

Ⅱ 調 査 研 究 報 告

資 料

富山県における新生児マススクリーニングの成果について (2023年度)

九曜 雅子 神吉 絹子 高岡 美紗 新保 孝治
板鼻 広美¹

Neonatal Mass Screening Results in Toyama Prefecture
(Apr. 2023–Mar. 2024)

Masako KUYO, Kinuko KAMIYOSHI, Misuzu TAKAOKA, Koji SHINBO,
and Hiromi ITAHANA

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

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

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

本報では、2023年度のスクリーニング結果について報告する。

実施方法：

1. 対象疾患

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

2. 対象者

県内で出生した新生児（里帰り児含む）のうち、

保護者が「先天性代謝異常等検査申込書兼同意書」を提出した者を対象とした。

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

3. 検査期間

2023年4月から2024年3月までの1年間の検査実施状況をまとめた。

4. スクリーニング方法

(1) 検査検体

県内の各医療機関において採血されたろ紙血液を用いた。

(2) 検査方法

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

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

2) ガラクトース血症

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

1. 富山県厚生部こども家庭室子育て支援課

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

3) 先天性甲状腺機能低下症

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

4) 先天性副腎過形成症

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

(3) 検体のサンプリング

バーコードを利用した自動サンプリング [9] を行った。

(4) 判定基準

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

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

(5) 結果報告

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

(6) データ処理

システムケイ社製『新生児マスクリーニング

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	340	4.4	600	7.9
	ホモシスチン尿症(HCU)		Met	250	2.9		
	シトルリン血症1型(CTLN1)		Cit	67	1.0	340	5.0
	アルギニンコハク酸尿症(ASA)			100		250	
有機酸代謝異常症	メチルマロン酸血症(MMA)		C3	3.9		8.0	
	プロピオン酸血症(PA)		& C3/C2	0.24		0.24	
	イソ吉草酸血症(IVA)		C5	1.0		5.0	
	メチルクロトニルグリシン尿症(MCCD)		C5-OH	1.00		2.00	
	ヒドロキシメチルグルタル酸血症(HMGA)						
	複合カルボキシラーゼ欠損症(MCD)		C5-DC	0.35			
	グルタル酸血症1型(GA1)						
脂酸代謝異常症	中鎖アシルCoA脱水素酵素欠損症(MCAD)		C8 & C8/C10	0.28		0.28	
	極長鎖アシルCoA脱水素酵素欠損症(VLCAD)		C14:1 & C14:1/C2	0.3		0.3	
	三頭酵素欠損症/長鎖3-ヒドロキシアシルCoA脱水素酵素欠損症(TFP/LCHAD)		C16-OH & C18:1-OH	0.100		0.100	
	カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ1欠損症(CPT-1)		C0/ (C16+C18)	0.100		0.100	
	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)		C0/ (C16+C18)/C2	75		75	
			C14/C3	0.37		0.37	
				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以上かつボイトラー法で蛍光無
		ボイトラー法	Gal-1-P 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	8 $\mu\text{U/mL}$	30 $\mu\text{U/mL}$
	先天性副腎過形成症	エンザイムイムノアッセイ法 (ELISA)	17-OHP	直接法10ng/mL 抽出法 4ng/mL	直接法10ng/mL以上で有症状または抽出法10ng/mL以上

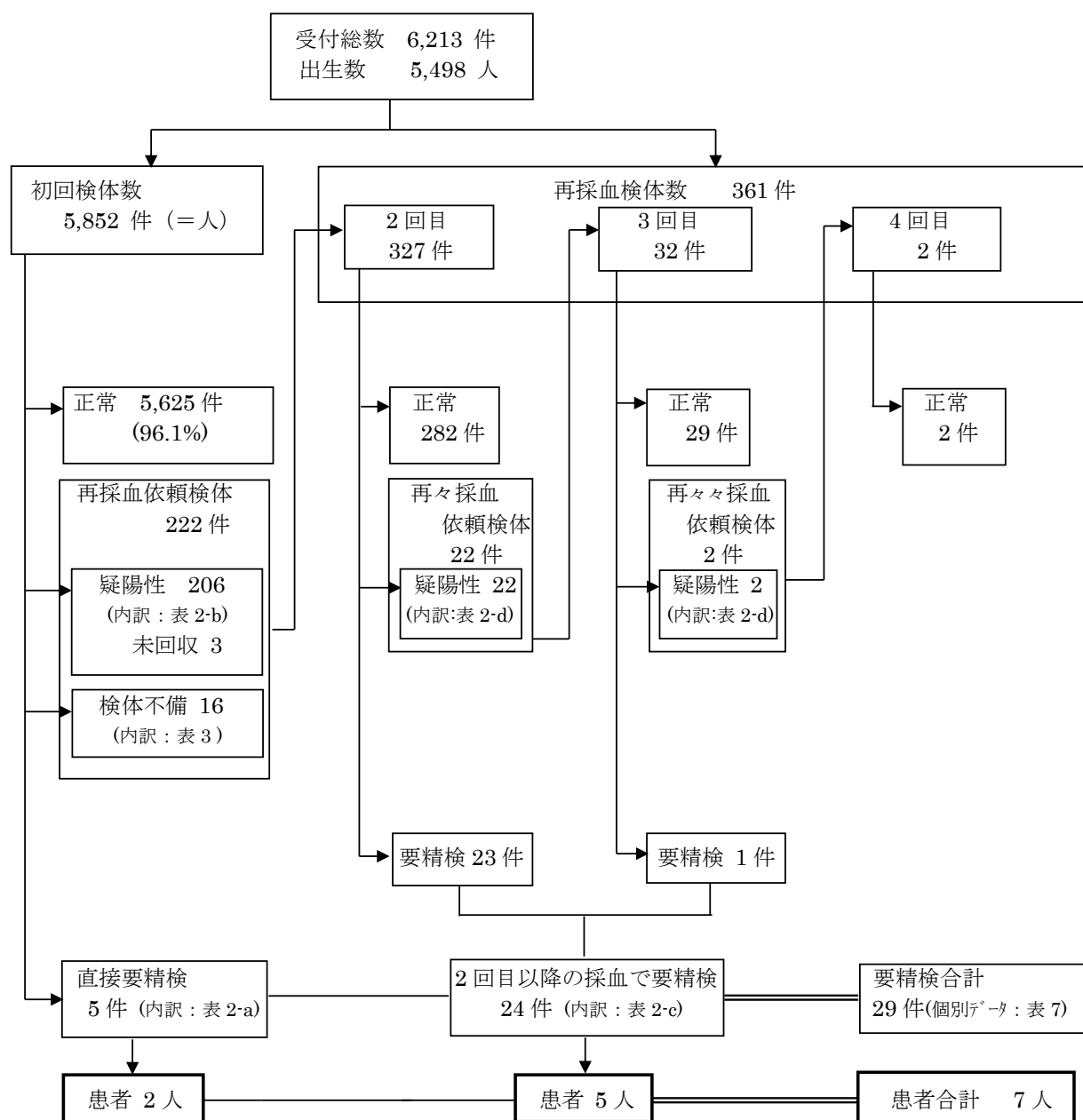


図 1. 検査の流れおよび検査数の概要

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、6,213 件で、県内 25 か所の医療機関（おもに産婦人科）から送付されてきたものである。

図 1 に検査の流れと検査件数の概要を示した。今年度の出生数は 5,498 人 [11] であり、初回検体

数 5,852 件（人）から計算すると受検率は 106.4% 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 5,625 件（人）（96.1%）は正常と判定されたが、206 件（人）（3.5%）は疑陽性のため、16 件（人）（0.3%）は血液が古い等の検体不備の理由で、再採血を依頼した。また、5 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361件のうちでは、24件（人）（6.6％）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5件（人）と合わせて29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0.34％であった。ガラクトース血症も合わせた代謝異常症の再採血率は0.81％となった。先天性甲状腺機能低下症は1.72％、先天性副腎過形成症は1.27％となり、すべての対象疾患の合計は3.80％であった。再採血率の目安は、タンデムマス法17疾患では0.1～0.6％[12]、先天性甲状腺機能低下症は0.5～1.0％、先天性副腎過形成症は0.3～0.5％[13]とされている。タンデムマス法の再採血率は適正であったが、先天性甲状腺機能低下症と先天性副腎過形成症の再採血率は高かった。

先天性甲状腺機能低下症については、再採血依頼数（107件）のうち53件（51.5％）は初回検体でのTSH値が判定基準値（カットオフ値）をわずかに超える程度（8～9 μU/ml）の検体であった。このような例の中には、再採血時にTSH値が上昇し、患者と診断された例もある。通常、再採血率が高い場合には、カットオフ値を高く設定し直す等の検討が必要となるが、その際には、このようなTSHが比較的低値の患者例についても考

慮する必要があると考えられる。

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

また、2疾患以上で疑陽性となった例が3件あり、これらの内訳を表2の注記に示した。表2、表4、表5では、疑陽性数欄のそれぞれの項目に計上した。

疑陽性のため再採血を依頼した検体数は230件（人）で、そのうち、2024年5月31日現在227件（人）の再採血検体を回収した。回収率は98.7％であった。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、今年度回収できなかった3件はいずれも、NICUから届いた検体で、スクリーニング対象疾患以外の理由で亡くなった例であった。

(3) 疑陽性以外の理由による再採血

表3に疑陽性以外の理由による再採血依頼数を示した。

医療機関で採血後検体受付までに7日間以上経過していたため血液が古いと判断した検体が1件、生後3日以内の採血であった検体（日齢3で採血）が1件であった。また、哺乳不良のための再採血依頼検体は14件であった。

表2. 要精検数および疑陽性による再採血依頼数の内訳

2023年4月～2024年3月	初回検体 5,852件			再採血検体 361件		総受付検体 6,213件		
	直接要精検数	疑陽性による再採血依頼数	再採血率	要精検数	疑陽性による再採血依頼数	要精検数合計	疑陽性による再採血依頼合計	再採血率
疾患名	a	b		c	d	a+c	b+d	
アミノ酸代謝異常症	0	11	0.19%	1	0	1	11	0.18%
有機酸代謝異常症	1 [1]	6	0.10%	0	0	1 [1]	6	0.10%
脂肪酸代謝異常症	2 [1]	3	0.05%	0	1	2 [1]	4	0.06%
ガラクトース血症	0	26	0.44%	1	3	1	29	0.47%
先天性甲状腺機能低下症	0	103	1.76%	18 [5]	4	18 [5]	107	1.72%
先天性副腎過形成症 (内 出生体重2000g未満児の数)	2 (2)	63 (26)	1.08%	4 (2)	16 (13)	6 (4)	79 (39)	1.27%
2022年度総計	5 [2]	212	3.62%	24 [5]	24	29 [7]	236	3.80%
《内 疑疾患が重複している疾患数》		《6》*					《6》*	

*《重複している疑疾患の内訳》
・フェニルケトン尿症＋先天性副腎過形成症 1件
・フェニルケトン尿症＋メーブルシロップ尿症＋ホモシスチン尿症＋イソ吉草酸血症＋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

依頼理由		件数
不備検体		16
内 訳	血液が古い	1
	生後 3 日以内の採血	1
	哺乳不良	14
低体重		80

このような検体不備のために再採血を依頼した 16 件については、すべて再採血検体が届き、回収率は 100% であった。

また、2,000 g 未満の低体重児については、①生後 1 か月時②体重が 2,500 g に達した時期③医療施設を退院する時期のうち、いずれか早い時期に再採血を依頼している [14]。2023 年度の初回検体 5,852 件（人）のうち、低体重児は 114 人（1.9%）であった。このうち、28 人は疑陽性として再採血を依頼した。また、2 人は要精密検査となった。この他に 4 人が哺乳不良例であり、低体重児のみを理由として再採血を依頼したのは 80 人であった。

（4）月および年度別推移並びに全国結果との比較

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

なお、2022 年度に要精検となった例で、先天性甲状腺機能低下症 1 例の患者が新たに判明したことから、表 5 の 2022 年度の患者数を修正した。

富山県における現在までの患者発見率については、ガラクトース血症を含めた代謝異常症の患者

数は 17 人（ヒスチジン血症除く）であり、発見率は 1/27,700 となった。先天性甲状腺機能低下症は 1/1,900、先天性副腎過形成症は 1/16,400 となった（表 6）。先天性甲状腺機能低下症の患者発見率は、全国と同様に高い。

2. 要精密検査者の検査結果

2023 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 50 件、先天性甲状腺機能低下症が 107 件、先天性副腎過形成症が 79 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 5 人、先天性甲状腺機能低下症 18 人、先天性副腎過形成症 16 人であった（表 5）。このうち患者と診断されたのは、プロピオン酸血症 1 人、極長鎖アシル CoA 脱水素酵素（VLCAD）欠損症 1 人、先天性甲状腺機能低下症 5 人であった。

表 7 に要精密検査者の個別の検査状況と結果をまとめた。

精密検査が必要となった場合には、富山県先天性代謝異常等検査事業マニュアル [3] に従い、採血医療機関への精密検査依頼時に精密検査実施医療機関（小児科）および主治医名を把握し、さらに主治医からの精密検査結果報告書により、精密検査結果、診断名等を把握した。なお、精密検査結果報告書は、診断や治療方針がつき次第、また経過を診ている場合は概ね半年くらいを目途に精密検査実施医療機関から当所に送付することになっている。

精密検査結果報告書の回収率は、96.6%（28 例 / 29 例）であった。

なお、2023 年度に当所に届いたフォローアップ

表 4. 月別検査実施状況

年		2023年									2024年			計	
月		4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3		
受付検体総数（件）		476	582	536	528	650	497	581	482	507	495	434	445	6,213	
内 訳	初回検査数（件）	452	542	504	504	620	472	553	447	477	462	403	416	5,852	
	再採血総数（件）	24	40	32	24	30	25	28	35	30	33	31	29	361	
	採 血 回 数	2回目	23	36	28	22	29	23	27	26	29	30	27	27	327
		3回目	1	4	3	1	1	2	1	9	1	3	4	2	32
		4回目以上	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2
疑 陽 性 数 （ 要 精 査 数	アミノ酸代謝異常症	0	0	1	1	1	1	5（1）	2	0	0	0	0	11（1）	
	有機酸代謝異常症	1	1	2（1）	0	0	0	1	0	0	1	0	0	6（1）	
	脂肪酸代謝異常症	0（1）	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0（1）	4（2）	
	ガラクトース血症	3	5	4	1	3	2	4	1	1	1	2（1）	2	29（1）	
	先天性甲状腺機能低下症	11（1）	9（4）	6	4（2）	12	6（2）	10	10（1）	11（2）	13（3）	8（1）	7（2）	107（18）	
	先天性副腎過形成症	6（2）	11	7（1）	9	8（1）	3	8（1）	4	6	5（1）	6	6	79（6）	
計		21（4）	26（4）	20（2）	15（2）	25（1）	12（2）	28（2）	17（1）	19（2）	21（4）	17（2）	15（3）	236（29）	

