
3	O26	2	1	1	2	5	8	11	-2	14	-2	1	9	2	-2	1	-2	2/10	19m2015	
4	O26	2	1	1	2	5	8	11	-2	14	-2	1	9	2	-2	1	-2	2/10	19m2015	
6	O26	2	1	1	2	5	8	11	-2	14	-2	1	9	2	-2	1	-2	2/10	19m2015	
7-1 ^{*2}	O26	2	1	1	2	3	8	17	2	-2	-2	1	11	2	-2	1	-2	-2	17m2180	
7-2 ^{*2}	O26	2	1	1	2	3	8	22	-2	-2	-2	1	9	2	-2	1	-2	-2	13m2154	
8	O26	2	1	1	2	3	12	16	11	-2	-2	1	7	2	-2	1	-2	-2	19m2030	
15	O26	2	1	1	2	3	6	14	-2	-2	-2	1	10	2	-2	1	-2	-2	19m2116	
16	O26	2	1	1	2	3	15	14	-2	-2	-2	1	9	2	-2	1	-2	-2	19m2117	

*2 事例7では同一感染事例で2種類のMLVA型が検出された。

PCRの増幅により反復配列を検出できなかった場合は「-2」と表記した。/ で表記された数値はその遺伝子座で2種類の反復配列数が検出されたことを示す。

類の反復配列数が検出されたためであると考えられた。

事例11の集団感染事例（感染者4名）で分離されたEHEC O157のMLVA型は、感染者1名から、他の3名の感染者とは遺伝子座O157-3の反復配列数が1異なるMLVA型が検出された（表2, 事例No. 11-1, 11-2）。上述のMLVA型の判定基準により、これらは遺伝的関連性のあるMLVAコンプレックス19c029と判定された。

事例7では感染者2名から3つの遺伝子座の反復配列数が異なる2種類のMLVA型が検出された（表2, 事例No. 7-1, 7-2）。上述のMLVA型の判定基準によりこれら2つのMLVA型には遺伝的関連性はないと考えられた。従って、事例7では接触者調査により偶発的に由来の異なるEHEC O26の感染者を採知したと考えられた。

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17と事例19（表2, MLVA型17m0341, MLVAコンプレックス19c047）、事例3, 事例4および事例6（表2, MLVA型19m2015）であった。事例17と事例19は2019年10月、事例3, 事例4および事例5は2019年4月に発生した感染事例であった。以上からこの時期に県内で同一MLVA型のEHECが流行したと考えられたが、感染源は明らかになっていない。

全国におけるEHEC感染症発生状況との比較：2019年の全国におけるEHEC感染者数は3,744名で、昨年の0.97倍とほぼ横ばいであり、過去5年における年間感染者数は3番目に少なかった[3]。

国立感染症研究所では全国で発生したEHEC感染事例について菌株の収集・解析を行い、EHEC O157, O26, O111, O103, O121, O145, O165, O91についてMLVAによる分子疫学サーベイランスを行っている。このサーベイランスの結果、2019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遺伝子型またはMLVAコンプレックス33種類であった[4]。このうち、本県で検出された広域流行株の事例No., MLVA遺伝子型/またはMLVAコンプレックス, 検出された都道府県数は、事例5（MLVA遺伝子型18m0541, 1都1府5県）、事例24（MLVAコンプレックス19c026, 1都9県）であった。2019年に本県で検出されたMLVA遺伝子型は、O157が13タイプ、O26が6タイプであり、他のMLVA遺伝子型と関連性があると認められた

MLVAコンプレックスが、O157で4種類検出された（図3）。事例5, 事例24ともに他県の同じ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：2019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 Og76・Og87感染事例：8月に発生した事例13（表1）では感染者1名とその接触者からそれぞれEHEC (*stx1 stx2*), EHEC (*stx2*) が検出された。これらの分離株は市販の大腸菌O血清群抗血清に凝集せず、OUTと報告された。当所でPCRによるO血清群遺伝子型別[5]を実施したところ、これらの分離株の血清型はそれぞれOg76, Og87であることが判明した。本事例は前述の事例7と同様に、接触者調査により異なる由来もしくは異なる血清型のEHEC保菌者が偶発的に採知されたと考えられた。これらのEHECは*eae*を保有していないEHECであった。全国における本血清型のEHEC分離状況を病原微生物検出情報の腸管出血性大腸菌検出例の血清別統計から調査したところ、EHEC O76は2016年から2019年に各年2～3株の分離が報告されていたが、O87の分離は本事例が初めてであった。

O157抗原凝集抗体の検出によるEHEC O157感染診断とEHEC O157の分離：自家調整したO157抗原凝集抗体を用い、事例18, 事例19の患者血清のO157抗原凝集抗体の検出を行った。事例18・事例19ともにO157抗原凝集のみられた血清の最終希釈倍率は抗体価陽性域であり、EHEC O157抗体陽性と判定した。その後、事例19は患者便よりEHEC O157を分離した。この分離株はセフィキシム・亜テルル酸カリウム（CT）が添加された培地ではコロニーの生育がほとんどなく、CT感受性であった。EHEC O157はCTに対して耐性という特徴があるため、本菌の分離培地にはCTを添加した選択培地が用いられる。しかし、既報[6]に本菌には一部CTに感受性の株が報告されている。このようなCT感受性のEHECを分離するためにはCT非添加の分離培地の併用が必要である。

考察：2019年度は複数のEHEC感染者が検出された事例について、同一事例内でMLVA型が異なる事例が2件（事例7, 事例13）、血清型が異なるEHECがそれぞれ感染者から分離された事例

が1件(事例13)、探知された。これらはMLVAによる遺伝子型別、または遺伝子型別によるO血清群の決定により遺伝的関連性が明らかとなった事例であり、これらの遺伝子型別が迅速な分子疫学的解析に有用であることが示されたと考えられる。

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、健康課、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. Pei Y, Terajima J, Saito Y, et al. (2008) . Jpn J Infect Dis, 61, 58 – 64
2. 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
3. 国立感染症研究所, 厚生労働省健康局結核感染症課. (2020). 病原微生物検出情報, 41, 65 – 68
4. 泉谷秀昌, 李 謙一, 伊豫田淳, 他. (2020) . 病原微生物検出情報, 41, 71 – 72
5. Iguchi A, Iyoda S, Seto K, et al. (2017) . J Clin Microbiol, 53, 2427 – 2432
6. 北川恵美子, 浅田征彦, 山岸善信, 他. (2011). 石川保環研報, 48, 31 – 34

令和元年度富山県食品衛生検査の精度管理調査 －微生物学的検査－

金谷 潤一 木全 恵子 綿引 正則 磯部 順子
内田 薫 前西 絵美 柚木 悦子 大石 和徳

Quality Control of the Bacterial Testing of Foods for Good Laboratory Practice in Toyama Prefecture (2019)

Jun-ichi KANATANI, Keiko KIMATA, Masanori WATAHIKI, Junko ISOBE,
Kaoru UCHIDA, Emi MAENISHI, Etsuko YUNOKI, 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では、牛乳中の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）を実施した。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2年1月28日～令和2年2月3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、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アルベルティイ菌および大腸菌の培養液を表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 1.26×10^4 CFU/ml、最大値 1.37×10^4 CFU/ml、最小値 1.15×10^4 CFU/mlであった。SDは939.0となり、すべて平均値 $\pm 2SD$ ($1.08 \times 10^4 \sim 1.45 \times 10^4$) 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。各機関の実測値（1検体あたり2回）を見ると、SDは930.6となり、すべて平均値 $\pm 2SD$ ($1.08 \times 10^4 \sim 1.45 \times 10^4$) の範囲内であった。実測値のZスコアにおいても、絶対値はすべて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 1.41×10^3 CFU/ml、最大値 1.49×10^3 CFU/ml、最小値 1.33×10^3 CFU/mlであった。SDは71.0となり、すべて平均値 $\pm 2SD$ ($1.27 \times 10^3 \sim 1.55 \times 10^3$) の範囲内であった。Zスコアの絶対値も

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	アルベルティイ菌	約 6.4×10^4 CFU/g
模擬食品 D	大腸菌	約 9.2×10^4 CFU/g

すべて2以下で、ばらつき度合いは良好と判断された。各機関の実測値を見ると、SDは76.8となり、すべて平均値 $\pm 2SD$ ($1.26 \times 10^3 \sim 1.56 \times 10^3$) の範囲内であった。実測値のZスコアにおいても、すべて絶対値は2以下で、ばらつき度合いは良好と判断された。

平成27年度～令和元年度において、生菌数の測定値および実測値のZスコアを各機関ごとに示した(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. 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Dから大腸菌を検出できた(表3)。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Cからは、すべての機関で大腸菌は検出されず、検査精度に問題はなかった。

考察：令和元年度において、生菌数の測定値および実測値のZスコアをみると、いずれの機関も

表2. 牛乳中の生菌数

A. 牛乳A							
機関	結果	測定値	測定値 標準偏差	測定値 Zスコア	実測値	実測値 標準偏差	実測値 Zスコア
No. 1	1.37×10^4	13650	1016.7	1.08	13600	966.7	1.04
					13700	1066.7	1.15
No. 2	1.36×10^4	13600	966.7	1.03	13400	766.7	0.82
					13800	1166.7	1.25
No. 3	1.19×10^4	11900	-733.3	-0.78	12100	-533.3	-0.57
					11700	-933.3	-1.00
No. 4	1.31×10^4	13100	466.7	0.50	12800	166.7	0.18
					13400	766.7	0.82
No. 5	1.15×10^4	11450	-1183.3	-1.26	11600	-1033.3	-1.11
					11300	-1333.3	-1.43
No. 6	1.21×10^4	12100	-533.3	-0.57	12500	-133.3	-0.14
					11700	-933.3	-1.00
平均値 ($\bar{X}$)	1.26×10^4	12633.3			12633.3		
標準偏差 (SD)		939.0			930.6		
$\bar{X}+2SD$		14511.3			14494.6		
$\bar{X}-2SD$		10755.4			10772.1		