表 5. 先天性代謝異常等検査実施状況

区分 期間	受付総数 (件)	検査実人員数 (人)	出生数 (人)	受検率	疑陽性数			要精検数 () : 患者数		
					代謝異常症 ^{*1)}	甲状腺機能低下症	副腎過形成症	代謝異常症 ^{*1)}	甲状腺機能低下症	副腎過形成症
1977年度～1979年度	29,229	28,450	39,688	71.7%	262	—	—	6 (4)	—	—
1980年度～1988年度	122,841	115,435	116,956	98.7%	1,811	841	—	75 (27)	130 (25)	—
1989年度～2012年度	261,186	245,739	230,021	106.8%	2,620	3,369	2,616	196 (9)	586 (131)	367 (14)
2013年度～2020年度	66,058	62,716	57,571	108.9%	592	766	1,051	64 (4)	114 (53)	66 (5)
2021年度	7,071	6,683	6,215	107.5%	58	126	92	8 (3)	23 (11)	3 (1)
2022年度	6,899	6,500	6,088	106.8%	62	118	103	6 (1)	21 (11)	10 (0)
2023年度	6,213	5,852	5,498	106.4%	50	107	79	5 (2)	18 (5)	6 (0)
計	499,497	471,375	462,037	—	5,455 ^{*2)}	5,327	3,941	360 ^{*2)} (50 ^{*3)})	892 (236)	452 (20)

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

表 6. マススクリーニングによる富山県および全国の患者発見状況

区 分	富 山 県				全 国			
	2023年度		1977年度～2023年度		2022年度		1977年度～2022年度	
受検者数	5,852人		471,375人		786,930人		53,548,853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/ 78,600	18	1/ 43,700	1,140	1/ 47,000
アミノ酸代謝異常症 (2疾患) ¹⁾	0	—	1 ³⁾	1/ 73,900 ⁶⁾	7	1/ 112,400	56	1/ 180,500 ⁹⁾
有機酸代謝異常症	1	1/ 5,900	3 ⁴⁾	1/ 24,600 ⁶⁾	35	1/ 22,500	398	1/ 25,400 ⁹⁾
脂肪酸代謝異常症	1	1/ 5,900	4 ⁵⁾	1/ 18,500 ⁶⁾	30	1/ 26,200	267	1/ 37,900 ⁹⁾
ガラクトース血症	0	—	3	1/ 157,100	16	1/ 49,200	1,432	1/ 37,400
先天性甲状腺機能低下症	5	1/ 1,200	236	1/ 1,900 ⁷⁾	559	1/ 1,400	20,026	1/ 2,500 ¹⁰⁾
先天性副腎過形成症	0	—	20	1/ 16,400 ⁸⁾	57	1/ 13,800	2,288	1/ 16,400 ¹¹⁾

1) シトルリン血症 I 型, アルギノコハク酸尿症
2) 患者内訳：フェニルケトン尿症 5人, メーブルシロップ尿症 1人
3) 患者内訳：シトルリン血症 I 型 1人
4) 患者内訳：プロピオン酸血症 3人
5) 患者内訳：極長鎖アシルCoA脱水素酵素欠損症 4人
6) 2013年度（2014年3月）～2023年度 タンデムマス法受検者数 73,887人
7) 1980年度～2023年度 受検者数 442,925人
8) 1989年度～2023年度 受検者数 327,490人

9) 2011年度～2022年度 タンデムマス法受検者数 10,110,504人
10) 1979年度～2022年度 受検者数 50,205,912人
11) 1988年度～2022年度 受検者数 37,464,312人

検体 [16] は、36 人延べ54 件であった。そのうち、今年度に要精密検査となった例は13 人であり、延べ19 検体のフォローアップ検査を行った。

表 7 の診断名の欄には、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1 人、有機酸代謝異常症の疑いで1 人、脂肪酸代謝異常症の疑いで2 人、ガラクトース血症の疑いで1 人の計 5 人が要精密検査となった。

表 7 に示したアミノ酸、有機酸、脂肪酸代謝異常症欄の症例 1 および症例 4 は、極長鎖アシル CoA 脱水素酵素（VLCAD）欠損症疑いで要精密検査となった例である。症例 1 は、採血時の体重減少率は 7 % 程度であり、判定補助指標として設定している C14:1/C10, C14:1/C12, C14:1/C12:1, C14:1/C14 の値は高値であった。精密検査の結果、血清アシルカルニチン分析では、C14:1 0.04 μmol/L, C14:1/C2 0.01 であり、異常なしと診断された。症例 4 は、VLCAD 欠損症患者の同胞例であり、日齢 1 で緊急採血された検体での検査の結果でも、スクリーニング検査指標、判定補助指

表 7. 要精密検査者の検査状況と結果(1)

疑病名	症例	患者	性別	年齢	検査成績				診断名
アミノ酸、有機酸、脂肪酸代謝異常症	1		男	4	C14:1	0.30 nmol/ml	C14:1/C2	0.0185	異常なし
	2		男	5	Val	316.1 nmol/ml	Leu+Ile	372.0 nmol/ml	異常なし
				8	Val	313.7 nmol/ml	Leu+Ile	352.2 nmol/ml	
	3	*	女	4	C3	9.02 nmol/ml	C3/C2	0.382	プロピオン酸血症
	4	*	男	1	C14:1	1.16 nmol/ml	C14:1/C2	0.1020	極長鎖アシルCoA脱水素酵素 (VLCAD) 欠損症
ガラクトース血症	1		女	4	Gal	3.18 mg/dl	Gal-1-P ボイトラー法	8.24 mg/dl 正常	一過性高ガラクトース血症疑い
				9	Gal	3.13 mg/dl	Gal-1-P ボイトラー法	7.33 mg/dl 正常	
先天性甲状腺機能低下症	1		男	4	TSH	13.28 μ U/ml			先天性甲状腺機能低下症疑い
				11	TSH	8.93 μ U/ml			
	2		男	4	TSH	12.34 μ U/ml			一過性甲状腺機能低下症疑い
				14	TSH	9.04 μ U/ml			
	3	*	女	4	TSH	11.47 μ U/ml			先天性甲状腺機能低下症
				10	TSH	8.89 μ U/ml			
	4	*	女	4	TSH	17.57 μ U/ml			先天性甲状腺機能低下症
				8	TSH	17.43 μ U/ml			
	5		女	4	TSH	11.53 μ U/ml			一過性甲状腺機能低下症疑い
				8	TSH	9.88 μ U/ml			
	6	*	男	4	TSH	11.02 μ U/ml			潜在性先天性甲状腺機能低下症
				13	TSH	11.50 μ U/ml			
	7		男	4	TSH	9.30 μ U/ml			高TSH血症疑い
				10	TSH	10.20 μ U/ml			
	8		女	5	TSH	9.06 μ U/ml			一過性高TSH血症疑い

表 7. 要精密検査者の検査状況と結果(2)

疑病名	症例	患者	性別	年齢	検 査 成 績	診断名
先天性甲状腺機能低下症	8		女	15	TSH 8.91 μ U/ml	一過性高TSH血症疑い
	9		女	4	TSH 8.89 μ U/ml	異常なし
				10	TSH 10.20 μ U/ml	
	10		男	4	TSH 9.20 μ U/ml	一過性甲状腺機能低下症疑い
				12	TSH 8.72 μ U/ml	
	11		女	4	TSH 17.95 μ U/ml	先天性甲状腺機能低下症疑い
				12	TSH 10.39 μ U/ml	
	12		男	5	TSH 9.14 μ U/ml	一過性甲状腺機能低下症疑い
				13	TSH 8.12 μ U/ml	
				27	TSH 9.45 μ U/ml	
	13		女	5	TSH 8.44 μ U/ml	
				14	TSH 8.74 μ U/ml	
	14	*	女	4	TSH 8.81 μ U/ml	先天性甲状腺機能低下症
				8	TSH 9.66 μ U/ml	
	15		女	4	TSH 9.02 μ U/ml	一過性甲状腺機能低下症疑い
				14	TSH 13.80 μ U/ml	
	16		男	4	TSH 10.57 μ U/ml	一過性甲状腺機能低下症疑い
				14	TSH 10.20 μ U/ml	
	17	*	女	4	TSH 13.04 μ U/ml	先天性甲状腺機能低下症
				31	TSH 80.60 μ U/ml	
	18		女	4	TSH 9.13 μ U/ml	異常なし
				12	TSH 8.49 μ U/ml	

表 7. 要精密検査者の検査状況と結果(3)

疑病名	症例	患者	性別	日齢	検 査 成 績				診断名
先天性副腎過形成症	1		男	4	170HP直接法	19.31 ng/ml	170HP抽出法	17.59 ng/ml	異常なし 出生体重 1,975g
	2		女	4	170HP直接法	8.18 ng/ml	170HP抽出法	5.30 ng/ml	異常なし 出生体重 1,188g
				13	170HP直接法	11.62 ng/ml	170HP抽出法	10.86 ng/ml	
	3		男	4	170HP直接法	4.68 ng/ml	170HP抽出法	4.67 ng/ml	異常なし 出生体重 1,480g
				14	170HP直接法	27.17 ng/ml	170HP抽出法	23.72 ng/ml	
	4		男	4	170HP直接法	5.84 ng/ml	170HP抽出法	4.72 ng/ml	一過性高17-OHP血症 出生体重 2,200g
				13	170HP直接法	8.12 ng/ml	170HP抽出法	7.64 ng/ml	
	5		女	4	170HP直接法	10.48 ng/ml	170HP抽出法	4.19 ng/ml	異常なし 出生体重 2,532g
				11	170HP直接法	10.81 ng/ml	170HP抽出法	4.67 ng/ml	
	6		男	4	170HP直接法	16.43 ng/ml	170HP抽出法	14.39 ng/ml	異常なし 出生体重 1,726g

標とも高値であった。精密検査の結果、患者と診断された。

症例2は、メープルシロップ尿症疑いで要精密検査となったが、精密検査の結果、アロイソロイシンは検出されず、異常なしと診断された。

症例3は、軽症プロピオン酸血症患者の同胞例であり、日齢4で採血された初回検体での検査結果は、スクリーニング検査指標が即精密検査のカットオフ値を超える高値であった。精密検査の結果、メチルクエン酸 8.4 nmol/mL であり、プロピオン酸血症と診断され、治療が開始された。

ガラクトース血症欄の症例1は、ガラクトース高値で要精密検査となった。一過性高ガラクトース血症の疑いで治療なしで経過観察中である。

(2) 先天性甲状腺機能低下症

要精密検査となった18人のうち、患者と診断されたのは症例3, 4, 6, 14, 17の5人であった。

初回検体がTSH 8～9 μ U/mL で比較的低値またはカットオフ値 (8 μ U/mL) 前後でばらついたが、再採血検体で高値となり要精密検査となった例が9例あり、これらのうち1例 (症例14) が患者と診断され、5例は疾患疑いでフォローされている。

なお、症例13については、2024年5月31日時

点で精密検査実施医療機関からの回答はまだ届いていない。

(3) 先天性副腎過形成症

要精密検査となった6人のうち、出生時体重が2,000 g未満の低出生体重児は4例であった。

2023年度は患者は発見されなかった。

(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が、今年度はそのような患者はいなかった。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19人、チロジン血症2人、グルコース-6-リン酸脱水素酵素 (G6PD) 異常症2人、シトリン欠損症2人である。

3. 精度管理

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

2014年度より、精度試験 (Quality Control : QC) 用検体と技能試験 (Proficiency Test : PT) 用検体の2種類による精度管理 [17] が行われており、これらによる評価は、タンデムマス法の導入

に伴い制定された「タンデムマス・スクリーニングの検査施設基準および検査実施基準」[18]に準拠しているかどうかを判断するための一手段となる。

2023年度は、PT検体による精度管理が3回(5月, 7月, 1月), QC検体による精度管理が1回(10月)実施された。外部精度管理の結果については、検査精度は適正であり、正常・異常の判定も適切で、記入の誤りもなかったとの評価であった。また、QC検体の測定精度にも問題はないと判定された。

考察:今年度は、これまでのスクリーニング検査で発見された患者の同胞例の2例が患者と診断された。これらの例については、ハイリスク例として早期に検査を行うことで、早期の医療介入が可能であった。これは、本県で構築した要精密検査児のフォローアップ体制の中で、関連機関から患者の情報を把握していたことにより、迅速な対応ができたものと考えられた。

また、患者発見率が高い先天性甲状腺機能低下症については、精密検査結果の報告時点では、まだ疾患疑いとして経過を診ている例が多く、今後患者数はさらに増える可能性がある。「先天性甲状腺機能低下症マスクリーニングガイドライン(2021年改訂版)」[19]では、新生児期に全く症状がないサブクリニカル先天性甲状腺機能低下症が定義され、このような例では乳児期以降に甲状腺機能低下が顕在化することもあり、3か月程度は慎重に経過を診ることとされている。また、甲状腺機能の再評価や病型診断は3歳以降で行うことが推奨されており、これまでに患者と診断された例についても、あらためて追跡調査が必要と考えられた。

新生児マ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で生涯にわたって障害などの発生を予防すること[20]である。異常を早期に発見し、早期診断、早期治療開始に繋げるためには、より精度の高い二次検査を導入し、疾患特異的なデータの情報を得たうえで、早期に確実に異常と判定することも必要となる。当所では、そのような対象疾患についての二次検査法の検討を進めているところである。

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

のと考える。

文 献

1. 雇児母発 0331 第1号 厚生労働省雇用均等・児童家庭局母子保健課長通知(平成23年3月31日)
2. 雇児母発 0707 第2号 厚生労働省雇用均等・児童家庭局母子保健課長通知(平成29年7月7日)
3. 富山県先天性代謝異常等検査事業マニュアル(第5版)<https://www.pref.toyama.jp/120101/kurashi/kenkou/kenkou/sententaisya/kj00018894.html>(2024年5月31日時点アクセス可能)
4. 九曜雅子, 米田 豊, 高森亮輔, 他. (2014). 富山衛研年報, 37, 25-37
5. 重松陽介, 畑 郁江, 稲岡一考. (2011). 日本マス・スクリーニング学会誌, 21 (3), 13-18
6. 藤本昭栄, 大浦敏明, 長谷 豊. (1991). 日本マス・スクリーニング学会誌, 1(1), 211-212
7. 九曜雅子, 米田 豊, 加藤丈士, 他. (2005). 富山衛研年報, 28, 23-32
8. 美澄博雄, 高坂睦年, 和田 洋, 他. (1980). 代謝異常スクリーニング研究会会報, 5, 46-47
9. 九曜雅子, 米田 豊, 前多隆志, 他. (2010). 富山衛研年報, 33, 27-39
10. 花井潤師, 福士 勝, 石毛信之, 他. (2017). 日本マス・スクリーニング学会誌, 27 (2), 41
11. とやま統計ワールド「富山県の人口と世帯」, https://www.pref.toyama.jp/sections/1015/lib/jinko/_news/jinko240401/jinko240401.pdf (2024年5月31日時点アクセス可能)
12. 山口清次 (2012). 新しい新生児マスクリーニング タンデムマスQ&A 2012, 厚生労働科学研究(成育疾患克服等次世代育成基盤研究事業) p14
13. 市原 侃, 鈴木 健, 青木菊麿. (1998). 日本マス・スクリーニング学会誌, 8 (Supplement 2), 73-81
14. 猪股弘明, 楠田 聡, 大関武彦, 他. (2006). 日本マス・スクリーニング学会誌, 16 (3), 6-7

15. 先天性代謝異常検査等検査状況（令和2年度）厚生労働省子ども家庭局母子保健課. 特殊ミルク情報, 57, 62-65
16. 九曜雅子, 米田 豊, 五十嵐 登, 他. (2009). 日本マス・スクリーニング学会誌, 19 (3), 53-62
17. 九曜雅子, 米田 豊, 西永真理, 他. (2015). 富山衛研年報, 38, 25-36
18. 日本マス・スクリーニング学会精度保証システム委員会, 日本マス・スクリーニング学会技術部会 (2013). 日本マス・スクリーニング学会誌, 23 (3), 85-95
19. 先天性甲状腺機能低下症マススクリーニングガイドライン (2021 年改訂版)
https://www.jsms.gr.jp/download/CH_Guideline_2021_revised_%2010-27.pdf
(2024 年 5 月 31 日時点アクセス可能)
20. 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)

富山県における2023年度のウイルスおよびリケッチア検出状況

板持 雅恵 嵩田 嵩久 矢澤 俊輔 川上 利恵
佐賀由美子 福山 圭 谷 英樹

Viruses and Rickettsiae Detected from Specimens of Patients in Toyama Prefecture in the Fiscal Year 2023

Masae ITAMOCHI, Takahisa SHIMADA, Shunsuke YAZAWA, Rie KAWAKAMI,
Yumiko SAGA, Kei FUKUYAMA, and Hideki TANI

目的：富山県衛生研究所ウイルス部では、感染症発生動向調査や行政依頼検査、一般依頼検査など、種々の目的によって検査を行っている。ここでは、2023年度に検出されたウイルスおよびリケッチアの検査の概要を報告する。

材料と方法：検査は、検体の種類や状態に応じて、常法に従い実施した。

2023年4月から2024年3月までに受け付けた被検者は延べ908例、検体別では糞便（直腸拭い液を含む）168、鼻咽頭または鼻腔拭い液 722、気管吸引液 1、髄液 16、尿 9、血液（全血、血漿、血清、末梢血単核球、バフィーコートなど）59、痂皮・皮膚・水疱内容物 8、母乳 1 の計 984 件であった。

結果および考察：被検者 908 例中 728 例からウイルスあるいはリケッチアが検出された。以上の成績を臨床診断名別、月別に表 1 に示し、若干の解説を加えた。月別検出数は、検体採取日をもとに集計した。

インフルエンザおよびインフルエンザ様疾患・呼吸器疾患：県内の医療機関を受診した患者 108 症例（鼻咽頭または鼻腔拭い液 109、髄液 1、血清 3、糞便 2）について検査を行ったところ、5 月および 9 ～ 1 月に 32 症例から AH1 型インフルエンザウイルスが、4 ～ 5 月および 8 ～ 2 月に 35 症例から AH3 型インフルエンザウイルスが、12 ～ 3 月に 24 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。また、AH1 型インフルエンザウイルスとヒトコロナウイルス OC43 との同時検出例が 4 月に 1 例みられた。その他、インフルエンザウイルス以外では、パラインフルエンザウイルス 3 型、ライノウイルスがそれぞれ 1 例、

2 例から検出された。

新型コロナウイルス感染症（COVID-19）ゲノム解析：SARS-CoV-2 陽性例のうち、585 症例について次世代シーケンサーを用いたゲノム解析を行ったところ、オミクロン株 BA.2 系統（BA.2.75, BA.2.86, JN.1 を含む）が 5 ～ 3 月に、BA.5 系統（BF.7, BQ.1 を含む）が 4 ～ 8 月および 11 月に、XBB 系統（EG.5 を含む）が 4 ～ 3 月にそれぞれみられた。これらの結果は、随時富山県衛生研究所のホームページ上でも公開している¹⁾。

脳炎・脳症：計 10 症例（髄液 10、血清 5、糞便 4、鼻咽頭拭い液 6、尿 3）の検査を行ったところ、1 症例の血清からヒトヘルペスウイルス 6 型が、1 症例の糞便および鼻咽頭拭い液からライノウイルスが、1 症例の鼻咽頭拭い液から SARS-CoV-2 がそれぞれ検出された。また、鼻咽頭拭い液からライノウイルスが、糞便および鼻咽頭拭い液からライノウイルスおよびパレコウイルス 3 型が同時に検出された例が 1 例みられた。

無菌性髄膜炎：4 症例（髄液 4、血清 1、鼻咽頭拭い液 4、糞便 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 症例の糞便、血清、鼻咽頭拭い液、糞便からパレコウイルス 3 型がそれぞれ検出された。

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 2 事例（14 名、糞便 14）について検査を行ったところ、3 月の 1 事例 1 名からノロウイルス GII が検出された。月別では、8 月に 1 事例、3 月に 1 事例、それぞれ発生した。

散発例では、小児科医療機関に受診された計 149 症例（糞便 149）について検査を行ったところ、アストロウイルス、ノロウイルス GII、サボウイルス、アデノウイルス、パレコウイルス、エ

表 1. 2023 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	2023年					2024年											
		4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月	合計				
インフルエンザ・ インフルエンザ様疾患	(被検者数)	6	4	6		1	4	11	17	20	14	15	10	108				
	AH1型インフルエンザ		1				1	5	9	10	6			32				
	AH3型インフルエンザ	4	1			1	3	4	8	4	6	4		35				
	B型インフルエンザ									2	2	11	9	24				
	ヒトコロナOC43+AH1型インフルエンザ	1												1				
	パラインフルエンザ3型		1											1				
	ライノ				2									2				
COVID-19 ゲノム解析	(被検者数)	19	16	28	65	63	107	45	34	27	61	58	62	585				
	オミクロン株BA.2.75		1	3	4	3	2	1	1			1		16				
	BA.2.86									1	6	13	11	35				
	JN.1											15	24	61				
	BA.5(BF.7, BQ.1以外)	5	8	3	4	3			2					25				
	BF.7	12	3	1										16				
	BQ.1			1										1				
	XBB(XBB1.5, 1.9, 1.16, 2.3, EG.5以外)	2			40	4	14	6	4	2		1	2	75				
	XBB1.5	2		14	2	6	20	4	11	2	2			63				
	XBB1.9(EG.5, HK.3を除く)		1		4	3	9		1	1	2	1		22				
	EG.5				3	16	37	16	6	11	20	12	3	124				
	XBB1.16	1			2	14	14	11		2	1	2		47				
	XBB2.3				1	14	9	6	1					31				
	XBL					1								1				
	XDD										1	1		2				
	XDQ												1	13				
	(被検者数)	2	2	1			1			1	1	2		10				
	ヒトヘルペス6型												1	1				
	ライノ			1										1				
	ライノ+パレコ3型			1										1				
	SARS-CoV-2							1						1				
無菌性髄膜炎	(被検者数)		1							1		2	4					
	水痘・帯状疱疹												1	1				
	パレコ3型			1										1				
感染性胃腸炎(集団)	(被検者数)						12					2	14					
	ノロGII ^a											1	1					
感染性胃腸炎(散発)	(被検者数)	7	8	26	10	11	19	8	14	13	15	9	9	149				
	ノロGII	2	1	2			1		2		1	3	3	15				
	ノロGII+サボ												2	2				
	サボ		1			1		2	1	1	2	1	3	12				
	アストロ		2	5	1	1				2	2	3	1	17				
	サボ+アストロ		1	1										2				
	サボ+アデノ			1										1				
	サボ+パレコ								1					1				
	アデノ型不明	2							2		1			5				
	アデノ+エンテロ									1				1				
	パレコ型別不明			4		1	4	2						11				
	ノロGII+エンテロ+アデノ			1										1				
	アストロ+アデノ+パレコ			1										1				
	サボ+アデノ+エンテロ						1							1				
	アストロ+A群ロタ			1										1				
	アストロ+アデノ				1									1				
	A群ロタ		1											1				
	エンテロ					2	3	1						6				
麻疹	(被検者数)		1		1							2	4					
	パレコ3型		1											1				
手足口病	(被検者数)		1	2	1					1			5					
	エンテロA71			1	2									3				
	エンテロ型別不明									1				1				
ヘルパンギーナ	(被検者数)		1	1	1								3					
	コクサッキーA2		1											1				
	コクサッキーA4				1	1								2				
ダニ媒介感染症 (つつが虫病, SFTS ^b , 日本紅斑熱疑い)	(被検者数)	4	2	1	2		1	1			1	1	13					
	つつが虫病リケッチア									1				1				
エムボックス	紅斑熱群リケッチア		1											1				
	(被検者数)					1			1				2					
	水痘・帯状疱疹									1				1				
その他 ^c	(被検者数)	1	2	1	1			1		2	1		11					
	HHV-6				1								1	2				
	サイトメガロウイルス							1						1				
	水痘・帯状疱疹										1			1				
症例合計	(被検者数)	33	37	69	81	92	130	67	67	63	93	84	92	908				
	病原体検出者数	28	26	47	67	69	118	60	52	46	74	76	65	728				

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: 5月の1症例は咽頭結膜熱, 4月および6月の計2症例は発疹症, 5月の1事例は筋痛症, 7月および10月の計2症例は心筋炎, 10月の1症例はサイトメガロウイルス感染症, 12月の1症例は帯状疱疹, 1月の1症例はパレコウイルス感染症疑い, 3月の2症例はそれぞれ, デング熱疑い, 熱性痙攣.

ンテロウイルス, A 群ロタウイルスが検出された.

麻疹: 麻疹疑い例として検査依頼を受けた2症例(咽頭拭い液2, 血漿2, 末梢血単核球2, 尿2)の検査を行ったが, 麻疹ウイルスおよび風疹ウイルスは検出されなかった. その他のウイルスでは, 1例の咽頭拭い液からパレコウイルス3型が検出された.

手足口病: 5症例(咽頭拭い液5)の検査を行ったところ, 3症例からエンテロウイルスA71型が検出された. また, PCRによりエンテロウイルスが検出されたが, 型別判定ができなかった症例が1例みられた.

ヘルパンギーナ: 3症例(咽頭拭い液3)の検査を行ったところ, 1症例からコクサッキーウイルスA2型が, 2症例からコクサッキーウイルスA4型がそれぞれ検出された.

つつが虫病 [マダニ咬症, 重症熱性血小板減少症候群 (SFTS), 日本紅斑熱疑いを含む]: 13症例[血液(全血, または血漿, 血清, 末梢血単核球, バフィーコート)16, 痂皮または皮膚5, 咽頭拭い液1, 患者に付着していたマダニ1]の検査を行ったところ, 1症例の痂皮およびバフィーコートからつつが虫病リケッチア(Kawasaki型)が検出された. また, 1症例に付着したダニから紅斑熱群(極東紅斑熱)リケッチアが検出された. 本症例は, 血液や痂皮からはリケッチアは検出されなかったが, ペア血清で日本紅斑熱リケッチアに対するIgM抗体の陽転が確認された. 日本紅斑熱の患者発生は富山県内初であった.

エムボックス: 2症例(水疱内容物2, 鼻咽頭拭い液1, 血清2)の検査を行ったところ, エムボックスウイルスは検出されなかった. その他のウイルスでは, 1例から水痘・带状疱疹ウイルスが検出された.

その他: 7月に心筋炎1症例の鼻咽頭拭い液からヒトヘルペスウイルス6型が, 10月にサイトメガロウイルス感染症1症例の糞便, 気管吸引液, 尿, 母乳からサイトメガロウイルスが, 12月に带状疱疹1症例の水疱内容物から水痘・带状疱疹ウイルスがそれぞれ検出された.

謝 辞

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

文 献

1. 富山県衛生研究所. 新型コロナウイルスゲノム解析検査状況. 2024. https://www.pref.toyama.jp/1279/kurashi/kenkou/kenkou/1279/departement/departement2/genomukai_seki.html (2024年5月30日アクセス可能)

ポリオ流行予測調査(2023年度)

板持 雅恵	佐賀由美子	矢澤 俊輔	川上 利恵
鳶田 嵩久	福山 圭	高林小百合 ¹	吉浦 祐舞 ²
五十田瀬奈 ³	高田 真衣 ⁴	仲井 杏子 ⁵	松田 千穂 ⁶
	谷 英樹		

Epidemiological Surveillance of Poliovirus in Toyama Prefecture
in the Fiscal Year 2023

Masae ITAMOCHI, Yumiko SAGA, Shunsuke YAZAWA, Rie KAWAKAMI,
Takahisa SHIMADA, Kei FUKUYAMA, Sayuri TAKABAYASHI, Yui YOSHIURA,
Sena IKADA, Mai TAKATA, Kyoko NAKAI, Chiho MATSUDA,
and Hideki TANI

急性灰白髄炎（ポリオ）は、ポリオウイルスが中枢神経へ侵入することにより弛緩性麻痺を呈する感染症である。ヒトの腸管で増殖したポリオウイルスは糞便中に排泄され、経口感染によってヒトの間を伝播する。1988年に世界保健機関（WHO）によりポリオ根絶計画が提唱されて以来、ポリオウイルス野生株によるポリオの麻痺症例数は、当初125か国で35万例と推計されていたが、2023年には2か国（アフガニスタン、パキスタン）からの11例の報告となり、減少した [1]。2型野生株は1999年以降、3型野生株は2012年11月以降報告されていない。世界ポリオ根絶認定委員会は、2015年9月、2型野生株の根絶を宣言した。

一方、ワクチン株が変異し、地域伝播することにより複数の患者に麻痺を発症させる伝播型ワクチン由来ポリオウイルス（cVDPV）による症例は2023年にはアフリカ地域や中東地域、東南アジア地域の19か国で報告されている [1]。このような流行地からの野生株やcVDPVの侵入を阻止するためには、ポリオウイルスに対する高い集団免疫と、高感度のサーベイランスを維持していくことが重要であると考えられる。一方、国内では生ワクチン関連麻痺を防ぐために、2012年9月からポリオワクチンは不活化ワクチンに変更された。不活化ワクチンへの移行により集団免疫保有状況がどのように変化したかを評価することは重

要である。

富山県におけるポリオ流行予測調査は、国内のポリオウイルスの動向を監視するために、厚生労働省感染症流行予測事業の一つとして毎年実施されている。2023年度の調査内容は、下水流入水についてポリオウイルスの検索を行う「感染源調査」と、県民のポリオウイルスに対する中和抗体保有状況を調べる「感受性調査」であった。本稿では両調査結果をあわせて報告する。

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

感染源調査

材料と方法：2023年4月から2024年3月まで、富山県内の1下水処理場（分流式）において、月1回下水流入水を約2 L採取した。下水流入水は4℃で3,000 rpm、30分間遠心し上清を回収後、「フィルター吸着溶出法」 [2, 3] により濃縮した。すなわち、下水流入水遠心上清1 Lに、最終濃度0.05 Mとなるように塩化マグネシウムを添加し、0.5 Nの塩酸を用いてpH 3.5に調整した。この液を陰電荷膜に加圧濾過して吸着させた後、陰電荷膜を細切し、 1.0×10^{-3} N NaOH (pH 10.5) 10 mLを添加してボルテックスミキサーによりウイルス