B. 牛乳B							
機関	結果	測定値	測定値 標準偏差	測定値 Zスコア	実測値	実測値 標準偏差	実測値 Zスコア
No. 1	1.49×10^3	1490	83.3	1.09	1540	129.2	1.68
					1440	29.2	0.38
No. 2	1.46×10^3	1460	53.3	0.70	1510	99.2	1.29
					1410	-0.8	-0.01
No. 3	1.33×10^3	1325	-81.7	-1.07	1350	-60.8	-0.79
					1300	-110.8	-1.44
No. 4	1.47×10^3	1470	63.3	0.83	1490	79.2	1.03
					1450	39.2	0.51
No. 5	1.35×10^3	1350	-86.7	-1.14	1370	-40.8	-0.53
					1320	-90.8	-1.18
No. 6	1.38×10^3	1375	-31.7	-0.42	1400	-10.8	-0.14
					1350	-60.8	-0.79
平均値 ($\bar{X}$)	1.41×10^3	1410.8			1410.8		
標準偏差 (SD)		71.0			76.8		
$\bar{X}+2SD$		1552.7			1564.4		
$\bar{X}-2SD$		1268.9			1257.2		

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	陰性	陽性
No. 2	陰性	陽性
No. 3	陰性	陽性
No. 4	陰性	陽性
No. 5	陰性	陽性
No. 6	陰性	陽性

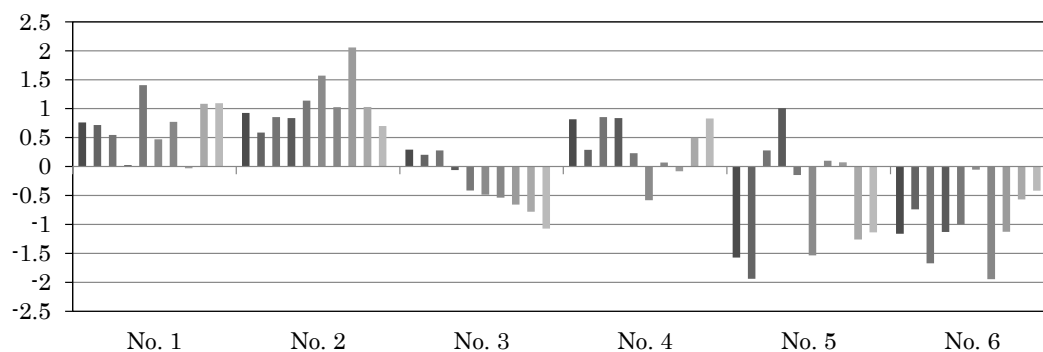


図 1. 測定値のZスコア (H27 ~ R01)

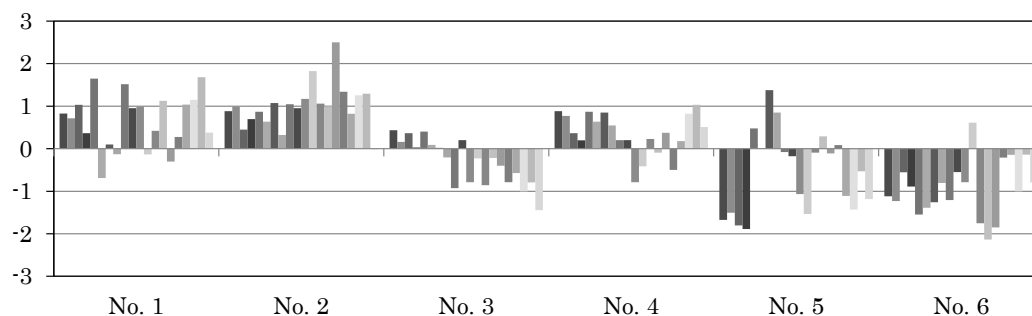


図 2. 実測値のZスコア (H27 ~ R01)

「良好」とされる範囲内であり問題はなかった。ただし、平成 27 年度～令和元年度においては、測定値をみると、1つの機関（計 1 回）で Z スコアが $2 < |Z| < 3$ の範囲であった。また、実測値では、2つの機関（計 2 回）で Z スコアが $2 < |Z| < 3$ 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、食品衛生管理の徹底や手洗いの励行などにより減少してはいるが、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 7 件（患者数 373 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、食品衛生法では、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を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 C 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 C から大腸菌は検出されなかった。また、全ての機関で食品 D 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

富山県におけるカルバペネム耐性腸内細菌科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(2019年)

内田 薫 綿引 正則 磯部 順子 木全 恵子
加藤 智子 金谷 潤一 前西 絵美 大石 和徳

Surveillance of Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* Infectious Diseases and Detection of β -Lactamase Genes from the Isolates in Toyama Prefecture (2019)

Kaoru UCHIDA, Masanori WATAHIKI, Junko ISOBE, Keiko KIMATA,
Tomoko KATO, Jun-ichi KANATANI, Emi MAENISHI, and Kazunori OISHI

目的：カルバペネム耐性腸内細菌科細菌 (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科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の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2019年の患者発生動向と、分離されたCREの 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

2019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。あわせて富山県および全国の過去5年間の届出数を集計した。

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たCRE10株について調査した。カルバペネマーゼ遺伝子 (IMP型, NDM型, VIM-2型, KPC型, OXA-48型) の検出はPCR法[3]により行った。カルバペネマーゼ以外の β -ラクタム耐性機序の確認のため、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) および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調べた[4]。

結果と考察：

1. CRE感染症届出数

富山県内の過去5年間のCRE届出数を表1に示した。2019年は10件の届出であった。

表1. CRE感染症の報告数 (2015年～2019年)

診断年	富山県	全国
2015年	21	1,671
2016年	14	1,573
2017年	10	1,660
2018年	19	2,289
2019年	10	2,333

菌種別では、*Klebsiella aerogenes* (旧名：*Enterobacter aerogenes*) が7件、*Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Morganella morganii* が各1件であった (表2)。

表2. 菌種別 CRE感染症届出状況 (2019年)

菌種	届出数(件)
<i>Klebsiella aerogenes</i> *	7
<i>Enterobacter cloacae</i>	1
<i>Escherichia coli</i>	1
<i>Morganella morganii</i>	1
計	10

*旧名：*Enterobacter aerogenes*

表 3. CRE 患者由来株からの β -ラクタマーゼ遺伝子検出状況

菌種(数)	カルバペネマーゼ遺伝子				
	IMP 型	VIM-2 型	NDM 型	KPC 型	OXA-48 型
<i>Klebsiella aerogenes</i> (7)	0	0	0	0	0
<i>Enterobacter cloacae</i> (1)	0	0	0	0	0
<i>Escherichia coli</i> (1)	0	0	0	0	0
<i>Morganella morganii</i> (1)	0	0	0	0	0

菌種(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)	0	0	0	0	0
<i>Enterobacter cloacae</i> (1)	0	0	0	0	0
<i>Escherichia coli</i> (1)	0	0	0	0	0
<i>Morganella morganii</i> (1)	0	0	0	0	0

菌種(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)	0	0	0	0	0	0
<i>Enterobacter cloacae</i> (1)	0	0	0	0	0	0
<i>Escherichia coli</i> (1)	0	0	1	0	0	0
<i>Morganella morganii</i> (1)	0	0	1	0	0	0

2. CRE の β -ラクタマーゼ遺伝子保有状況

県内の医療機関で分離されたCRE 感染症患者由来 10 株のカルバペネマーゼ遺伝子、ESBL 遺伝子、AmpC β -ラクタマーゼ遺伝子の保有状況を表 3 に示した。2019 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 遺伝子についても検出されなかったが、DHA 型 AmpC β -ラクタマーゼ遺伝子が 2 株から検出された。

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。*Enterobacter* 属菌などは、染色体性の AmpC β -ラクタマーゼの産生と膜の透過性低下よりカルバペネム耐性を示すことが知られている。

CRE の中でもカルバペネマーゼを産生する腸内細菌科細菌は、 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。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、腸内細菌科の他菌種に容易に伝播する可能性がある。そのため、CRE として届出対象となった菌株がカルバペネマーゼ遺伝子を保有するかどうかを鑑別することは医療関連感染対策上重要である [1]。

CRE 感染症においては、カルバペネマーゼ産生性の鑑別やカルバペネマーゼ遺伝子の型別の必要性が増しており、CRE の発生動向には今後も注視する必要がある。

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、健康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. 病原体検出マニュアル 薬剤耐性菌 感染研編 (平成 28 年 12 月改訂版)
4. 薬剤耐性菌研修会資料 (2018 年 9 月修正 Ver.5 国立感染症研究所薬剤耐性研究センター)

富山県における2019年の病原微生物検出情報

内田 薫 綿引 正則 磯部 順子 木全 恵子
加藤 智子 金谷 潤一 前西 絵美 大石 和徳

Pathogenic Bacteria Isolated in Toyama Prefecture, 2019

Kaoru UCHIDA, Masanori WATAHIKI, Junko ISOBE, Keiko KIMATA,
Tomoko KATO, Jun-ichi KANATANI, Emi MAENISHI, and Kazunori OISHI

当所では県内10か所の公立病院、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ている。2019年1月から12月までの検出情報を検出材料別および菌種別に集計した(図1)。公立病院で分離された黄色ブドウ球菌については、メチシリン耐性ブドウ球菌(MRSA)の割合を求めた。

菌種別では、大腸菌が4,612株と最も多く検出され、26.3%であった(図1)。次いで、黄色ブドウ球菌が2,799株(16.0%)、コアグラーゼ陰性ブドウ球菌1,536株(8.8%)、インフルエンザ菌が1,266株(7.2%)であった。

検出材料別分離割合は、尿からの分離が6,744株と最も多く、その割合は38.1%であった(表1)。続いて喀痰、気管吸引液および下気道の材料からの分離数が4,436株(25.5%)、血液からの分離数が2,249株(12.9%)であった(表1)。これらの材料からの分離報告数で全体の約77%を占めている。

以下に材料別の分離状況について報告する(表2)。

糞便：分離株総数は1,182株で、前年の105.2%であった。最も多かったのは大腸菌615株で、前年の554株から増加した。腸管出血性大腸菌

(EHEC)は、血清群O157が16株、O26が9株、OUTが5株、合計30株分離された。次に多かったのは黄色ブドウ球菌257株(そのうちMRSAは42.8%)であり、前年の97%であった。カンピロバクターは176株で前年の98.3%であった。また、EHEC以外の3類感染症では、*Shigella sonnei*が2株分離された。