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. 富山県厚生部感染症対策課

表 1. 下水流入水からのウイルス分離株数

分離ウイルス		2023年							2024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	
コクサッキーB	5型					5	10	16	20	8				59	
エコー	6型									1				1	
	11型					10	5	7	2	9	11	6	1	51	
アデノ	2型		1											1	
レオ	1型												8	8	
	2型				8	4	7							19	
計		0	1	0	8	19	22	23	22	18	11	6	9	114	

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

1型		各中和抗体価の保有者数										抗体価4倍以上		
年齢区分	検体数	<4	4	8	16	32	64	128	256	≥512	保有者数	保有率(%)	平均抗体価	
(歳)	(人)													
0～1	19	0	0	1	2	3	4	1	4	4	19	(100)	95.6	
2～3	19	0	1	0	3	2	0	0	6	7	19	(100)	137.7	
4～9	19	2	1	3	4	3	4	1	0	1	17	(89.5)	28.3	
10～14	26	0	0	3	4	2	5	2	4	6	26	(100)	81.4	
15～19	14	0	1	0	0	2	4	1	2	4	14	(100)	110.3	
20～24	22	1	0	0	0	5	2	2	6	6	21	(95.5)	156.0	
25～29	21	2	0	1	0	3	5	5	4	1	19	(90.5)	92.2	
30～39	23	1	1	1	0	1	9	4	4	2	22	(95.7)	87.7	
40～49	34	2	1	2	10	5	6	2	3	3	32	(94.1)	43.3	
50～59	21	1	2	3	5	5	2	0	1	2	20	(95.2)	27.9	
60～	23	1	2	2	3	5	6	1	2	1	22	(95.7)	37.5	
合計	241	10	9	16	31	36	47	19	36	37	231	(95.9)	68.0	
(%)		(4.1)	(3.7)	(6.6)	(12.9)	(14.9)	(19.5)	(7.9)	(14.9)	(15.4)	(95.9)			

2型		各中和抗体価の保有者数										抗体価4倍以上		
年齢区分 (歳)	検体数 (人)	<4	4	8	16	32	64	128	256	≥512	保有者数	保有率(%)	平均抗体価	
0～1	19	0	1	0	1	0	0	3	4	10	19	(100)	229.5	
2～3	19	0	0	0	0	0	0	1	1	17	19	(100)	458.9	
4～9	19	0	1	0	0	1	4	3	6	4	19	(100)	142.8	
10～14	26	0	0	0	2	2	2	9	8	3	26	(100)	135.0	
15～19	14	0	0	0	2	3	1	6	1	1	14	(100)	78.0	
20～24	22	0	1	1	0	3	7	5	1	4	22	(100)	85.0	
25～29	21	1	0	1	3	2	8	5	1	0	20	(95.2)	55.7	
30～39	23	0	1	2	1	1	9	6	1	2	23	(100)	66.0	
40～49	34	0	1	2	5	4	7	6	6	3	34	(100)	68.0	
50～59	21	0	0	0	1	6	5	2	3	4	21	(100)	95.1	
60～	23	0	1	5	2	5	3	3	1	3	23	(100)	42.0	
合計	241	1	6	11	17	27	46	49	33	51	240	(99.6)	98.7	
(%)		(0.4)	(2.5)	(4.6)	(7.1)	(11.2)	(19.1)	(20.3)	(13.7)	(21.2)	(99.6)			

3型		各中和抗体価の保有者数										抗体価4倍以上		
年齢区分	検体数	<4	4	8	16	32	64	128	256	≥512	保有者数	保有率(%)	平均抗体価	
(歳)	(人)													
0～1	19	2	0	0	0	1	4	5	4	3	17	(89.5)	150.7	
2～3	19	0	0	0	0	1	2	0	4	12	19	(100)	307.2	
4～9	19	1	1	3	4	2	1	5	0	2	18	(94.7)	40.3	
10～14	26	9	2	3	2	5	1	3	0	1	17	(65.4)	28.3	
15～19	14	9	0	2	1	0	1	0	0	1	5	(35.7)	32.0	
20～24	22	11	4	4	0	3	0	0	0	0	11	(50.0)	9.1	
25～29	21	8	1	1	7	3	1	0	0	0	13	(61.9)	17.8	
30～39	23	8	1	2	3	4	5	0	0	0	15	(65.2)	25.4	
40～49	34	9	5	5	2	6	4	1	1	1	25	(73.5)	21.7	
50～59	21	3	1	2	5	3	4	1	1	1	18	(85.7)	33.3	
60～	23	1	2	3	3	7	4	2	1	0	22	(95.7)	28.2	
合計	241	61	17	25	27	35	27	17	11	21	180	(74.7)	38.8	
(%)		(25.3)	(7.1)	(10.4)	(11.2)	(14.5)	(11.2)	(7.1)	(4.6)	(8.7)	(74.7)			

を溶出した。溶出液を回収し、100 × TE Buffer (pH 8.0) 100 μL と 0.1 N 硫酸 50 μL を加えた後、4 °C で 10,000 rpm, 30 分間遠心した。遠心上清を回収し、ポアサイズ 0.45 μm のフィルターに濾過して得られた濾液を 100 倍濃縮下水検体とした (1 番溶出液)。同様の溶出操作を繰り返し、2 番溶出液を得た。24 穴プレートに培養した細胞 (Vero, MA104, RD, HEp-2, L20B) に、1 番溶出液は各細胞当たり 5 穴、2 番溶出液は 3 穴の計 8 穴 (総計 40 穴) 接種し (180 μL/穴)、細胞変性効果を指標にウイルスを分離した。分離株は、エンテロウイルス抗血清 (国立感染症研究所より分与、またはデンカ) を用いた中和試験により同定した。

結果および考察：下水流入水からは、ポリオウイルスは分離されなかった (表 1)。その他のウイルスでは、コクサッキーウイルス B5 型、エコーウイルス 6 型、11 型、アデノウイルス 2 型、およびレオウイルス 1 型、および 2 型が分離された。

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

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

感受性調査

材料と方法：2023 年 7 月から 9 月にかけて、県内住民 0～91 歳の合計 241 名について、採血と予防接種歴の調査を行った。

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

対する中和抗体価はこれまでと同様、当所において測定した。すなわち、被験血清を Eagle-MEM 培養液で 4 倍希釈し、56°C 30 分間非働化した後、その 25 μL を 96 穴マイクロプレート上で 2 段階希釈した。希釈血清それぞれに、100 TCID₅₀/25 μL となるように調製した 1, 3 型のポリオウイルス (弱毒セービンウイルス) 25 μL を加えてよく混和し、35 °C、3 時間の中和反応を行った。中和後、Vero 細胞浮遊液 (1～2 × 10⁵ 細胞/mL) を 100 μL ずつ加え、35 °C、5% 二酸化炭素の条件下で培養した。細胞変性効果を 1 週間観察し、ウイルス増殖を抑制した最大血清希釈倍数を中和抗体価とした。各検体は同時に 2 穴ずつ測定した。ポリオウイルスは、国立感染症研究所から分与され、当研究所において VeroE6 細胞で 1 代継代後、さらに Vero 細胞で 1 代継代したものを使用した。統計解析は、SPSS Statistics 27.0 (IBM) を用いた。

結果および考察：表 2 にポリオウイルスに対する各中和抗体価の年齢区分別保有状況を示した。4 倍以上を陽性とした抗体保有率は、全体では 2 型が 99.6% (240/241) で最も高く、次いで 1 型が 95.9% (231/241)、3 型が 74.7% (180/241) 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 4～9 歳が 89.5%、それ以外の年齢区分は 90% 以上の抗体保有率であった。2 型ではすべての年齢区分で 95% 以上の抗体保有率であった。一方、3 型は 15～19 歳が 35.7%、20～24 歳が 50.0% と低く、それ以外の年齢区分が 60% 以上であった。ポリオウイルス生ワクチン接種者において、1 型、2 型に比し 3 型の抗体保有率が低いのは、これまでの全国の調査でも同様である [6]。

一方、抗体保有者の幾何平均抗体価は、全体では 1 型 68.0 倍、2 型 98.7 倍、3 型 38.8 倍であった。年齢区分別では、1 型では 4～9 歳の 28.3 倍から 20～24 歳の 156.0 倍までを示した。2 型では 60 歳以上の 42.0 倍から 2～3 歳の 458.9 倍までを示した。3 型では 20～24 歳の 9.1 倍から 2～3 歳の 307.2 倍までを示した。

表 3 にワクチン接種回数別にみた抗体保有状況を示した。不活化ワクチン 4 回以上接種者における抗体保有率は、1 型 97.6% (41/42)、2 型 100% (42/42)、3 型 95.2% (40/42) であった。一方、生ワクチン 2 回以上接種者では、1 型 97.3% (36/37)、2 型 100% (37/37) と高い抗体保有率を示し

表 3. ワクチン接種歴別 抗体保有状況

1型		ワクチン接種歴あり										接種歴不明	
年齢区分 (歳)	検体数 (人)	生2回以上		生1回不活化3回		不活化4回以上		不活化3回		回数不明		接種歴不明	
		陽性数/検査数	保有率(%)	陽性数/検査数	保有率(%)	陽性数/検査数	保有率(%)	陽性数/検査数	保有率(%)	陽性数/検査数	保有率(%)		
0～1	19					4 / 4	(100)	14 / 14	(100)			1 / 1	(100)
2～3	19			1 / 1	(100)	13 / 13	(100)	3 / 3	(100)			2 / 2	(100)
4～9	19					16 / 17	(94.1)	1 / 1	(100)	0 / 1	(0)		
10～14	26	14 / 14	(100)	2 / 2	(100)	8 / 8	(100)			1 / 1	(100)	1 / 1	(100)
15～19	14	14 / 14	(100)										
20～24	22	6 / 7	(85.7)									15 / 15	(100)
25～29	21									1 / 1	(100)	18 / 20	(90.0)
30～39	23	1 / 1	(100)									21 / 22	(95.5)
40～49	34	1 / 1	(100)							2 / 2	(100)	29 / 31	(93.5)
50～59	21											20 / 21	(95.2)
60～	23											22 / 23	(95.7)
合計	241	36 / 37	(97.3)	3 / 3	(100)	41 / 42	(97.6)	18 / 18	(100)	4 / 5	(80.0)	129 / 136	(94.9)
						102 / 105	(97.1)						

2型		ワクチン接種歴あり										接種歴不明	
年齢区分 (歳)	検体数 (人)	生2回以上		生1回不活化3回		不活化4回以上		不活化3回		回数不明		接種歴不明	
		陽性数/検査数	保有率(%)	陽性数/検査数	保有率(%)	陽性数/検査数	保有率(%)	陽性数/検査数	保有率(%)	陽性数/検査数	保有率(%)		
0～1	19					4 / 4	(100)	14 / 14	(100)			1 / 1	(100)
2～3	19			1 / 1	(100)	13 / 13	(100)	3 / 3	(100)			2 / 2	(100)
4～9	19					17 / 17	(100)	1 / 1	(100)	1 / 1	(100)		
10～14	26	14 / 14	(100)	2 / 2	(100)	8 / 8	(100)			1 / 1	(100)	1 / 1	(100)
15～19	14	14 / 14	(100)										
20～24	22	7 / 7	(100)									15 / 15	(100)
25～29	21									1 / 1	(100)	19 / 20	(95.0)
30～39	23	1 / 1	(100)									22 / 22	(100)
40～49	34	1 / 1	(100)							2 / 2	(100)	31 / 31	(100)
50～59	21											21 / 21	(100)
60～	23											23 / 23	(100)
合計	241	37 / 37	(100)	3 / 3	(100)	42 / 42	(100)	18 / 18	(100)	5 / 5	(100)	135 / 136	(99.3)
						105 / 105	(100)						

3型		ワクチン接種歴あり										接種歴不明	
年齢区分 (歳)	検体数 (人)	生2回以上		生1回不活化3回		不活化4回以上		不活化3回		回数不明		接種歴不明	
		陽性数/検査数	保有率(%)	陽性数/検査数	保有率(%)	陽性数/検査数	保有率(%)	陽性数/検査数	保有率(%)	陽性数/検査数	保有率(%)		
0～1	19					4 / 4	(100)	13 / 14	(93.0)			0 / 1	(0)
2～3	19			1 / 1	(100)	13 / 13	(100)	3 / 3	(100)			2 / 2	(100)
4～9	19					16 / 17	(94.1)	1 / 1	(100)	1 / 1	(100)		
10～14	26	7 / 14	(50.0)	2 / 2	(100)	7 / 8	(88.0)			0 / 1	(0)	1 / 1	(100)
15～19	14	5 / 14	(36.0)										
20～24	22	2 / 7	(28.6)									9 / 15	(60.0)
25～29	21									1 / 1	(100)	12 / 20	(60.0)
30～39	23	1 / 1	(100)									14 / 22	(63.6)
40～49	34	1 / 1	(100)							2 / 2	(100)	22 / 31	(71.0)
50～59	21											18 / 21	(85.7)
60～	23											22 / 23	(95.7)
合計	241	16 / 37	(43.2)	3 / 3	(100)	40 / 42	(95.2)	17 / 18	(94.0)	4 / 5	(80.0)	100 / 136	(73.5)
						80 / 105	(76.2)						

たが、3型は43.2% (16/37) と低値を示した。

表4に1, 2, 3型ポリオウイルスに対する中和抗体の年齢区分別保有状況を示した。すべての型に対する抗体を保有している人の割合は、全体では73.0% (176/241) であった。年齢区分別では、2～3歳が100%と高かった。15～19歳が35.7%, 20～24歳が50.0%と比較的低い値を示したが、これらは、3型に対する低い中和抗体保有率を反映しているものと考えられた(表2)。

わが国では、ポリオワクチンは1961年に乳幼児を対象に一斉に生ワクチンの接種が開始され、1963年からは2回接種が定期的に行われてきた[10]。その後、2012年9月からは不活化ワクチンの個別接種に切り替えられた[6]。不活化ワクチンの接種スケジュールは、生後3か月以上90か月未満の間に計4回接種する。初回接種として20～56日間隔で(標準として12か月までに)3回接種し、その後追加免疫として初回免疫終了後12

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型	2型	3型	1,2型	2,3型	1,3型	1,2,3型(%)
0～1	19					2			17 (89.5)
2～3	19								19 (100)
4～9	19					1	2		16 (84.2)
10～14	26					9			17 (65.4)
15～19	14					9			5 (35.7)
20～24	22			1		10			11 (50.0)
25～29	21			2		6		1	12 (57.1)
30～39	23					8	1		14 (60.9)
40～49	34			2		7			25 (73.5)
50～59	21			1		2			18 (85.7)
60～	23			1					22 (95.7)
合計	241	0	0	7	0	54	3	1	176 (73.0)
(%)	(100)	(0)	(0)	(2.9)	(0)	(22.4)	(1.2)	(0.4)	(73.0)

～18 か月の間を標準として1回接種する[11].

生ワクチンから不活化ワクチンへの移行が集団免疫へ及ぼした影響をみるために、移行前後の年(2011～2023年)における小児(0～11歳)の抗体保有状況[12]を比較した。検体数は、計963件であり、このうち、生ワクチン2回以上接種者は345名(35.8%)、不活化ワクチン4回以上接種者は287名(29.8%)であった。図1A, 1Bに2011年から2023年までの小児(0～11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、未接種者以外のすべてが生ワクチンを接種していた。不活化ワクチン移行後は、低年齢層から不活化ワクチンの接種にかわり、2023年では0～11歳のすべてが不活化ワクチンを接種していた。生ワクチンから不活化ワクチンへの切り替えにより、特に3型の抗体保有率がほぼ100%と高くなり改善した。

図2に、不活化ワクチン4回以上接種者における中和抗体価を、最終接種日からの経過月数別に示した。不活化ワクチン4回以上接種者では、1型、2型、3型ともに、経過月数が増えるごとに中和抗体価が低くなる傾向がみられた(Spearmanの相関係数、1型 $r = -0.578$, 2型 $r = -0.485$, 3型 $r = -0.541$, すべて $p < 0.001$)。

生ワクチンは3種類のウイルスを同時に接種するため、ウイルスの干渉作用により、2型に比べ1型、さらに3型のポリオウイルスに対する免疫が得られにくいことが報告されている[13, 14]。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[15-18]。本調査でも不活化ワクチン接種者は今のところ3型も含めて高い抗体保有率を示しているが、不活化ワクチンへの移行が接種後の持続免疫や集団免疫保有状況にどのような影響を及ぼすかは、今後も推移を見ていく必要がある。

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

まとめ

感染源調査：2023年4月～2024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：2023年7月から9月に採取された0歳から91歳までの241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95.9%、2型99.6%、3型74.7%であった。また、抗体保有者の幾何平均抗体価は1型68.0倍、2型98.7倍、3型38.8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

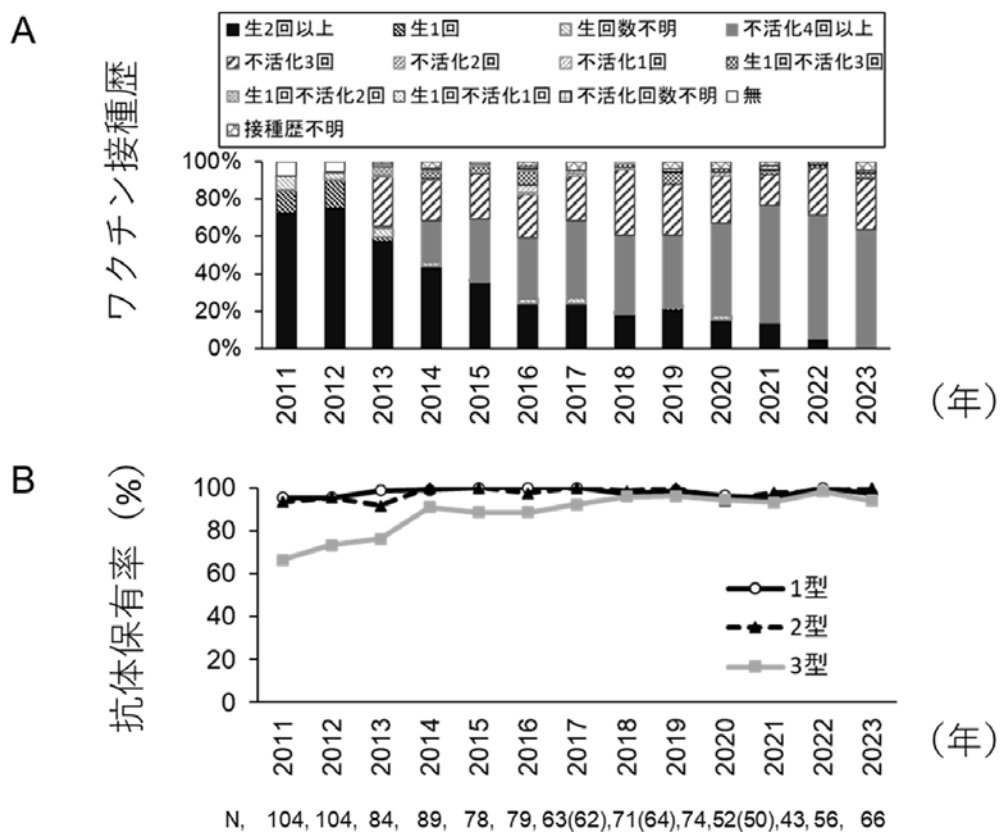


図 1. 0 ～ 11 歳の小児におけるポリオワクチン接種歴と抗体保有状況 (2011 ～ 2023 年) .

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

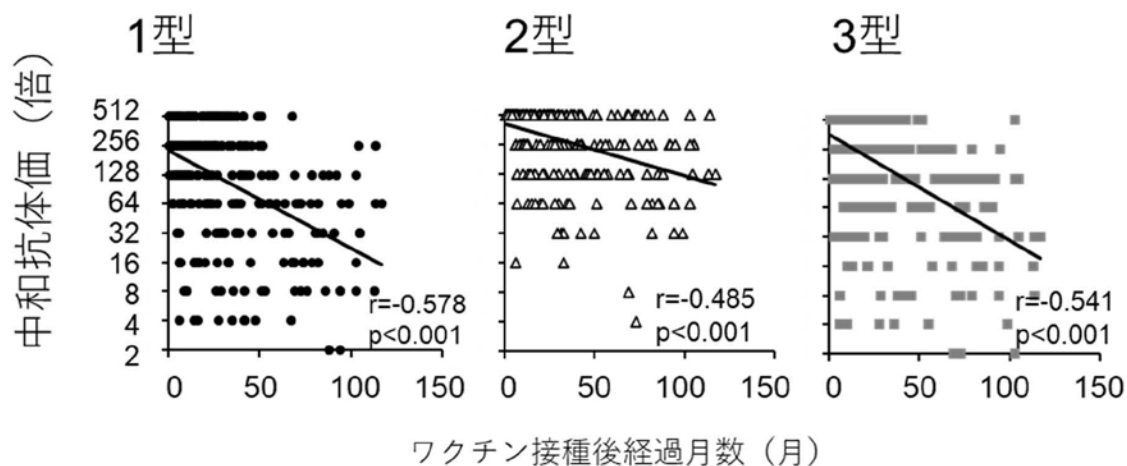


図 2. 不活化ワクチン 4 回以上接種後の経過期間別の中和抗体価 .

図中の●, △, ■は各被験者の検体を, 線は回帰曲線を示す.

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

Spearman の相関係数, ポリオ 1 型 N=281, 2 型 N=274, 3 型 N=281.

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 (2024). Weekly epidemiological record, 99, 168-178
2. 国立感染症研究所, 全国地方衛生研究所 (2012). ポリオウイルス感染症の実験室診断マニュアル, 28-38
3. 板持雅恵, 名古屋真弓, 稲崎倫子, 他. (2017). 富山県衛生研究所年報 (平成 28 年度), 40, 55-60
4. 富山県感染症情報センター. 感染症発生動向調査報告数一覧. 2024. <https://www.pref.toyama.jp/1279/kansen/index.html> (2024 年 5 月 30 日アクセス可能)
5. 国立感染症研究所, 厚生労働省健康局結核感染症課 (2015). 病原微生物検出情報, 36, 86-87
6. 国立感染症研究所, 厚生労働省健康局結核感染症課 (2016). 病原微生物検出情報, 37, 17-31
7. 国立感染症研究所, 厚生労働省健康局結核感染症課 (2018). 病原微生物検出情報, 39, 67-69
8. 厚生労働省健康局結核感染症課, 国立感染症研究所流行予測調査事業委員会 (2019). 感染症流行予測調査事業検査術式, 4-21
9. 厚生労働省 (2017). 平成 29 年度感染症流行予測調査実施要領, 5
10. 厚生労働省, 国立感染症研究所 (2001). 感染症発生動向調査週報, 3 (26), 8-11
11. 厚生労働省 (2013). 予防接種法第 5 条第 1 項の規定による予防接種の実施について, 平成 25 年 3 月 30 日付健発第 0330 第 2 号厚生労働省健康局長通知, 定期接種実施要領
12. 板持雅恵, 佐賀由美子, 矢澤俊輔, 他. (2023). 富山県衛生研究所年報 (令和 4 年度), 46, 51-57
13. Maladonado YA, Pema-Cruz V, Sanchez M et. al. (1997). J Infect Dis, 175, 545-553
14. 土居穰, 鎗水宏, 山本浩, 他. (1993). 臨床とウイルス, 21, 123-131
15. Modlin JF, Halsey NA, Thoms ML (1997). J Infect Dis, 175, S228-234
16. 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
17. 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
18. Satoh H, Tanaka-Taya K, Shimizu H, et al. (2019). Vaccine, 37, 1964-1971

日本脳炎流行予測調査における感受性調査(2023年度)

矢澤 俊輔 福山 圭 嵩田 嵩久 佐賀由美子
川上 利恵 板持 雅恵 高林小百合¹ 吉浦 祐舞²
五十田瀬奈³ 高田 真衣⁴ 仲井 杏子⁵ 松田 千穂⁶
谷 英樹

Serological Investigation of Japanese Encephalitis in Toyama Prefecture in the Fiscal Year 2023

Shunsuke YAZAWA, Kei FUKUYAMA, Takahisa SHIMADA, Yumiko SAGA,
Rie KAWAKAMI, Masae ITAMOCHI, Sayuri TAKABAYASHI, Yui YOSHIURA,
Sena IKADA, Mai TAKATA, Kyoko NAKAI, Chiho MATSUDA,
and Hideki TANI

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

調査および検査方法：2023年7月から9月に、県内住民241名について採血と予防接種歴、罹患歴の調査を行った。

日本脳炎ウイルスに対する中和抗体価の測定は、peroxidase-anti-peroxidase (PAP) 法を応用したフォーカス計数法にて行った。血清を56℃、30分間非働化した後、10倍から2倍階段希釈し、100 focus forming units (FFU) / 50 μL に調整したウイルス液（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：241名のうち、日本脳炎ウイルスに対する抗体陽性者は173名(71.8%)であった。図1に年齢群別の抗体保有率を示した。年齢

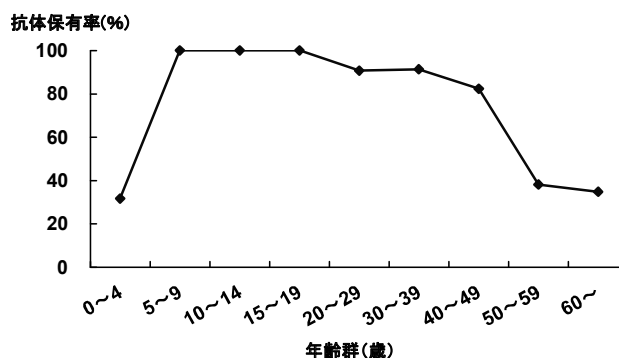


図1. 年齢群別の中和抗体保有率(2023年度)

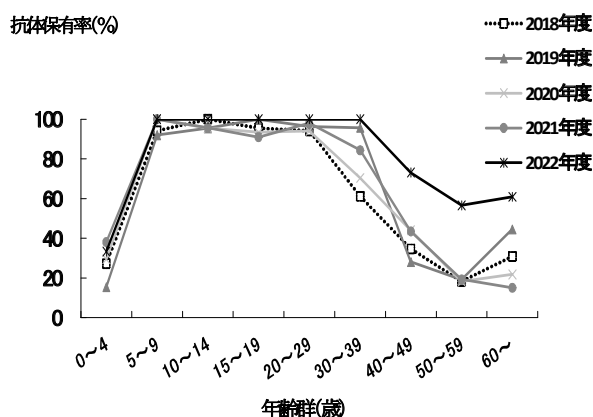


図2. 年齢群別の中和抗体保有率(2018～2022年度)

1. 新川厚生センター, 2. 中部厚生センター, 3. 高岡厚生センター, 4. 砺波厚生センター,
5. 富山市保健所, 6. 富山県厚生部感染症対策課

表 1. 年齢群別およびワクチン接種歴別の中和抗体保有率

年齢群 (歳)	接種歴あり		接種歴なし		接種歴不明		合計	
	陽性数/検査数	陽性率	陽性数/検査数	陽性率	陽性数/検査数	陽性率	陽性数/検査数	陽性率
0～4	6 / 8	75.0%	5 / 28	17.9%	2 / 5	40.0%	13 / 41	31.7%
0～2	1 / 2	50.0%	4 / 25	16.0%	1 / 4	25.0%	6 / 31	19.4%
3	2 / 3	66.7%	1 / 2	50.0%	1 / 1	100.0%	4 / 6	66.7%
4	3 / 3	100.0%	0 / 1	0%	0 / 0		3 / 4	75.0%
5～9	16 / 16	100.0%	0 / 0		0 / 0		16 / 16	100.0%
10～14	25 / 25	100.0%	0 / 0		0 / 0		25 / 25	100.0%
15～19	15 / 15	100.0%	0 / 0		0 / 0		15 / 15	100.0%
20～29	10 / 10	100.0%	1 / 2	50.0%	28 / 31	90.3%	39 / 43	90.7%
30～39	2 / 3	66.7%	0 / 0		19 / 20	95.0%	21 / 23	91.3%
40～49	8 / 8	100.0%	0 / 0		20 / 26	76.9%	28 / 34	82.4%
50～59	3 / 8	37.5%	0 / 0		5 / 13	38.5%	8 / 21	38.1%
60～	1 / 1	100.0%	2 / 3	66.7%	5 / 19	26.3%	8 / 23	34.8%
計	86 / 94	91.5%	8 / 33	24.2%	79 / 114	69.3%	173 / 241	71.8%

群別に見ると、5～49歳では80%以上と高い抗体保有率を示した。これに対し、0～4歳では31.7%、50～59歳では38.1%、60歳以上では34.8%と低い保有率を示す年齢群が存在した。この0～4歳の年齢群と40歳以上の年齢群で抗体保有率が低くなる傾向は、近年の富山県の結果[1-5]（図2）や全国の結果[6]とほぼ同様であった。

0～4歳の乳幼児における抗体保有率が低い原因は、0～4歳の年齢群においてワクチン未接種者の割合が多いことが原因としてあげられる。日本脳炎ワクチンの標準的な接種年齢は3歳で2回（第1期）、4歳で1回（第1期追加）、9歳で1回追加（第2期）の計4回である[7]。図3に年齢群別のワクチン接種歴を、表1に年齢群別およびワクチン接種歴別の抗体保有率を示す。今回調査の0～4歳の年齢群におけるワクチン未接種者の割合は77.8%（28 / 36）であった（図3、表1）。ま

た、0～4歳の年齢群では、「ワクチン接種歴なし」の抗体保有率は17.9%（5 / 28）であり、「ワクチン接種歴あり」の抗体保有率は75.0%（6 / 8）であった（表1）。このことから、0～4歳の年齢群においては、ワクチン未接種者がこの年齢群の抗体保有率を引き下げているといえる。