穿刺液：分離株総数は356株で前年の106.9%であった。*Anaerobes*、大腸菌、コアグラーゼ陰性ブドウ球菌が多く分離された。

髄液：分離株総数は3株(前年は6株)であった。

血液：分離株総数は2,249株で前年の98.2%であった。大腸菌、コアグラーゼ陰性ブドウ球菌、黄色ブドウ球菌(MRSAは38.4%)が多く分離された。

咽頭および鼻咽喉：分離株総数は1,327株で前年の79.6%であった。インフルエンザ菌、肺炎球菌、A群溶レン菌が多く分離された。

喀痰、気管吸引液および下気道：分離株総数は4,436株で前年の108.6%であった。黄色ブドウ球菌(MRSAは45.4%)が最も多く、緑膿菌、肺炎桿菌、インフルエンザ菌なども多く分離された。

尿：分離株総数は6,744株で前年の104.6%であった。大腸菌が最も多く分離され、腸球菌、コアグ

表1. 2019年 病原細菌の材料別分離数及び割合

分離材料	分離数	分離率(%)
尿	6,744	38.1
喀痰、気管吸引液および下気道の材料	4,436	25.5
血液	2,249	12.9
咽頭および鼻咽喉からの材料	1,327	7.6
陰部尿道頭管擦過(分泌)物	1,222	7.0
糞便	1,182	6.8
穿刺液(胸水、腹水、関節液など)	356	2.0
髄液	3	0.0
合計	17,519	100.0

ラーゼ陰性ブドウ球菌，肺炎桿菌なども多く分離された。

陰部尿道頸管擦過（分泌）物：分離株総数は1,222 株で前年の95.2%であった。B 群溶レン菌，*Candida albicans* が多く分離された。

謝 辞

県内 10 か所の公立病院と 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。

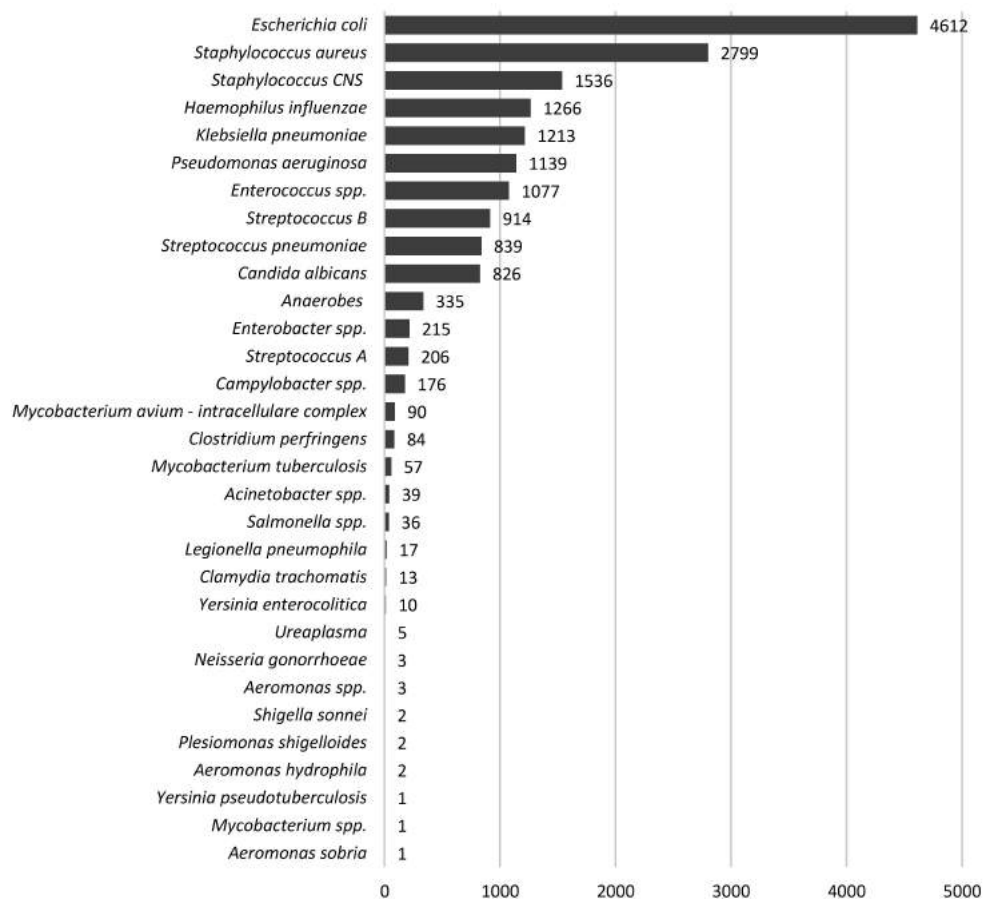


図 1. 菌種別報告数 (2019 年)

表 2. 月別・菌種の病原微生物検出状況 (2019)

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>Salmonella</i> Typhi													0
<i>Salmonella</i> Paratyphi A													0
<i>Salmonella</i> 04	1		1		3		2	1				1	9
<i>Salmonella</i> 07			1			1						2	4
<i>Salmonella</i> 08						1	1	1	2		2		7
<i>Salmonella</i> 09						2	1		5	1			9
<i>Salmonella</i> 09, 46 (D2)													0
<i>Salmonella</i> 03, 10 (E1, E2, E3)													0
<i>Salmonella</i> 01, 3, 19 (E4)													0
<i>Salmonella</i> 013 (G1, G2)													0
<i>Salmonella</i> 018 (K)													0
<i>Salmonella</i> その他													0
<i>Salmonella</i> 群不明													0
<i>Yersinia enterocolitica</i>	1			2		1		1		3	1	1	10
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	1												1
<i>Vibrio cholerae</i> 01 :El Tor, Ogawa, CT(+)													0
<i>Vibrio cholerae</i> 01 :El Tor, Ogawa, CT(-)													0
<i>Vibrio cholerae</i> 01 :El Tor, Inaba, CT(+)													0
<i>Vibrio cholerae</i> 01 :El Tor, Inaba, CT(-)													0
<i>Vibrio cholerae</i> 0139, CT(+)													0
<i>Vibrio cholerae</i> 0139, CT(-)													0
<i>Vibrio cholerae</i> 01, 139以外													0
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>													0
<i>Vibrio fluvialis</i>													0
<i>Vibrio mimicus</i>													0
<i>Aeromonas</i>						2	1	1	1		1		6
<i>Plesiomonas shigelloides</i>					1			1					2
<i>Campylobacter</i>	12	12	9	15	11	17	19	19	16	32	4	10	176
<i>Staphylococcus aureus</i>	21	20	21	21	25	23	28	20	18	16	19	25	257
<i>Clostridium perfringens</i>	1	10	5	1	9	5		7	10	2	13	21	84
<i>Clostridium botulinum</i> E													0
<i>Clostridium botulinum</i> E以外													0
<i>Bacillus cereus</i>													0
<i>Bacillus thuringiensis</i>													0
<i>Entamoeba histolytica</i>													0
<i>Escherichia coli</i> 組織侵入性			2		1						1		4
<i>Escherichia coli</i> 毒素原性	2	1	1	1		3	2		2		2	1	15
<i>Escherichia coli</i> 病原大腸菌	44	37	37	41	32	42	48	35	29	34	19	31	429
<i>Escherichia coli</i> EHEC/VTEC	1		1	4	3	1	5	1	6	4	4		30
<i>Escherichia coli</i> その他, 不明	18	11	13	16	10	9	9	6	14	11	13	7	137
<i>Shigella dysenteriae</i> 型 ()													0
<i>Shigella dysenteriae</i> 型 ()													0
<i>Shigella flexneri</i> 型 ()													0
<i>Shigella flexneri</i> 型 ()													0
<i>Shigella boydii</i> 型 ()													0
<i>Shigella boydii</i> 型 ()													0
<i>Shigella sonnei</i>									1		1		2
<i>Shigella</i> 群不明													0
<i>Entamoeba histolytica</i>													0
<i>Cryptosporidium</i> spp.													0
<i>Giardia lamblia</i>													0
合 計	102	91	91	101	95	107	116	93	104	103	80	99	1182

注：() 内は海外旅行者分再掲、○で囲んだ数字は同一フォーカスからの分離株を含む。

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>	4	7	12	13	8	8	2	3	6	5	5	5	78
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	1	3	1	5	2	2	3		1	2	3	24
<i>Haemophilus influenzae</i>													0
<i>Neisseria meningitidis</i>													0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	2		3	1	3		1	1		2		14
<i>Mycobacterium</i> spp.											1		1
<i>Staphylococcus aureus</i>	4	6	8	4	4	3	7	4	4	2	2	4	52
<i>Staphylococcus</i> ｺﾌｸﾞﾗｰﾍﾞ 陰性	3	9	7	3	7	4	2		4	6	5	6	56
<i>Streptococcus pneumoniae</i>									1			1	2
<i>Anaerobes</i>	9	10	15	15	17	11	8	8	8	8	12	8	129
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>													0
合 計	22	35	45	39	42	31	21	19	24	22	29	27	356

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>Escherichia coli</i>								1					1
<i>Haemophilus influenzae</i>	1												1
<i>Neisseria meningitidis</i>													0
<i>Listeria monocytogenes</i>													0
<i>Staphylococcus aureus</i>	1												1
<i>Streptococcus</i> , B													0
<i>Streptococcus pneumoniae</i>													0
合 計	2	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	3

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>	63	62	63	69	51	77	72	83	63	77	60	60	800
<i>Salmonella</i> Typhi													0
<i>Salmonella</i> Paratyphi A													0
<i>Salmonella</i> spp.						1	1	2	3				7
<i>Haemophilus influenzae</i>						1	1		1	1		1	5
<i>Neisseria meningitidis</i>													0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8	5	4	4	4	3	7	7	9	8	7	9	75
<i>Staphylococcus aureus</i>	33	21	19	32	22	24	28	27	30	15	32	24	307
<i>Staphylococcus</i> ｺﾌｸﾞﾗｰﾍﾞ 陰性	48	60	58	55	65	55	79	80	94	83	61	36	774
<i>Streptococcus</i> , B	4	5	2	4	2	3	4	3	3	3	2	5	40
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	4		4	4	7	1			2	5	7	6	40
<i>Anaerobes</i>	21	22	21	16	16	13	14	21	15	13	12	17	201
<i>Plasmodium</i> spp.													0
合 計	181	175	171	184	167	178	206	223	220	205	181	158	2249