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

年齢群別およびワクチン接種歴別の抗体保有率（表1）を見ると、「接種歴なし」の中に抗体陽性者が8名（24.2%）存在した。いずれも「罹患歴なし」であり、不顕性感染していた可能性がある。

富山県では1997年を最後に日本脳炎患者は発生していないが[8]、全国においては、日本脳炎ワクチン未接種の小児や高齢者からの患者発生が報告されている[6, 7]。特に、2020年には隣県の石川県においても患者が発生している[9]。また、豚の抗体保有調査やウイルス分離調査において、近年も県内に日本脳炎ウイルスが存在していることが確認されている[8, 10-13]。これらのことから、県内においても日本脳炎ウイルスに感染するリスクがあると推定されるため、日本脳炎の感染予防対策は継続して実施していかなければならない。したがって、引き続き感受性調査を実施し、日本脳炎ウイルスに対する抗体を保有していない者がどのくらい存在するのか把握する必要がある。

今回の調査では、例年と同様、県内においても0～4歳の小児や高齢者における抗体保有率が低

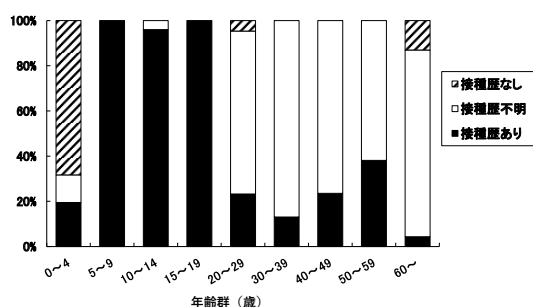


図 3. 年齢群別のワクチン接種歴 (2023 年度)

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71.8%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、不顕性感染とみられる「接種歴なし」の抗体保有者も認められた。富山県では1997年を最後に日本脳炎患者は発生していないものの[8]、近年においても県内に日本脳炎ウイルスが存在していることが確認されている[8, 10-13]。

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

謝 辞

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

文 献

1. 名古屋真弓, 畠田嵩久, 板持雅恵, 他. (2019). 富山衛研年報, 42, 84-86
2. 畠田嵩久, 長谷川澄代, 佐賀由美子, 他. (2020). 富山衛研年報, 43, 88-90
3. 畠田嵩久, 佐賀由美子, 五十嵐笑子, 他. (2021). 富山衛研年報, 44, 70-72
4. 矢澤俊輔, 長谷川澄代, 佐賀由美子, 他. (2022). 富山衛研年報, 45, 64-66
5. 矢澤俊輔, 畠田嵩久, 佐賀由美子, 他. (2023). 富山衛研年報, 46, 58-60
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(2023). 令和3年度感染症流行予測調査報告書, 108-132
7. 国立感染症研究所(2017). 病原微生物検出情報, 38, 151-152
8. Obara M, Yamauchi T, Watanabe M, et al. (2011). Am. J. Trop. Med. Hyg., 84, 695-708
9. 国立感染症研究所. 感染症発生動向調査週報(IDWR) <https://www.niid.go.jp/niid/ja/idwr-dl/2020.html> (2024年9月17日アクセス可能)
10. 佐賀由美子, 名古屋真弓, 稲崎倫子, 他. (2016). 富山衛研年報, 39, 69-75
11. 佐賀由美子, 稲崎倫子, 青柳由美子, 他. (2017). 富山衛研年報, 40, 77-83
12. 佐賀由美子, 稲崎倫子, 青柳由美子, 他. (2018). 富山衛研年報, 41, 68-74
13. 佐賀由美子, 畠田嵩久, 長谷川澄代, 他. (2021). 富山衛研年報, 44, 66-69

新型コロナウイルス感染症流行予測調査における感受性調査(2023年度)

佐賀由美子 川上 利恵 板持 雅恵 矢澤 俊輔
 高田 嵩久 福山 圭 高林小百合¹ 吉浦 祐舞²
 五十田瀬奈³ 高田 真衣⁴ 仲井 杏子⁵ 松田 千穂⁶
 谷 英樹

Serological Investigation of COVID-19 in Toyama Prefecture
 in the Fiscal Year 2023

Yumiko SAGA, Rie KAWAKAMI, Masae ITAMOCHI, Shunsuke YAZAWA,
 Takahisa SHIMADA, Kei FUKUYAMA, Sayuri TAKABAYASHI, Yui YOSHIURA,
 Sena IKADA, Mai TAKATA, Kyoko NAKAI, Chiho MATSUDA,
 and Hideki TANI

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

調査および検査方法：2023年7月から9月に、県内住民0～91歳の合計241名について採血と予防接種歴、罹患歴の調査を行った。

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

結果および考察：SARS-CoV-2に対する抗体保有率は85%（205 / 241）であり、2022年度[2]の

79%（178 / 225）から上昇した。図1に年齢群別および抗体価別の抗体保有率を示した。抗体陽性とされる抗体価5倍以上の抗体保有率を年齢群別に見ると、15歳以上では97%以上と高く、10～14歳では84%と比較的高かったが、0～4歳では46%、5～9歳では50%と低かった（図1、表1）。

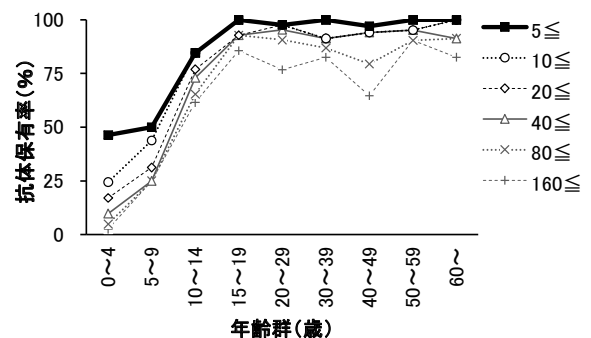


図1. 年齢群別および抗体価別の中和抗体保有率 (2023年度)

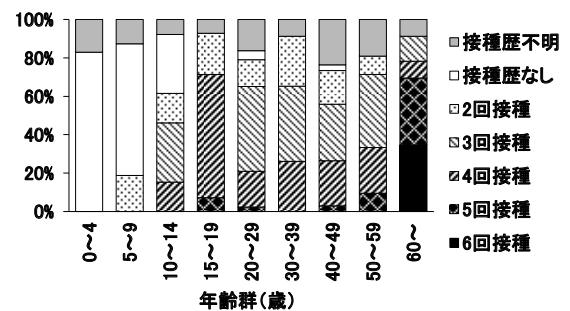


図2. 年齢群別のワクチン接種歴 (2023年度)

1. 新川厚生センター、2. 中部厚生センター、3. 高岡厚生センター、4. 砺波厚生センター、5. 富山市保健所、
 6. 富山県厚生部感染症対策課

表 1. 年齢群別、ワクチン接種歴別および罹患歴別の抗体保有状況

接種歴	罹患歴	年齢群別の抗体保有者数／検査対象者数										抗体保有率
		0～4	5～9	10～14	15～19	20～29	30～39	40～49	50～59	60～	合計	
なし	なし	5 / 20	0 / 3	1 / 2	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	6 / 25	24%
	あり	9 / 12	4 / 8	4 / 6	0 / 0	1 / 2	0 / 0	0 / 1	0 / 0	0 / 0	18 / 29	62%
	不明	1 / 2	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	1 / 2	50%
	小計	15 / 34	4 / 11	5 / 8	0 / 0	1 / 2	0 / 0	0 / 1	0 / 0	0 / 0	25 / 56	45%
あり (2回以上)	なし	0 / 0	1 / 1	8 / 8	3 / 3	18 / 18	9 / 9	13 / 13	6 / 6	15 / 15	73 / 73	100%
	あり	0 / 0	2 / 2	5 / 5	9 / 9	9 / 9	8 / 8	7 / 7	6 / 6	1 / 1	47 / 47	100%
	不明	0 / 0	0 / 0	3 / 3	1 / 1	7 / 7	4 / 4	5 / 5	5 / 5	5 / 5	30 / 30	100%
	小計	0 / 0	3 / 3	16 / 16	13 / 13	34 / 34	21 / 21	25 / 25	17 / 17	21 / 21	150 / 150	100%
不明	なし	0 / 1	1 / 1	0 / 0	1 / 1	3 / 3	1 / 1	4 / 4	2 / 2	1 / 1	13 / 14	93%
	あり	2 / 2	0 / 1	0 / 0	0 / 0	4 / 4	0 / 0	1 / 1	0 / 0	0 / 0	7 / 8	88%
	不明	2 / 4	0 / 0	1 / 2	0 / 0	0 / 0	1 / 1	3 / 3	2 / 2	1 / 1	10 / 13	77%
	小計	4 / 7	1 / 2	1 / 2	1 / 1	7 / 7	2 / 2	8 / 8	4 / 4	2 / 2	30 / 35	86%
合計	なし	5 / 21	2 / 5	9 / 10	4 / 4	21 / 21	10 / 10	17 / 17	8 / 8	16 / 16	92 / 112	82%
	あり	11 / 14	6 / 11	9 / 11	9 / 9	14 / 15	8 / 8	8 / 9	6 / 6	1 / 1	72 / 84	86%
	不明	3 / 6	0 / 0	4 / 5	1 / 1	7 / 7	5 / 5	8 / 8	7 / 7	6 / 6	41 / 45	91%
	小計	19 / 41	8 / 16	22 / 26	14 / 14	42 / 43	23 / 23	33 / 34	21 / 21	23 / 23	205 / 241	85%
抗体保有率		46%	50%	85%	100%	98%	100%	97%	100%	100%	85%	
接種率*1		0%	21%	67%	100%	94%	100%	96%	100%	100%	73%	
罹患率*2		40%	69%	52%	69%	42%	44%	35%	43%	6%	43%	

*1：接種率は接種歴不明の者を除いて算出 *2：罹患率は罹患歴不明の者を除いて算出

年齢群別のワクチン接種率（接種歴不明を除いて算出）は、0～4歳が0%、5～9歳が21%、10～14歳が67%と低いのに対し、15歳以上では94%以上と高かった（図2、表1）。14歳以下で抗体保有率が低くなるのは、ワクチン未接種者の割合が多いことが原因であると考えられた。

一方で、ワクチン未接種者の割合が多い14歳以下の年齢群の抗体保有率（抗体価5倍以上）は、昨年度と比べて上昇した（図3）。2023年度の接種歴の調査では、接種回数は2022年度調査[2]より増加したものの、接種率（接種歴不明を除いて

算出）は73%（150 / 206）と、2022年度の73%（157 / 214）から横ばいであった。それに対し、2023年度の罹患率（罹患歴不明を除いて算出）は43%（84 / 196）と、2022年度の13%（22 / 176）から顕著に増加した。したがって、今年度の抗体保有率が昨年度よりも上昇したのは、罹患率の上昇が影響したからであると考えられた。

ワクチン接種歴別および罹患歴別の抗体保有率（表1）を見ると、「2回以上接種済み」の場合は罹患歴の有無に関わらず100%（150 / 150）であったが、「接種歴なし・罹患歴あり」の場合は62%（18 / 29）にとどまった。一方で、「接種歴なし・罹患歴なし」の抗体保有者も24%（6 / 25）存在し、不顕性感染により抗体を獲得した者も一定数存在すると考えられた。

図4に、2023年度のワクチン接種歴別および罹患歴別の抗体価を示した。40倍以上の比較的高い抗体価を持つ者の割合は、「3回以上接種」または「2回接種・罹患歴あり」の場合には98%以上であったのに対し、「2回接種・罹患歴なし」では42%にとどまった。ただし、2022年度の調査では、「2回接種・罹患歴なし」で40倍以上の抗

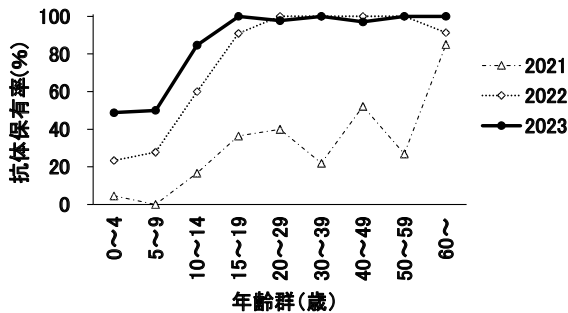


図 3. 年齢群別の抗体保有率（2021～2023年度）

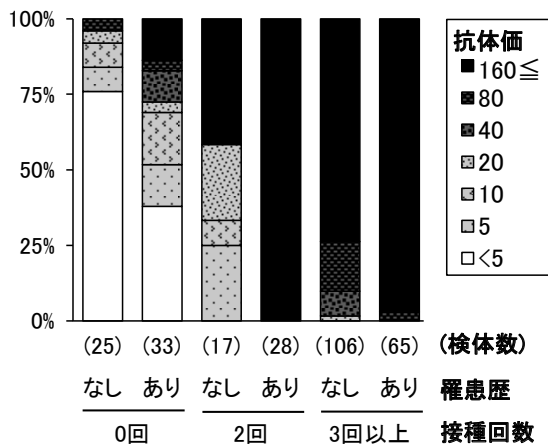


図4. ワクチン接種歴別および罹患歴別の抗体価 (2023年度)

抗体価を持つ者の割合は97%であった。前述のとおり、2023年度のワクチン接種率は2022年度から横ばいであったことから、2023年度調査で「2回接種済み」と回答した者の大半は接種を受けてから1年以上経過していた可能性が高い。これらのことから、2回接種後、追加免疫されることなく時間が経過すると抗体価は低下することが示唆された。したがって、高齢者など重症化リスクの高い者は、定期的にワクチンを接種することが望まれる。

SARS-CoV-2に対するワクチンは、国内では2021年2月から予防接種法の特例臨時接種として全額公費負担による接種が開始された。ただし、接種が開始された2021年は、最初は医療従事者から、次いで4月以降は重症化リスクの高い65歳以上の高齢者に対するワクチン接種を先行して行った後、順次接種対象を拡大していった。そのため、2021年の富山県の調査では、59歳以下の年齢群ではワクチン未接種者の割合が高く、15～59歳の抗体保有率も22～52%と低かった（図3）[3]。一方、2022年以降の調査では、15歳以上の年齢群でワクチン未接種者の割合が少なくなり、抗体保有率も91～100%と高かった（図3）[2]。それに対し、過去3年間の調査において、14歳以下、特に9歳以下の年齢群ではワクチン未接種者の割合が多く、抗体保有率が低い傾向は一致していた（図3）[2, 3]。したがって、これらの集団は新型コロナウイルスに感染するリスクが高いため、注意喚起が必要である。

なお、新型コロナワクチンの標準的な接種年齢は、接種が開始された当初は16歳以上であり、

2021年8月に12歳以上、2022年5月に5歳以上、2022年10月に生後6か月以上と、順次引き下げられた[4]。

さらに、当初は、祖先株を対象としたワクチンが接種されていたが、流行株の変遷に伴い、2022年9月からOmicron株BA.1系統を、2022年10月からOmicron株BA.4/5系統を、2023年9月からOmicron株XBB.1.5系統を対象としたワクチンの接種が開始された[4]。なお、本調査において中和抗体価の測定に用いたSARS-CoV-2は、過去3年間とも祖先株のみであり、ワクチン株別の比較解析は行っていない。ワクチン株の変更を受け、来年度以降の測定に用いるSARS-CoV-2をOmicron株に変更することが国立感染症研究所で検討されている。