5) 分離材料：咽頭および鼻咽喉からの材料

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>Bordetella pertussis</i>													0
<i>Haemophilus influenzae</i>	64	54	67	100	74	60	69	36	41	39	52	62	718
<i>Neisseria meningitidis</i>													0
<i>Streptococcus</i> , A	6	13	18	16	18	25	13	10	10	8	9	34	180
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	34	24	30	53	37	42	33	24	42	34	35	41	429
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>													0
合 計	104	91	115	169	129	127	115	70	93	81	96	137	1327

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>	9	3	1	8	8	2	8	5	4	2	4	3	57
<i>Mycobacterium avium</i> - intracellulare complex			9	1	6	13	12	12	8	13	8	8	90
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	46	28	51	42	45	39	43	50	67	64	72	57	604
<i>Haemophilus influenzae</i>	56	49	38	42	60	46	41	29	36	42	45	58	542
<i>Legionella pneumophila</i>		1	2	1	1	2		4	5		1		17
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	43	51	41	36	54	63	63	59	66	66	52	41	635
<i>Staphylococcus aureus</i>	173	178	148	161	155	152	145	141	121	160	147	173	1854
<i>Streptococcus</i> , A	2	3	2	2	2	2	3			4	4	2	26
<i>Streptococcus</i> , B	21	29	20	21	26	26	15	16	13	12	17	22	238
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	42	51	23	37	30	32	24	21	19	30	27	32	368
<i>Anaerobes</i>	3	1			1								5
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>													0
合 計	395	394	335	351	388	377	354	337	339	393	377	396	4436

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>	260	231	252	249	216	227	264	307	272	286	291	263	3118
<i>Enterobacter</i> spp.	24	14	22	13	13	11	8	20	24	19	25	22	215
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	50	45	45	44	38	33	46	61	46	62	59	56	585
<i>Acinetobacter</i> spp.	4		3	1	3	4	3	3	4	6	5	3	39
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	36	31	31	28	32	34	30	38	38	41	36	40	415
<i>Staphylococcus aureus</i>	29	24	15	21	25	35	29	34	24	32	29	31	328
<i>Staphylococcus</i> コリネバクテリウム陰性	35	46	70	49	37	49	72	70	84	54	65	75	706
<i>Enterococcus</i> spp.	104	66	105	83	82	94	97	83	103	74	103	83	1077
<i>Candida albicans</i>	23	22	30	17	19	15	22	18	24	23	22	26	261
合 計	565	479	573	505	465	502	571	634	619	597	635	599	6744

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>		1								2			3
<i>Streptococcus</i> B	42	44	57	54	60	50	57	44	62	58	53	55	636
<i>Chlamydia trachomatis</i>				1	2			2	4	1	2	1	13
<i>Ureaplasma</i>			1			3		1					5
<i>Candida albicans</i>	46	44	43	49	44	45	46	52	48	53	42	53	565
<i>Trichomonas vaginalis</i>													0
合 計	88	89	101	104	106	98	103	99	114	114	97	109	1222

Staphylococcus aureus

		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	9	15	10	12	5	10	11	10	5	10	8	110
	MSSA	16	11	6	11	13	18	18	9	8	11	9	17	147
	未検査													0
	件数	21	20	21	21	25	23	28	20	18	16	19	25	257
穿刺液	MRSA	1	1	3			2	3		1			1	12
	MSSA	3	5	5	4	4	1	4	4	3	2	2	3	40
	未検査													0
	件数	4	6	8	4	4	3	7	4	4	2	2	4	52
髄液	MRSA													0
	MSSA	1												1
	未検査													0
	件数	1												1
血液	MRSA	17	3	8	14	8	9	11	8	11	5	18	6	118
	MSSA	16	18	11	18	14	15	17	19	19	10	14	18	189
	未検査													0
	件数	33	21	19	32	22	24	28	27	30	15	32	24	307
呼吸器	MRSA	81	71	65	81	64	78	58	57	52	65	81	88	841
	MSSA	92	107	83	80	91	74	87	84	69	95	66	85	1013
	未検査													0
	件数	173	178	148	161	155	152	145	141	121	160	147	173	1854
尿	MRSA	13	12	6	10	11	19	15	21	13	10	15	16	161
	MSSA	16	12	9	11	14	16	14	13	11	22	14	15	167
	未検査													0
	件数	29	24	15	21	25	35	29	34	24	32	29	31	328
その他	MRSA													0
	MSSA													0
	未検査													0
	件数													0

富山県内で分離された溶血性レンサ球菌の血清型および薬剤感受性 (2019年)

内田 薫 前西 絵美 綿引 正則 磯部 順子
木全 恵子 加藤 智子 金谷 潤一 柴山 直美¹
川尻智佳子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, 2019

Kaoru UCHIDA, Emi MAENISHI, Masanori WATAHIKI, Junko ISOBE,
Keiko KIMATA, Tomoko KATO, Jun-ichi KANATANI, Naomi SHIBAYAMA¹,
Chikako KAWAJIRI¹, Taeko HORIE¹, Ami TAKESHIMA¹, Tadayoshi IKEBE²,
and Kazunori OISHI

目的：A 群溶血性レンサ球菌は、急性咽頭炎、扁桃炎、膿痂疹など様々な感染症の起因菌となる。感染症法では、本菌による咽頭炎は5類感染症の小児科定点把握疾患に位置付けられている。また、溶血性レンサ球菌は、症状の進行が早く致死率の高い重篤な劇症型の疾患を引き起こすことがある。劇症型溶血性レンサ球菌感染症は、5類感染症として全数報告が義務付けられている。これらの患者から分離される溶血性レンサ球菌はA群が最も多いが、近年では、B群やG群の割合も増えている[1]。劇症型となる要因や発生機序は未だ明らかではない。

近年、A 群溶血性レンサ球菌におけるマクロライド系やリンコマイシン系薬剤に対する耐性株が増加しているため、その動向には注意が必要である[2]。

当所では、衛生微生物技術協議会溶血レンサ球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 群溶血性レンサ球菌の血清型別や劇症型溶血性レンサ球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、2019年に富山県内で分離されたA 群溶血性レンサ球菌の血清型別結果および劇症型溶血性レンサ球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

2019年1～12月に富山県で報告されたA 群溶

血性レンサ球菌咽頭炎および劇症型溶血性レンサ球菌感染症の届出数を集計した。

(2) A 群溶血性レンサ球菌の血清型別

供試菌株は、2019年に富山県内の1医療機関で患者から分離されたA 群溶血性レンサ球菌20株である。これらの菌株についてT血清型別を実施した。型別は「T型別用免疫血清」(デンカ生研)を用いてスライド凝集反応にて行った。

(3) 劇症型溶血性レンサ球菌感染症由来株の病原体サーベイランス

2019年に富山県内で届出された劇症型溶血性レンサ球菌感染症は15件であった。このうち13株について菌株を収集し、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」(デンカ生研)を用いた。T血清型別は、(2) A 群溶血性レンサ球菌の血清型別と同様に行った。菌種同定は、「API 20 STREP」(シスメックス・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)、セフォタキシム (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。

1. 富山市民病院, 2. 国立感染症研究所細菌第一部

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2019年のA群溶血性レンサ球菌咽頭炎の患者報告数は3,338人（定点あたり115.1人）であり、2018年（2,258人、定点あたり77.86人）と比べ増加していた。

2019年の劇症型溶血性レンサ球菌感染症の報告数は15件であった。2018年の報告数は20件であり、昨年と比べ減少していた。しかし、2017年以前は年間10件前後の報告数であり、報告数は増加傾向であると考えられる。

(2) A群溶血性レンサ球菌のT血清型別

2019年に分離されたA群溶血性レンサ球菌のT血清型別結果を表1に示した。年間を通して分離されているが、2019年は3月、6月、10月、12月に多く分離され、それぞれ3株であった。分離された溶血性レンサ球菌のT型は、TB3264型（9株、45.0%）、T25型（2株、10.0%）、T1型、T3型、T4型（各1株、5.0%）、型別不能（5株、25.0%）であった。例年、全国ではT1型の分離割合が高いが、県内ではTB3264型の割合が高くなっている。なお、1株は発育しなかったためT型別を行わなかった。

(3) 劇症型溶血性レンサ球菌感染症由来株の病原体サーベイランス

収集した劇症型溶血性レンサ球菌感染症由来株13株について、結果を表2に示した。群別試験の結果は、A群5株、B群2株、G群6株であった。A群5株の血清型は、T1型2株、T4型、T12型各1株であった。1株（No.13）は菌種が*S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis*であったため、T型別は行われていない。emm遺伝子型はA群でemm1.0型、G群でstG6792.3型がそれぞれ2株ずつであった他、様々な遺伝子型であった。

薬剤感受性については、2株でMINO耐性、1株でEM,CLDM耐性であった。また、MINO低感受性が2株であった。これら以外の8株は13薬剤に感受性であった。

劇症型溶血性レンサ球菌感染症の報告数は全国的にも増加傾向にある。原因菌としてA群溶血性レンサ球菌が多いが、G群溶血性レンサ球菌も増加している。しかし、その原因は明らかになっていない。今後も動向を注視する必要があると考えられる。

表1. 県内医療機関で分離されたA群溶血性レンサ球菌のT血清型別結果（2019年・月別）

T血清型	分離菌株数												合計	
	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	菌株数	%
T-1		1											1	5.0
T-3												1	1	5.0
T-4						1							1	5.0
T-25	1									1			2	10.0
T-B3264			2	1	2	1		1		1		1	9	45.0
UT*			1			1			2	1			5	25.0
NT**												1	1	5.0
合計	1	1	3	1	2	3	0	1	2	3	0	3	20	100.0

*: 型別不能

**: 型別未実施

表2. 富山県における劇症型溶血性レンサ球菌感染症症例（2019年）

No.	分離月	年代	性別	群別	菌種	T血清型	emm遺伝子型	薬剤耐性
1	2	80	男	A	<i>S. pyogenes</i>	T1	emm1.0	
2	2	40	男	B	<i>S. agalactiae</i>	V		MINO
3	3	40	男	A	<i>S. pyogenes</i>	T4	emm4.0	MINO(低感受性)
4	4	90	女	G	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>		stG6792.11	
5	6	50	男	A	<i>S. pyogenes</i>	T1	emm1.0	
6	6	80	男	G	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>		stG6.1	
7	7	70	男	A	<i>S. pyogenes</i>	T12	emm12.0	
8	7	70	女	B	<i>S. agalactiae</i>	I a		MINO
9	7	30	男	G	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>		stG245.0	EM,CLDM MINO(低感受性)
10	10	60	女	G	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>		stG6792.3	
11	10	90	女	G	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>		stG6792.3	
12	11	80	男	G	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>		stG6792.11	
13	12	10歳未満	男	A	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>		stG643.0	

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. 病原微生物検出情報, (2015). 36, 7-8
2. 奥野ルミ, 久保田寛顕, 内谷友美, 他. 病原微生物検出情報, (2015). 36, 6

HPLCおよびLC-MS/MSによるじゃがいも中の α -ソラニン, α -チャコニン測定法の検討

堀井 裕子

Determination of α -Solanin and α -Chaconine in Potatoes by HPLC and LC-MS/MS

Yuko HORII

目的: α -ソラニン, α -チャコニンはジャガイモに含まれるグリコアルカロイドであり, 芽, 皮部分に多く含まれている。これらアルカロイドは緑化したものや未熟なジャガイモに特に含有量が多く, このようなジャガイモの摂取で嘔吐, 下痢, 腹痛などの食中毒症状を示す。厚生労働省の食中毒発生事例によるとジャガイモによる食中毒は全国では毎年, 主に学校で発生し, 2017 ~ 2019年の3年間に4件の事例が報告されている。

このようなことから, 当県においても健康危機発生時における検査体制の確保が重要と考え, ジャガイモ食中毒の原因物質である α -ソラニン, α -チャコニン測定法の検討を行なったのでその結果を報告する。

方法:

1. 試料: 試料として生のじゃがいも (以下, 生いも), 茹でたじゃがいも (茹でいも), 市販のフライドポテト (フライドポテト) の3形状のジャガイモについて検討した。

2. 標準品および試薬等: α -ソラニン標準品はSigma社製を, α -チャコニン標準品はEXTRASYNTHESIS社製を用いた。各標準原液は標準品 5 mg を正確に量り採り, メタノールで正確に 10 mL とした。(500 μ g/mL)

0.2 mol/L リン酸緩衝液 (pH7.0): リン酸二水素ナトリウム二水和物 9.6 g およびリン酸水素二ナトリウム十二水和物 14.0 g を水に溶解し 500 mL とし, pH7.0 に調整した。

固相抽出カラム: Waters 社製 Sep-Pak Plus C18 (360 mg) は, あらかじめメタノールおよび水各 10 mL でコンディショニングして使用した。Sep-Pak Plus NH2 はアセトニトリル 10 mL でコンディショニングをして用いた。

メタノールおよびアセトニトリルはHPLC 用ま

たは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。

3. 装置及び測定条件

(1) 装置

HPLC: 島津高速液体クロマトグラフシステム (ポンプ: LC-10ADvp, フォトダイオードアレイ検出器 (PDA): SPD-M10Avp, インジェクター: SIL-10ADvp, カラムオープン: CTO-6A, デガッサー: DGU-2A, システムコントローラー: SCL-10Avp, データ処理: CLASS-VP)

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

(2) HPLC 条件

カラム: Inertsil ODS-2 (4.6 mm i.d. $\times$ 250 mm, 5 μ m), 移動相: アセトニトリル - 0.2 mol/L リン酸緩衝液 (pH7.0) - 水 (130 : 7 : 63), カラム温度 40 $^{\circ}$ C, 流速 1.0 mL/min, 検出器: PDA (測定波長 190 ~ 370 nm, 定量 205 nm), 注入量 50 μ L

(3) LC-MS/MS 条件

・LC 条件

カラム: AQUITY UPLC HSS T3 (2.1 mm i.d. $\times$ 100 mm, 1.8 μ m), カラム温度: 40 $^{\circ}$ C, 流速: 0.2 mL/min, 注入量: 10 μ L, 移動相 A: 0.02% ギ酸水溶液, 移動相 B: アセトニトリル, グラジエント条件: A 液 80% (0 分) $\rightarrow$ 70% (7 分) $\rightarrow$ 5% (8 分, 2 分間保持) $\rightarrow$ 80% (10 分, 5 分間保持)

・MS/MS 条件

イオン化法: ESI (+), 測定モード: MRM, 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: 500 $^{\circ}$ C, コーンガス流量: 50 L/hr, ソース温度: 150 $^{\circ}$ C, 測定イオン: α -ソラニン プリカーサーイオン m/z 868.5 (コーン電圧 92 V), プロダクトイオン 定量 m/z

98.1 (コリジョンエネルギー 86 eV), 参照 m/z 398.4 (72 eV), α -チャコニン プリカーサーイオン m/z 852.5 (コーン電圧 20 V), プロダクトイオン 定量 m/z 98.1 (コリジョンエネルギー 88 eV), 参照 m/z 706.6 (70 eV).

4. 試験溶液調製：試験溶液は衛生試験法注解[1]を参考に、一部変更して以下の通り実施した(図1)。生いもは粉碎機で粉碎し、茹でいも、フライドポテトは包丁で細切し、その5 gを採取した。採取した試料にメタノール 30 mLを加えてホモジナイズし、吸引ろ過後、メタノールを加えて全量を50 mLとした。このメタノール抽出液 5 mLをとり、水 12 mLを加えて混合し、固相抽出カラム：Sep-Pak Plus C18に負荷した。続いて30%メタノール 5 mLで洗浄し、メタノール 15 mLで溶出した。得られたメタノール溶出液を減圧下で溶媒を留去後、残留物をメタノール 1 mLに溶かしHPLC用試験溶液(図中試験溶液①)とした。フライドポテトについては引き続き以下の操作を行った。先の試験溶液① 1 mLにアセトニトリル 19 mLを加えて混合し、固相抽出カラム：Sep-Pak Plus NH2に負荷した。続いてアセトニトリル 5 mLで洗浄し、メタノール 10 mLで溶出した。得られたメタノール溶出液を減圧下で溶媒を留去し、残留物をメタノール 1 mLに溶かしてHPLC用試験溶液(図中試験溶液②)とした。LC-MS/MS測定用試験溶液はHPLC用試験溶液をメタノールでさらに2000倍に希釈したものとした。

5. 検量線の作成： α -ソラニン、 α -チャコニン標準原液を混合して、さらにメタノールで希釈し、HPLC測定用には1, 4, 10, 20, 50 mg/L, LC-MS/MS測定用には0.0001, 0.0003, 0.001, 0.003, 0.01, 0.03, 0.1 mg/Lの検量線用標準溶液を調製した。

結果及び考察：

1. 測定条件の検討：HPLC法についてははじめに衛生試験法[1]の測定条件を参考に、分析カラムに順相カラムのInertSustain NH2 (4.6 mm i.d. × 250 mm, 5 μ m)を、移動相にアセトニトリル-リン酸緩衝液(pH3)を用いて条件の検討を行った。その結果、標準液では α -ソラニンと α -チャコニンは分離可能で、良好なピークが得られた。しかし、生イモから抽出した試験溶液を測定したところ、 α -ソラニンと α -チャコニンのピークにはともに試料由来成分による妨害が見ら

試料 5g
 |メタノール 30mL
 |ホモジナイズ 2分
 |吸引ろ過
 ろ液
 |メタノールで50mL定容
 抽出液 5mL
 |水12mLを加え希釈
 Sep Pak Plus C18 cartridge
 |30%メタノール洗浄 5mL
 |メタノール溶出 15mL
 溶出液
 |溶媒留去
 残留物
 |メタノール 1mL
 試験溶液①
 |アセトニトリル 19mL
 混合液
 |
 Sep Pak Plus NH2 cartridge
 |アセトニトリル洗浄 5mL
 |メタノール溶出 10mL
 溶出液
 |溶媒留去
 残留物
 |メタノール 1mL
 試験溶液②

図1. 試験溶液調整法

れた。さらに、測定を繰り返すに従って目的成分および妨害成分の保持時間が徐々に移動して分離状況が変わり、安定した測定が困難であった。そこで、逆相カラムによる測定例[2]を参考に、カラムをInertsil ODS-2、移動相はアセトニトリル-リン酸緩衝液(pH7.0)に変更して条件の検討を行ったところ、 α -ソラニンと α -チャコニンは良好なピーク形状を示し、保持時間の変動や妨害成分の影響もなく安定した分析が可能であった。このためHPLC測定には逆相カラムを用いた条件を採用した。

LC/MS/MS法については西川ら[3]の報告を参考に、逆相カラムを使用し、0.02%ギ酸とアセトニトリルによるグラジエント条件を作成した。 α -ソラニンと α -チャコニンの質量分析条件についてはインフュージョンにより最適な測定イオンを検討し、プリカーサーイオンにはいずれもプロ

トン化分子である m/z 868.5 (α -ソラニン), m/z 852.5 (α -チャコニン) を, 定量用プロダクトイオンには m/z 98.1 (α -ソラニン, α -チャコニン) を選定した.

2. 試験溶液調製の検討: 試料から α -ソラニン, α -チャコニンを抽出する溶媒 [1, 4] および抽出方法 [1, 4, 5] については数種類の報告がある. そこで試料に最適な抽出条件を設定するために, 抽出溶媒 2 種類 (メタノールと 5% 酢酸) および抽出方法 3 種類 (ホモジナイズ, 超音波, 振とう) について比較検討を行った.

抽出の操作性を確認するために, 生いも, 茹でいも, フライドポテト 5 g を 50 mL ポリプロピレン製遠沈管に各 6 本採取した. 3 本にメタノール, 残り 3 本に 5% 酢酸をそれぞれ 30 mL 加え, 各溶媒についてホモジナイズ 2 分, 超音波 (Branson 出力 125 W) 15 分, 振とう 15 分の 3 種類の抽出方法を実施した. その結果, 生いも, フライドポテトはいずれの抽出溶媒および抽出方法においても試料と溶媒は十分に混和した. 一方, 茹でいもは超音波や振とう抽出では, メタノール, 5% 酢酸の両溶媒で試料の分散が不十分で試料が塊となって残った. ホモジナイズ抽出ではどちらの抽出溶媒でも混和した. これらのことから, 抽出方法はホモジナイズを採用した.