なお、ワクチン接種可能な全年齢の接種費用を全額公費で負担する特例臨時接種は2024年3月で終了し、2024年4月以降は、改正された予防接種法で定期接種対象者が「65歳以上」および「60～64歳で重症化リスクの高い者」と定められ、接種費用も原則有料となった[5]。

今後、流行株やワクチン接種状況が変化していくとともに、集団免疫の状態も変化していくことが予想される。したがって、今後も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：今回の調査では、県民の抗体保有率は85%であった。また、ワクチン接種率が高い15歳以上では抗体保有率が高いことが確認された。一方で、ワクチン接種が進んでいない年齢群で抗体保有率が低くなる傾向は昨年度と同様だが、昨年の調査よりも罹患率が上昇したことを受け、14歳以下の抗体保有率は昨年度よりも上昇した。SARS-CoV-2に感染するリスクの高い抗体保有率の低い年代や重症化しやすい年代に対して、引き続き注意喚起が必要である。

謝 辞

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

文 献

1. 厚生労働省健康局結核感染症課, 国立感染症研究所流行予測調査事業委員会. 令和3年度

- 感染症流行予測調査事業検査術式, 60-67
2. 佐賀由美子, 板持雅恵, 稲崎倫子, 他.
(2023). 富山衛研年報, 46, 61-63
 3. 佐賀由美子, 五十嵐笑子, 板持雅恵, 他.
(2022). 富山衛研年報, 45, 67-69
 4. 厚生労働省. 新型コロナワクチンに関する自治体向け通知・事務連絡等【令和6年3月31日まで】. https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/vaccine_notifications.html (2024年5月30日アクセス可能)
 5. 厚生労働省. 新型コロナワクチンについて. https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/vaccine_00184.html (2024年5月30日アクセス可能)

COVID-19流行期の下水流入水SARS-CoV-2調査

板持 雅恵 川上 利恵 矢澤 俊輔 嵩田 嵩久
佐賀由美子 福山 圭 谷 英樹

Environmental Surveillance for SARS-CoV-2 in Raw Sewage during Pandemic Period of COVID-19

Masae ITAMOCHI, Rie KAWAKAMI, Shunsuke YAZAWA, Takahisa SHIMADA,
Yumiko SAGA, Kei FUKUYAMA, and Hideki TANI

下水流入水中のウイルスは、地域住民由来のウイルスの性状や流行状況を反映することが知られている。ポリオウイルスについては、世界のポリオ根絶にむけて、不顕性感染を含むウイルスの動向を監視する目的で、WHOのポリオ根絶計画のもとで環境サーベイランスが実施されており、我が国においても、厚生労働省感染症流行予測調査事業の一環として全国の自治体で調査が実施されている[1, 2]。2019年から世界的に流行している新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）は、呼吸器のみならず、腸管へも感染し、糞便中にもウイルスが排出されることから[3-4]、下水流入水からの検出状況を地域や施設におけるウイルス流行の把握や予測に活用することが試みられている[5-9]。富山県衛生研究所においても、新型コロナウイルス感染症（COVID-19）の流行下において下水流入水のSARS-CoV-2調査を実施し、地域におけるウイルス流行状況との関連を解析した。また、検査方法の効率化のため、下水流入水からのSARS-CoV-2検出方法、および下水流入水中のSARS-CoV-2の安定性について検証を行ったので、あわせて報告する。

材料と方法：

（1）調査期間および調査地点

下水流入水からのウイルス調査では、富山県内の1下水処理場において、2020年から2022年8月までは月1回、2022年9月から2024年3月までは週1回下水流入水を採取した。

（2）下水流入水の濃縮

下水流入水中のウイルスは、陰電荷膜法[10]、またはWizard Enviro TNA Kit (Promega)、あるいはRNeasy PowerSoil Total RNA kit (QIAGEN)を用いて濃縮した。

陰電荷膜法による濃縮では、下水流入水1 Lを4℃で3,000 rpm、30分間遠心した上清に、最終濃度0.05 Mとなるように塩化マグネシウムを添加し、0.5 Nの塩酸を用いてpH 3.5に調整した。この液を陰電荷膜（セルロース混合エステルメンブレンフィルター、ADVANTEC）に加圧濾過して吸着させた後、陰電荷膜を細切し、3% ビーフエキストラクト（pH 7.4）10 mLを添加してボルテックスミキサーによりウイルスを溶出した。溶出液を回収し、4℃で10,000 rpm、30分間遠心した。遠心上清を回収し、ポアサイズ0.45 μmのフィルターに濾過して得られた濾液を100倍濃縮下水検体とした。これらの濃縮下水検体からQIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)またはQIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN)を用いてウイルスRNAまたはDNAを抽出した。

市販キットを用いたウイルス遺伝子の濃縮では、40 mLの下水流入水からWizard Enviro TNA Kit (Promega)を用いてウイルス遺伝子を抽出した。または、1 Lの下水流入水の沈査からRNeasy PowerSoil Total RNA kit (QIAGEN)を用いてウイルス遺伝子を抽出した。使用方法はキットの添付文書に従った。

（3）リアルタイムPCR

抽出した下水流入水のRNAサンプルについて、SARS-CoV-2および対照としてトウガラシ微斑ウイルス遺伝子の定量を、SARS-CoV-2 Detection RT-qPCR Kit for Wastewater (タカラバイオ)を用いてリアルタイムPCR法により実施した。

（4）温度と凍結融解回数別の下水流入水中ウイルス量の比較

SARS-CoV-2およびトウガラシ微斑ウイルス遺伝子量既知の下水流入水を40 mLずつ分注し、-20℃、4℃、28℃で1週間、2週間、4週間保

存した。また、 -20°C での凍結と水浴での融解を、凍結1週間、2週間、4週間後に繰り返し、それぞれ計1～3回の凍結融解を行った。Wizard Enviro TNA Kit (Promega) を用いてRNAを抽出し、SARS-CoV-2およびトウガラシ微斑ウイルス遺伝子量をリアルタイムPCRにより定量した。定量値は3回の実験の値を平均した。

(5) COVID-19 患者報告数

下水処理場流域の新規COVID-19患者報告数は、富山県健康対策室および富山県感染症情報センターにおける公表数[11, 12]を集計した。

(6) 統計解析

COVID-19患者数、対数変換した下水流入水中のウイルス遺伝子量について、危険率5%未満を有意とし、SPSS Statistics 27.0 (IBM) を用いて検定を行った。濃縮方法別のウイルス遺伝子量の

比較には、Friedmanの順位付けによる変数の双方向分析、保存条件別のウイルス遺伝子量の比較には、Kruskal-Wallis検定を用いた。COVID-19患者数と、下水流入水中のウイルス遺伝子量との相関はSpearmanの相関係数を用いた。

結果：

(1) 濃縮方法別の下水中ウイルス量

図1に2022年2月から2023年3月の下水流入水を対象とした、濃縮方法別のSARS-CoV-2およびトウガラシ微斑ウイルス遺伝子量を示す。

陰電荷膜法、RNeasy PowerSoil Total RNA kit、およびWizard Enviro TNA Kitにより濃縮、抽出されたSARS-CoV-2遺伝子量の平均値は、それぞれ、 2.2×10^2 copies/L ($0 \sim 9.1 \times 10^3$ copies/L)、 1.9×10^2 copies/L ($0 \sim 7.1 \times 10^3$ copies/L)、

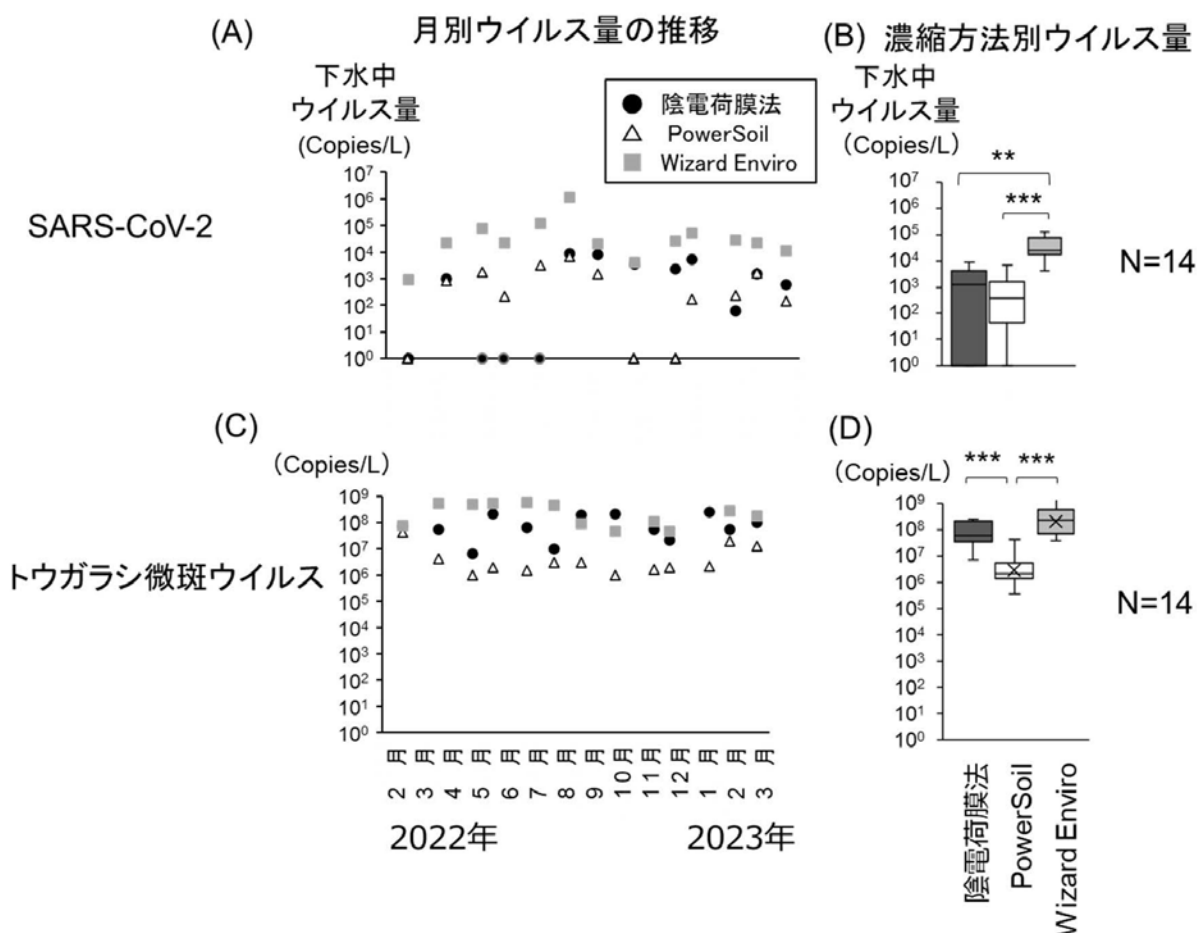


図1. 濃縮方法別の下水流入水中ウイルス量 (2022年2月～2023年3月)

下水中の月別SARS-CoV-2 (A)、濃縮方法別SARS-CoV-2 (B)、月別トウガラシ微斑ウイルス (C)、濃縮方法別トウガラシ微斑ウイルス (D)の遺伝子量をリアルタイムPCRにより定量した。***, $p < 0.001$, **, $p < 0.01$, Friedmanの順位付けによる変数の双方向分析

2.9×10^4 copies/L ($9.0 \times 10^2 \sim 1.2 \times 10^6$ copies/L) であり, Wizard Enviro TNA Kit により検出された SARS-CoV-2 遺伝子量が有意に多かった (図 1A, 1B)。

下水流入水中のトウガラシ微斑ウイルス遺伝子量の平均値は, 陰電荷膜法, RNeasy PowerSoil Total RNA kit, および Wizard Enviro TNA Kit では, それぞれ, 6.3×10^7 copies/L ($6.8 \times 10^6 \sim 2.6 \times 10^8$ copies/L), 2.9×10^6 copies/L ($3.5 \times 10^5 \sim 4.4 \times 10^7$ copies/L), 2.1×10^8 copies/L ($3.9 \times 10^7 \sim 1.4 \times 10^9$ copies/L) であり, 陰電化膜法および Wizard Enviro TNA Kit による検出の方が多かった (図 1C, 1D)。

(2) 温度と凍結融解回数別の下水流入水中ウイルス量の比較

図 2 に温度と凍結融解回数別の下水流入水中

SARS-CoV-2 およびトウガラシ微斑ウイルス遺伝子量を示す。

下水流入水中の SARS-CoV-2 遺伝子量の平均値は, 保存開始時 2.0×10^4 copies/L が, 28°C での保存では 1 週間で 7.6 copies/L と千分の一以下に減少したが, 4°C での保存では 1 週間で 1.4×10^4 copies/L に半減, 2 週間で 4.0×10^3 copies/L, 4 週間で 2.1×10^3 copies/L に減少した。 -20°C での保存では, 1 週間, 2 週間, および 4 週間の保存でそれぞれ 2.3×10^3 copies/L, 1.4×10^3 copies/L, および 1.7×10^3 copies/L であり, いずれも保存開始時から $1 \log_{10}$ 減少した量で推移した (図 2A)。一方, トウガラシ微斑ウイルスでは, 28°C , 4°C , および -20°C での保存 1 週間, 2 週間, 4 週間後でウイルス遺伝子量の減少はみられなかった (保存温度別のウイルス遺伝子量の比較, 保存期