次に, メタノールと 5% 酢酸による α -ソラニン, α -チャコニン抽出量の比較を行うために, これらを高濃度に含有すると報告されている [6] ジャガイモの品種, メーカーを試料として測定を行った. 生メーカーを粉砕機で粉砕したものを容器に採り, 抽出溶媒としてメタノールまたは 5% 酢酸を加えたもの (各 $n=3$ で実施) をホモジナイズ抽出し, 以下, 試験溶液調製法に従った. 2 種類の溶媒で試験溶液を調製したときに, メタノールでは操作に問題はなかったが, 5% 酢酸では抽出液を吸引ろ過する工程でろ紙が目詰まりし, ろ液の回収が不良であった. 調製した試験溶液を測定したところ (表 1), α -ソラニン, α -チャコニ

ン濃度は 2 種の抽出溶媒で有意な差はないものの, メタノールに比べて 5% 酢酸抽出のほうが低い値を示したため, 抽出溶媒はメタノールを選択した.

抽出溶液の精製・濃縮操作については衛生試験法を参考に実施した. 衛生試験法では C18 固相抽出カラムによる精製を行っており, 負荷する試料溶液および洗浄溶媒のメタノール濃度は 40% としている. しかし, 新藤ら [7] はメタノール濃度 40% では固相から目的成分の一部が溶出し, 30% では良好な回収が得られたと報告している. そこで, 試料溶液と洗浄溶媒はともにメタノール濃度が 30% になるように調製し精製を行った. また, 試料について, ジャがいもなどの一般食品は C18 固相抽出カラムのみによる精製試験溶液 (図 1 の試験溶液①) で HPLC 測定することとなっているが, フライドポテトなどの油脂性試料についてはさらに NH₂ 固相抽出カラムによる精製を行うことになっている (図 1 の試験溶液②). 今回, フライドポテトについて HPLC 法で測定を行ったところ, 試験溶液①では α -ソラニン付近に妨害ピークがみられたが, 試験溶液②ではみられず, 油脂性食品については NH₂ 固相抽出カラムによる精製が必要であることが確認された.

この方法による定量限界は試料当たり, HPLC 法では 2 mg/kg, LC-MS/MS 法では 0.0002 mg/kg であった.

日本中毒情報センターによると, ジャがいもによる食中毒は, ソラニンやチャコニンなどのグリコアルカロイド全体の量として成人では 200 ~ 400 mg, 小児では 15.6 ~ 40 mg で発症するとされている. 小児において, 食中毒が発生する可能性のある 15 mg のグリコアルカロイドを摂取するには, それらの濃度が 150 mg/kg のジャがいもを 100 g 食べることになる. この濃度は HPLC 法の定量下限値に比べて十分大きく, 汎用的な装置で測定を行うことができるが, 一方で, HPLC 法は妨害ピークの影響を受けやすいという欠点がある. 今回のフライドポテトの測定においても HPLC 法では固相抽出カラムを 2 種類使用して精製する必要があった. しかし, LC-MS/MS 法で固相抽出カラム 1 種類のみで精製した試験溶液①の測定を試みたところ, 妨害ピークなく測定することができた. このように, 妨害成分が多いと考えられる加工度の高い食品を試料として測定する場合には, 選択性の高い LC-MS/MS 法の使用が有用であると考えられる.

表 1. 2 種類の抽出溶媒における α -ソラニン, α -チャコニン抽出量

抽出溶媒	α -ソラニン(mg/kg)		α -チャコニン(mg/kg)	
	平均値	標準偏差	平均値	標準偏差
メタノール	293	21.1	341	22.2
5% 酢酸	274	14.9	308	16.0
n=3				

表 2. 各試料における添加回収試験結果

	HPLC法						LC/MS/MS法					
	生いも		茹でいも		フライドポテト		生いも		茹でいも		フライドポテト	
	真度	併行精度	真度	併行精度	真度	併行精度	真度	併行精度	真度	併行精度	真度	併行精度
	回収率%	RSD%	回収率%	RSD%	回収率%	RSD%	回収率%	RSD%	回収率%	RSD%	回収率%	RSD%
α -ソラニン	76.8	5.6	89.6	5.0	84.8	9.1	70.1	3.9	67.3	7.5	69.3	8.8
α -チャコニン	84.9	4.4	85.3	4.7	83.0	8.5	73.3	2.3	70.8	7.0	72.7	7.0

各n=3で実施

3. 添加回収試験：皮を含む表面を厚さ5～7 mm程度取り除いた生いも，同様に表面を取り除いた茹でいも，フライドポテト（各 n=3 で実施）に α -ソラニン， α -チャコニンの各標準原液を50 mg/kg になるように添加し，試験溶液調製操作に従って回収試験を行った（表2）．その結果，HPLC 法では α -ソラニンの回収率76.8～89.6 %（併行精度5.0～9.1 %）， α -チャコニンは回収率83.0～85.3 %（4.4～8.5 %），LC-MS/MS 法では α -ソラニン回収率67.3～70.1 %（併行精度3.9～8.8 %）， α -チャコニン回収率70.8～73.3 %（2.3～7.0 %）であり，ジャガイモ食中毒発生時の検査方法として使用可能であると考えられる．

文 献

1. 衛生試験法・注解 2015（日本薬学会編），277～279，金原出版
2. 折口菜都希，柚田有加，安藤尚子，他．（2014）．奈良県保健環境センター年報，49，59～60
3. 西川 徹，川口喜之，村上正文（2006）．長崎県衛生公害研究所報，52，11～13
4. 浅野正博，後藤直子，一色賢司（1996）．日本食品化学工学会誌，43(5)，593～597
5. 澤崎加奈恵，山岸 浩，青木保憲（2014）．福井県衛生環境研究センター年報，13，102～103．
6. 下井俊子，牛山博文，観 公子，他．（2007）．食品衛生学雑誌，48(3)，77～82
7. 新藤哲也，牛山博文，観 公子，他．（2004）．食品衛生学雑誌，45(5)，277～282

誘導体化HPLC法による生めん類中の品質保持剤 (プロピレングリコール)分析法の検討

中山恵理子

Determination of Quality Retaining Agent (Propylene Glycol) in Raw Noodles by HPLC

Eriko NAKAYAMA

目的: プロピレングリコール (PG) は品質保持剤や製造用剤として様々な用途で使用され、摂取量が比較的多い食品添加物である。当所ではPGの分析法として、パックドカラム GC 分析法を用いてきたが、装置の老朽化により分析法の見直しが必要となった。そこで、PDA 検出器付き HPLC による分析法の検討を行った。

紫外吸収の乏しいPGはこれまでもUVラベル化剤を用いて誘導体化してHPLC分析する方法が報告されている。村上ら[1]はプロピレングリコール脂肪酸エステルに3,5-ジニトロ塩化ベンゾイルを用いてUVラベル化してHPLC分析を行った。一方、吉田ら[2]はプロピレングリコールに塩化ベンゾイルを用いて誘導体化して高感度GC/MS分析に供している。今回PGをUVラベル化剤として塩化ベンゾイルを用い、PDA検出器付きHPLCで測定する手法について検討したところ、比較的簡便な操作で誘導体化し、感度良く検出測定できる処理法を確立することができたので、その概要を報告する。

材料及び方法：

1. 試料：市販の生中華めん、ぎょうざの皮について検討した。

2. 標準品及び試薬等

標準品：PG（特級、和光純薬工業(株)製）

標準溶液：PGを2 g 精秤し、精製水に溶解して20 mLとしたものを標準原液とした（濃度：10%, w/v）。これを適宜精製水で希釈し、標準溶液とした。

その他の試薬：塩化ベンゾイル（純度98%以上、東京化成工業(株)製）、水酸化ナトリウム（特級）、アセトニトリル（HPLC用）、n-ヘキサン（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。

固相抽出カラム：GLサイエンス社製 InertSep C18 (1 g) は予めアセトニトリル及びアセトニトリル/水混合溶媒 (1:1) 各 10 mL で順次コンディショニングした。GLサイエンス社製 InertSep SCX (500 mg) 及び Waters 社製 Oasis MAX (500 mg) は連結して予めアセトニトリル 10 mL でコンディショニングして用いた。

3. 装置及び測定条件

HPLC 装置：(株)日立製作所製ポンプ：L-2100 型、オートサンプラー：L-2200 型、ダイオードアレイ検出器：L-2450 型、東ソー(株)製：カラムオープン CO-8011 型を組み合わせ使用した。

分析カラム及び測定条件を表1に示す。

表1. 測定条件

カラム：	Symmetry C18 4.6 mmφ × 150 mm 粒径 5 μm
移動相：	水/アセトニトリル グラジエント (A:水, B: アセトニトリル) 流速=1.0 mL/min 0分 50% B → 17.5分 50% B → 20分 70% B → 24分 50% B → 30分 50% B
カラム温度：	40 °C
検出器：	PDA 検出波長：230 nm
試料注入量：	20 μL

4. 測定用試料液の調製 (図1)

1) 試料からの抽出及び精製

細切した生めん類試料 5 g に水 2 mL とアセトニトリル約 30 mL を加えて1分間ホモジナイズした後、アセトニトリルを加えて50 mL とし、振とうした。これを3,000 rpm で10分間遠心分離し、上澄み液を採取して試料抽出液 (A) とした。

この抽出液(A) 10 mL に水 10 mL を加えて混合し、InertSep C18 固相に通液した。通過液の最初の3 mL を廃棄し、その後の全量を採取した

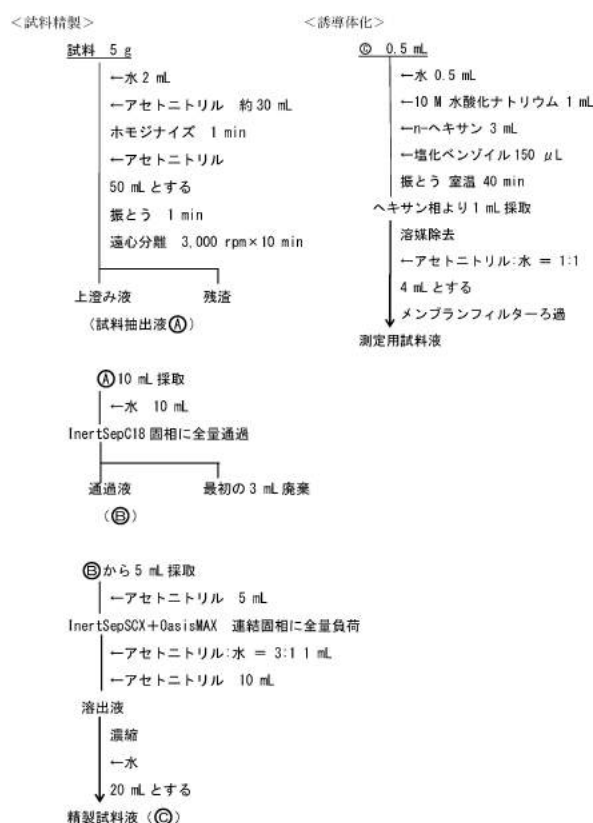


図 1. 前処理法の概要

(B). この通過液⑤ 5 mL に対してアセトニトリル 5 mL を加えて混合し、InertSep SCX と Oasis MAX の連結固相に全量負荷した。続いてアセトニトリル/水 (3:1, v/v) 混合溶媒 1 mL およびアセトニトリル 10 mL を順次連結固相に通し、すべての非吸着画分を回収した。回収された溶液を減圧下で留去した後、水で 20 mL として精製試験料液 (C) とした。

2) 誘導体化

精製試験料液⑥ 0.5 mL をねじ口キャップ付き試験管に採取し、精製水 0.5 mL 及び 10M 水酸化ナトリウム 1 mL を加えて混合し、n-ヘキサン 3 mL を加えた。そこへ塩化ベンゾイル (原液) 150 μL を加え、室温で 40 分間激しく振とうした。10 分以上静置した後、ヘキサン層から 1 mL をホールピペットで採取し、窒素気流下 40℃ で溶媒を除去し、アセトニトリル/水混合溶媒 (1:1, v/v) に溶解して 4 mL とした。これを孔径 0.45 μm のメンブランフィルターでろ過して測定用試験料液とした。

結果と考察：

1. 試料からの抽出溶媒

PG は食品衛生検査指針 [5] や衛生試験法 [6] で

は食品からの抽出にメタノールが用いられている。しかし、メタノールの場合、均質化処理後に遠心分離を行っても液相の濁りが残った。

抽出溶媒として極性の高いアセトニトリルを用いたところ、食品成分由来のタンパク質等がメタノールを用いた場合に比べ沈殿しやすく分離が容易であったため、アセトニトリルを用いた。

2. 固相精製

生中華めに試料中 0.1% 相当量の PG を添加し、試料抽出液の誘導体化を行ったところ、回収率は 50% を下回った。

今回行った誘導体化は PG 分子内の二つの水酸基をベンゾイル化する反応を用いている (図 2)。

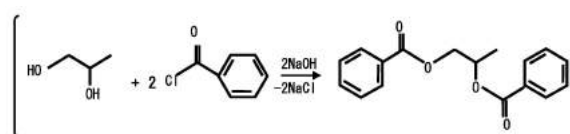


図 2. 反応機構の推定 (Schotten-Baumann 反応)

塩化ベンゾイルは非常に反応性が高く、試料中に含まれるアミノ基や水酸基を有するアミノ酸や脂肪酸等とも反応して消費されてしまい、誘導体化 PG の生成量を下げると考えられた。そこでマトリックス成分の除去を目的として固相精製について検討した。

PG 試料抽出液④に等量の水を加え、InertSep C18 (1 g) 逆相固相で精製を行い誘導体化後の回収率を確認したところ 58% だった。

イオン交換固相による精製を行っている小林ら [3] を参考にして、もう一段階の精製法を検討した。種々のイオン交換固相を用いて検討したところ、InertSep SCX と Oasis MAX の連結固相を用いた場合に回収率は 92% と最も良い結果であったため、これを使用することとした。

3. 誘導体化

誘導体化は厚生労働省の化学物質ばく露量評価検討会資料 [4] を参考に検討した。この報告書では、試料水溶液と誘導体化試薬を混合したものを室温で 60 分間振とうして誘導体化反応を行い、その後、反応生成物をヘキサンで抽出していた。今回は、反応時に試料と試薬にヘキサンも加えて二相系とし、反応と同時に抽出させたところ、PG の誘導体化生成物のピーク面積値の増加が認められた。これはベンゾイル化 PG が低極性の有機溶媒との親和性が高く、その生成と同時にヘキサンへ溶解するため化学平衡が生成方向に偏ったこと

によると考えられた。そこで、反応時にヘキサンを加えた二相系溶媒で振とうする方法を用いた。

誘導体化の際の反応温度について室温と50℃で比較した。その結果、後者の場合、誘導体化PGのピーク面積の変化はみられなかったが副生成物と思われる大きなピークが出現し、誘導体化PGに重なりが見られたため、室温で反応させることとした。

反応時間について検討したところ、PG標準液の場合には、室温では20分でピーク面積が一定となった。精製不十分の試料溶液では、生成物量は反応時間40分ではほぼ最大となった。そこで、反応時間は40分とした。

マトリックス成分共存下での誘導体化試薬の添加量について検討を行った。塩化ベンゾイルを100～200 μ L 添加したところ、添加量の増加に伴いPGの回収率は高くなったが、150 μ Lを超えると塩化ベンゾイルの加水分解生成物等が大量に析出したことから添加量は150 μ Lとした。

誘導体化後の測定用試料液についてHPLC－PDAによる測定を実施した。複数の副生成物が確認できるが、それらのピークと誘導体化PGはクロマトグラム上で分離可能であった(図4)。測定の定量下限値は試料中PG濃度0.1%で0.1%～3%の範囲で検量線の直線性 ($r^2 > 0.999$) が認められた。

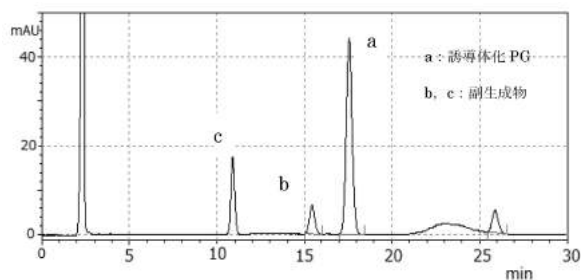


図 3. 誘導体化後のクロマトグラム

4. 試験法の妥当性確認

確立した試験法について、食品中に残存する農薬等の試験法の妥当性評価ガイドライン[7]を参考にし、PGを添加した生中華めん(試料中2%相当)、ぎょうざの皮(試料中0.5%相当)について一日一回2併行の試験を5日間実施し、真度及び精度を求めた(表2)。

評価目標は真度：回収率70～120%，併行精度

表 2. 真度(回収率)及び精度

	真度(回収率) [%]	併行精度 [RSD%]	室内精度 [RSD%]
生中華めん	93.0	3.2	3.7
ぎょうざの皮	93.9	4.6	4.9

[RSD%]: 10%未満, 室内精度[RSD%]: 15%未満であり, 2食品とも評価目標値を満たしていた。また, 基準値の1/10を超える妨害ピークは見られないことから, 選択性についても問題なく, 実試料への適用が可能であった。

まとめ: 生めん中のPG測定において, GC法に代わる手法として誘導体化-HPLC測定法について検討を行った。確立した試験法について妥当性を確認したところ, 真度, 精度とも妥当性評価ガイドラインの目標値を満たしていた。

本試験法はPGのガスクロマトグラフ試験法と比較し, 固相精製など処理に時間を要するものの, 測定感度は良好であり, HPLCを利用した測定法として活用できると思われる。

文 献

1. 村上千秋, 丸山武紀, 新谷 勲. (1997). 食品衛生学雑誌, 38, 105-109
2. 吉田具弘, 上田重実. (2012). 東レリサーチセンターTRC News No.115 (May. 2012)
3. 小林千種, 早藤知恵子, 安井明子, 他. (2009). 東京都健康安全研究センター年報, 60, 113-118
4. 厚生労働省労働基準局安全衛生部化学物質対策課化学物質評価室. (2015). 平成27年度第3回ばく露評価小検討会資料 資料2-11
5. 社団法人 日本食品衛生協会 厚生労働省監修. 食品衛生検査指針・食品添加物編 (2003). 519-524
6. 公益社団法人日本薬学会 編. 衛生試験法・注解 (2015). 344-345
7. 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインについて」(最終改正: 平成22年12月24日付け 食安発第1224第1号)

令和元年度富山県水道水質検査精度管理調査結果

村元 達也 中山恵理子 五十嵐笑子 健名 智子

Survey Results of Quality Assessment for Drinking Water in Toyama (2019)

Tatsuya MURAMOTO, Eriko NAKAYAMA, Emiko IGARASHI, and Tomoko KEMMEI

目的：富山県では、平成8年度より、県内の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、令和元年度に実施した六価クロム化合物、色度の精度管理事業の調査結果についてまとめたので報告する。

材料と方法：

(1) 検査項目：六価クロム化合物、色度
(2) 検体の配布年月日：令和2年1月21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18機関
(4) 配布検体：六価クロム化合物測定用検体は、検体配布前日に衛生研究所の水道水に、硝酸を検体1 Lにつき10 mL加えた後、クロム標準液(1,000 mg/L：富士フイルム和光純薬株式会社製)を0.016 mg/L相当になるよう添加して作製したもので、配布に際し、六価クロム化合物の濃度範囲は0.005～0.05 mg/Lであると明示した。あらかじめ任意の3本を抜き出して六価クロム化合物を測定したところ、そのビン間変動係数は0.3%であった。また、検体配布7日後(令和2年1月28日)、14日後(令和2年2月4日)においても六価クロム化合物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。

色度測定用検体は、検体配布前日に衛生研究所の水道水に、色度標準液(1,000度：関東化学株式会社製)を3.0度相当になるよう添加して作製した。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(検査方法告示)[1]では、色度の試料は冷暗所に保存し、12時間以内に測定を行うこととなっている。本調査においては、あらかじめこの調製法で作成した試料は低温保存条件下1週間後においても色度の大幅な減衰がないことを確認したことから、検体配布後1週間以内に測定を行うこととした。配布に際し、色度の濃度範囲は1～5度であると明示した。あらかじめ任意の3本を抜き出して色度を測定したところ、そのビン間変動係数は0.6%であった。また、検体配布3日後(令和2年1月24日)、7日後(令和2年1月28日)においても色度の値に大幅な変化はなく、配布検体間の値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。

(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

変動係数(CV%) = 各機関の標準偏差 / $\bar{X}$ × 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) = $(X - X_2) / \sigma$

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

結果と考察：

(1) 六価クロム化合物

六価クロム化合物の精度管理には16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。誤差率が中央値±10%の範囲から外れる機関はなかった。16機関の測定値の平均値±標準偏差は0.01602 ± 0.00034 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0.0～1.9%、16機関間の

表 1. 六価クロム化合物 結果

検査機関	測定値 X (mg/L)	変動係数 CV%	誤差率 EV%
A	0.01530	0.5	-4.3
B	0.01568	0.3	-1.9
C	0.01574	1.0	-1.6
D	0.01578	1.0	-1.3
E	0.01586	0.7	-0.8
F	0.01596	0.3	-0.2
G	0.01596	1.9	-0.2
H	0.01598	0.7	-0.1
I	0.01600	0.0	0.1
J	0.01602	1.6	0.2
K	0.01604	0.9	0.3
L	0.01618	0.5	1.2
M	0.01632	1.1	2.1
N	0.01640	0.4	2.8
O	0.01644	0.5	2.8
P	0.01674	1.9	4.7
機関数	16		
平均値 $\bar{X}_2$ (mg/L)	0.01602		
標準偏差 σ (mg/L)	0.00034		
変動係数 (%)	2.1		

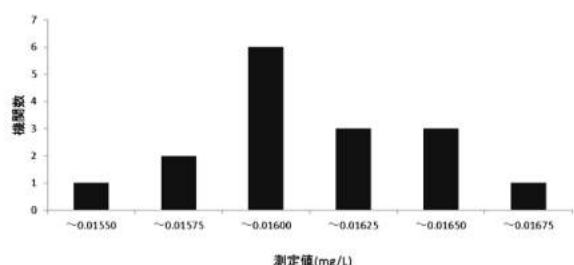


図 1. 六価クロム化合物 ヒストグラム

空間変動係数は2.1%であった。

Xbar-R 管理図を図2に示す。A及びP機関の測定値が平均値 ± 2 標準偏差の範囲(0.01534～0.01670 mg/L)から外れた。範囲の上方管理限界値(UCL)は0.00070 mg/Lであった。

Zスコアの順位を図3に示す。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。A及びP機関が「疑わしい」と評価された。「不満足」と評価される機関はなかった。

参加した16機関のうち、誘導結合プラズマ発光分光分析法(ICP-AES)を使用した機関が1機関で、その他の15機関は誘導結合プラズマ質量分析法(ICP-MS)を使用していた。試験開始日は、検体配布当日～3日目が9機関、4～7日目が4機関、8～10日目が3機関であった。いずれも検査方法告示で定められる保存方法及び期間を遵守しており、試験開始日による測定値の有意な差は確認されなかった。

すべての機関が市販の標準原液から検量線を作成しており、5機関でSPEX CertiPrep製の混合標準液が使用されていた。内部標準原液について

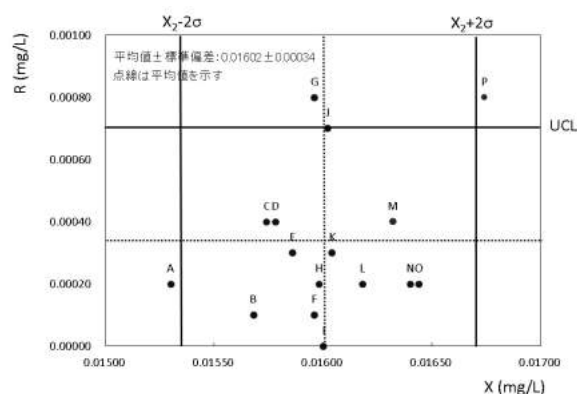


図 2. 六価クロム化合物 Xbar-R 管理図

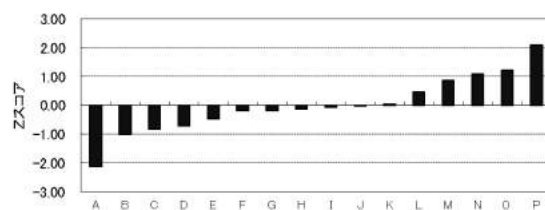


図 3. 六価クロム化合物 Z スコアの順位

も、すべての機関で市販品が使用されていた。内部標準物質の種類としては、コバルトが8機関、ガリウムが4機関、イットリウムが3機関(そのうち1機関はICP-AESで測定)、インジウムが1機関であった。半数以上の機関が、分析装置による内部標準液の自動添加を行っていた。

ICP-MSでは、プラズマ内で生成される多原子イオンによる干渉を抑えるため、多原子イオン低減化用ガスが一般的に使用される。ICP-MSで測定した15機関のうち、11機関がヘリウムガスを、2機関が水素ガスを、1機関がメタンガスを使用しており、1機関はガスを使用していなかった。六価クロム化合物については、 $^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}$ 、 $^{37}\text{Cl}^{16}\text{O}$ 等の試料中の夾雑成分を原因とする干渉イオンが生成される場合があり、注意が必要である。

検量線については、すべての機関が検査方法告示で示される濃度範囲内に4点以上の濃度点を設定して作成し、相関係数は0.999以上と良好であった。ブランク溶液を検量線に含めた機関が2機関あったが、低濃度側で良好な応答値が得られない場合等に誤差の原因となる恐れがあるため、原則として含めてはいけない。

(2) 色度

色度の精度管理には18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。誤差率が中央値 $\pm 20\%$ の範囲から外れる機関はなかった。18機関の測定

表 2. 色度 結果

検査機関	測定値 X (度)	変動係数 CV% (%)	誤差率 E% (%)
a	2.60	2.7	-11.3
b	2.76	2.0	-5.8
c	2.76	3.2	-5.8
d	2.80	0.0	-4.4
e	2.82	1.6	-3.8
f	2.88	5.2	-1.7
g	2.88	1.6	-1.7
h	2.90	0.0	-1.0
i	2.92	1.5	-0.3
中央値 X_1			
j	2.94	1.9	0.3
k	3.00	0.0	2.4
l	3.00	0.0	2.4
m	3.00	0.0	2.4
n	3.02	1.5	3.1
o	3.02	1.5	3.1
p	3.10	0.0	5.8
q	3.20	0.0	9.2
r	3.24	1.7	10.6
機関数	18		
平均値 X_2 (度)	2.94		
標準偏差 σ (度)	0.16		
変動係数 (%)	5.4		

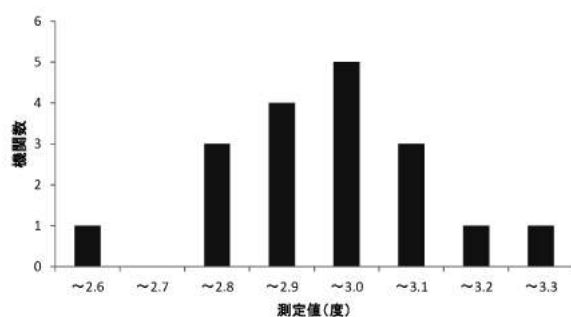


図 4. 色度 ヒストグラム

値の平均値±標準偏差は2.94 ± 0.16 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0.0～5.2%，18機関間の室間変動係数は5.4%であった。

Xbar-R 管理図を図5に示す。a機関の測定値が平均値±2標準偏差の範囲（2.62～3.26度）から外れた。範囲のUCLは0.19度であった。

Zスコアの順位を図6に示す。a機関が2<|Z|<3となり、「疑わしい」と評価された。3≤|Z|となる機関はなかった。

参加した全機関が透過光測定法を採用し、日本電色工業株式会社製のWater Analyzer W6000（13機関）または2000N（5機関）を使用していた。

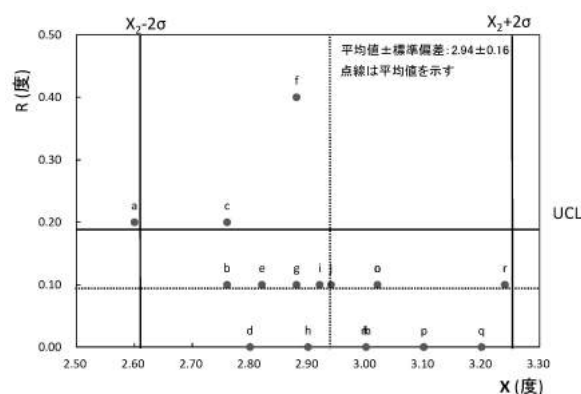


図 5. 色度 Xbar-R 管理図

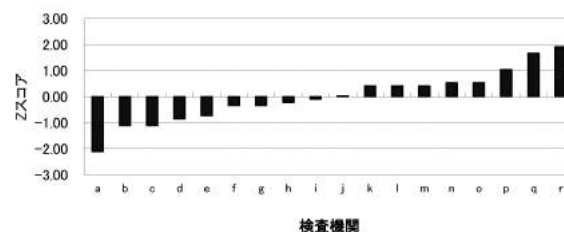


図 6. 色度 Z スコアの順位

また、全機関が検体配布日から3日後までに測定を行っていた。

検体の測定については、予め作成された内蔵検量線に基づいて定量値を算出した機関が7機関（そのうち6機関は標準液も測定し、値の確認を実施）、検量線系列を測定し、それをもとに内蔵検量線を作成しなおした機関が11機関あった。

今回の調査では棄却される機関はなかったが、Zスコアが2以上であったa機関の吸光度が、標準液及び検体ともに低値となる傾向が見られ、光源ランプの劣化が原因の1つとして考えられた。光源ランプの劣化は測定値のばらつきの原因ともなるため、光源ランプの出力確認を定期的に行うと良いと思われた。

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138号