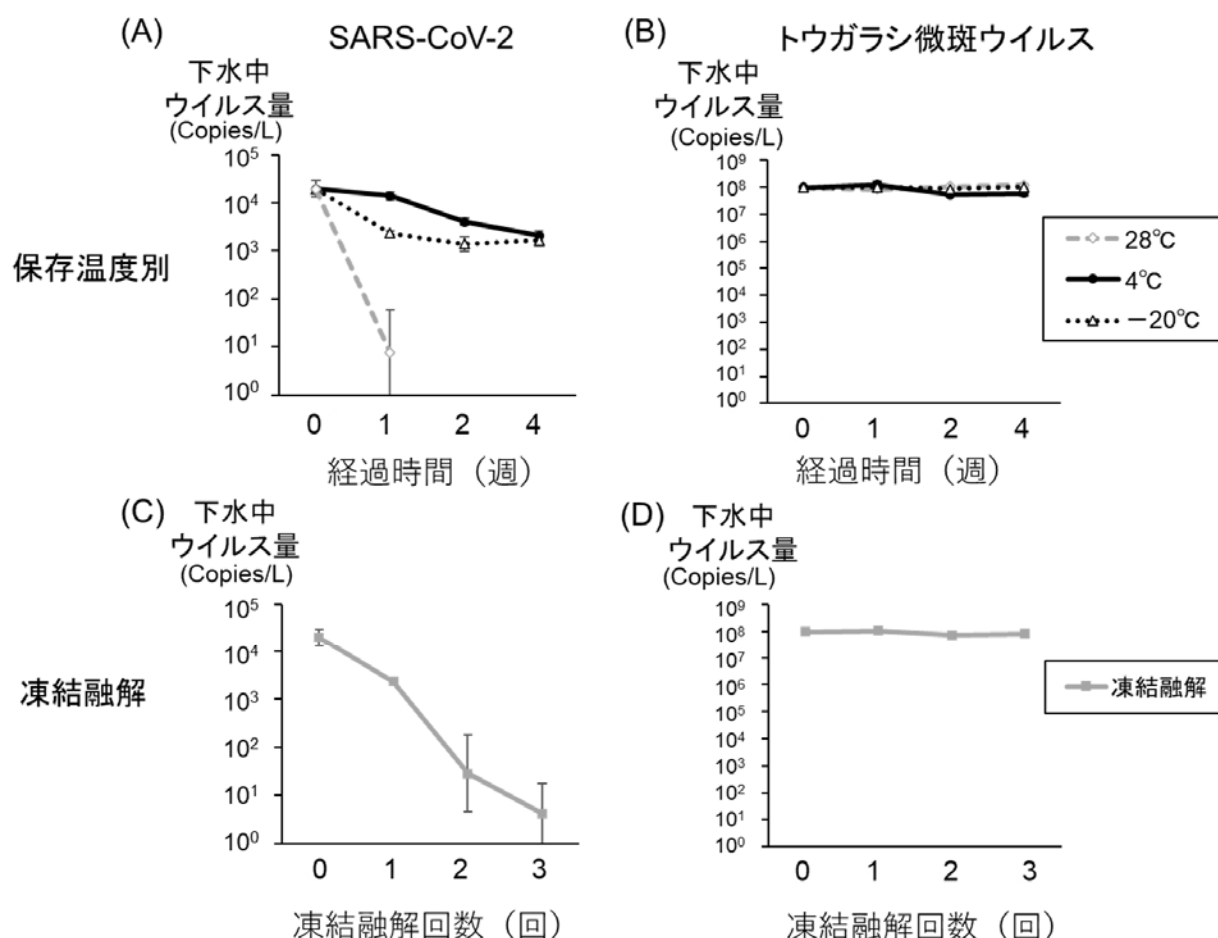


図 2. 温度と凍結融解回数別の下水流入水中ウイルス量

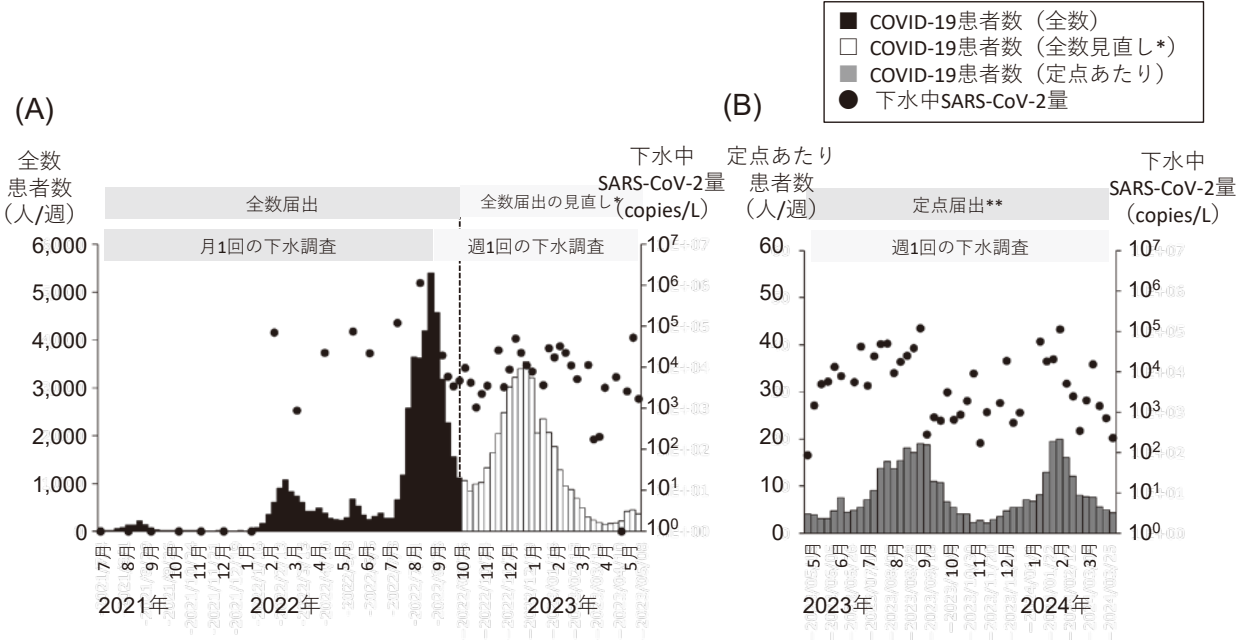
A : 28°C , 4°C , -20°C で 1, 2, 4 週間保存した場合の下水流入水中の SARS-CoV-2 (A) およびトウガラシ微斑ウイルス (B), -20°C の凍結と水浴による融解を 1 ~ 3 回繰り返した場合の下水流入水中の SARS-CoV-2 (C) およびトウガラシ微斑ウイルス (D) の遺伝子量をリアルタイム PCR 法により定量した。

間別のウイルス遺伝子量の比較, それぞれ Kruskal-Wallis 検定, $p>0.05$, それぞれ $n=3$) (図 2B).

下水流入水を -20°C での凍結融解を, 1 週間 (凍結融解 1 回), 2 週間 (凍結融解 2 回), および 4 週間 (凍結融解 3 回) 後に繰り返すと, SARS-CoV-2 遺伝子量の平均値は, それぞれ 2.3×10^3 copies/L, 2.9×10^1 copies/L, および 4.2 copies/L であり, 凍結融解 1 回ごとに $1 \log_{10}$ ずつ減少した (図 2C). 一方, トウガラシ微斑ウイルスでは, 凍結融解を 1 ~ 3 回繰り返しても, ウイルス遺伝子量の減少はみられなかった (Kruskal-Wallis 検定, $p>0.05$, それぞれ $n=3$) (図 2D).

(3) 富山県の環境サーベイランスにおける SARS-CoV-2 検出状況

図 3 に富山県内 1 下水処理場の下水流入水からの SARS-CoV-2 検出状況と流域の COVID-19 感染者数の推移を示す. 本調査では, 2022 年 1 月までの下水流入水からは SARS-CoV-2 が検出されず, COVID-19 流行のいわゆる第 6 波である, 2022 年 2 月以降の下水流入水から継続的に SARS-CoV-2 が検出された (図 3A, 3B). また, 流域の COVID-19 患者の全数報告数が 144 人/週 (すなわち人口 10 万人あたり新規感染者数が約 72 人/週), または定点あたり報告数が 2 人/週を超えた場合に下水流入水から SARS-CoV-2 が検出された. 調査期間中の下水流入水中の SARS-CoV-2 遺伝子量の平均値は 6.1×10^4 copies/L であり, 最も多かったのは, 2022 年 8 月上旬の 1.2×10^6 copies/L であった.



調査期間	COVID-19 報告方法	下水調査の頻度	下水 SARS-CoV-2 量と COVID-19 報告数との Spearman の相関
2022 年 2 月***~2022 年 8 月 31 日	全数報告	毎月	$R=0.429$, $p=0.337$, $n=7$
2022 年 9 月 1 日~2022 年 9 月 25 日	全数報告	毎週	$R=0.300$, $p=0.624$, $n=5$
2022 年 9 月 26 日~2023 年 5 月 7 日	全数報告の見直し*	毎週	$R=0.465$, $p<0.05$, $n=26$
2023 年 5 月 8 日~2024 年 3 月 31 日	定点報告**	毎週	$R=0.476$, $p<0.01$, $n=43$

図 3. 下水流入水 SARS-CoV-2 量と処理場流域における COVID-19 患者数との推移

富山県内 1 下水処理場における下水流入水中の SARS-CoV-2 遺伝子は, Wizard Enviro TNA Kit により抽出し, リアルタイム PCR により定量した. SARS-CoV-2 の検出下限値は, 200 copies/L であった.
* 全数届出の見直し: 医療機関からの発生届出の対象を 65 歳以上の者, 入院を要する者, 重症化リスクがあり, 新型コロナウイルス感染症治療薬の投与又は新たに酸素投与が必要と医師が判断する者, および妊婦に限られた. その他の軽症者は, 医療機関, 健康フォローアップセンター登録による感染者数の全数把握となった.
** 定点あたり患者数: 下水処理場流域の 20 定点医療機関からの COVID-19 患者報告数の平均.
***2022 年 2 月以降, 当該処理場の下水流入水から SARS-CoV-2 が検出された.

下水流入水中 SARS-CoV-2 遺伝子量と COVID-19 患者数との関連性を図 3C に示す。下水流入水中 SARS-CoV-2 遺伝子量と COVID-19 患者数は、2022 年 2 月～9 月 25 日の調査 (COVID-19 は全数報告、下水調査の頻度は毎月または毎週) では有意な相関はみられなかった。一方、2022 年 9 月 26 日から 2023 年 5 月 7 日の調査 (COVID-19 は全数報告、下水調査の頻度は毎週)、および 2023 年 5 月 8 日から 2024 年 3 月 31 日の調査 (COVID-19 は定点報告、下水調査の頻度は毎週) では、中等度の相関がみられた (Spearman の相関) (図 3C)。

考察：2022 年 2 月から 2023 年 3 月の下水流入水について、濃縮方法別のウイルス遺伝子量を比較したところ、SARS-CoV-2 では Wizard Enviro TNA Kit による検出量が多かった。以前報告した下水流入水サンプルへのウイルス添加実験でも、Wizard Enviro TNA Kit による SARS-CoV-2 の回収率が高く、高感度であることが示されており、本調査の結果と一致する [13]。一方、トウガラシ微斑ウイルスでは Wizard Enviro TNA Kit および陰電荷膜法による検出量は同等であった。ウイルスによって濃縮方法別の検出量に差がみられたのは、SARS-CoV-2 はトウガラシ微斑ウイルスよりも下水流入水中の安定性が低いことや (図 2)、陰電荷膜法では下水を pH3.5 に調整する工程があるため、酸に対する感受性が影響した可能性が推測される [14-16]。

また、下水流入水サンプルの保存条件を検討したところ、 -20°C で 4 週間保存した場合の SARS-CoV-2 遺伝子量は、 -20°C で 1 週間保存した場合とほぼ同等であったため、 -20°C では SARS-CoV-2 遺伝子量の減少は比較的少ないものと考えられた。

一方、凍結融解を繰り返すと、SARS-CoV-2 遺伝子量は、1 回ごとに $1 \log_{10}$ 減少した。 4°C での保存では、SARS-CoV-2 ゲノム量は 4 週間で $1 \log_{10}$ 減少した。これまでの研究により、下水流入水中の SARS-CoV-2 の $1 \log_{10}$ 減少時間は、 4°C 、 15°C 、 25°C 、 37°C それぞれ 27.8 日、20.4 日、12.6 日、8 日と高温ほど速く不活化されること、不活化の機序はウイルス蛋白質の変性が主であることが報告されている [14-16]。本調査結果から、下水流入水のサンプルは、 4°C で速やかに検査に供することが望ましいが、速やかな検査が困難な場合は冷凍し、凍結融解を繰り返さないという基本に従うことが重要と考えられた。

本調査では、流域の COVID-19 患者の全数報告数が 144 人 / 週 (すなわち人口 10 万人あたり新規感染者数が約 72 人 / 週)、または定点あたり患者報告数が 2 人 / 週を超えた場合に、下水流入水から $2 \times 10^2 \sim 1.2 \times 10^6$ copies/L の SARS-CoV-2 が検出された。2022 年 9 月 26 日以降、下水流入水中の SARS-CoV-2 遺伝子量は、感染者数と中等度の相関がみられていることから、地域における COVID-19 流行の目安になることが示された。

SARS-CoV-2 の感染者における糞便中へのウイルス排出量は $3 \log_{10}$ copies/mL から $5 \log_{10}$ copies/mL 程度と少なく [17]、尿中への SARS-CoV-2 の排出量も少ないため [18]、流域の感染者数が一定数を超えないと下水流入水から SARS-CoV-2 が検出されないことが推測される。今後、高感度で簡便なウイルス検出方法を検討し、継続的な調査に適用することで、地域流行の状況をリアルタイムに捉えることが期待できる。

謝 辞

本調査を実施するにあたり、検体採取等にご協力いただいた富山県内下水道処理施設、富山県都市計画課および感染症対策課、その他関係各位に深謝いたします。本研究の一部は、厚生労働行政推進調査事業費補助金 (新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業) 「新型コロナウイルス感染症等の感染症サーベイランス体制の抜本的拡充に向けた人材育成と感染症疫学的手法の開発研究」 (代表：鈴木基) (課題番号：20HA2007) および厚生労働科学研究費補助金指定研究 (新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業) 「環境水に含まれる新型コロナウイルス等病原体ゲノム情報の活用に関する研究」 (代表：吉田弘) (課題番号：23HA2015) の助成を得て実施した。

文 献

1. WHO. Guidelines for environmental surveillance of poliovirus circulation 2003. http://polioeradication.org/wp-content/uploads/2016/07/WHO_V-B_03.03_eng.pdf. (2024 年 5 月 30 日アクセス可能)
2. 国立感染症研究所. ポリオ 2023 年現在. (IASR Vol. 44 p113-114: 2023 年)
3. Lamers M M, Beumer J, van der Vaart J, et al. (2020). Science, 369, 50-54

4. Xiao F, Sun J, Xu Y, et al. (2020). *Emerg Infect Dis*, 26, 1920–1922
5. Tanimoto Y, Ito E, Miyamoto S, et al. (2022). *Front Microbiol*, 13, 892447
6. Tiwari A, Lipponen A, Hokajärvi AM, et al. (2022). *Water Res*, 215, 118220.
7. Sharif S, Ikram A, Khurshid A, et al. (2021). *PLoS One*, 16: e0249568
8. Kitajima M, Murakami M, Kadoya SS, et al. (2022). *JAMA New Open*, 5, e2226822
9. 坂恭平, 北川和真, 藤沼裕希, 他. (2023) *IASR*, 44, 103–105
10. 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
11. 富山県健康対策室. 新型コロナウイルス感染症に関する情報. 2024. <https://www.pref.toyama.jp/120507/kurashi/kenkou/kenkou/covid-19/kj00021798.html> (2024 年 5 月 30 日アクセス可能)
12. 富山県感染症情報センター. 新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) 2024. <https://www.pref.toyama.jp/1279/kansen/topics/covid19/index.html> (2024 年 5 月 30 日アクセス可能)
13. 板持雅恵, 稲崎倫子, 佐賀由美子, 他. (2022). *臨床とウイルス*, 50, 177–182
14. Atoui A, Cordevant C, Chesnot T, et al. (2023). *Sci Total Environ*, 881, 163453
15. Xiling G, Yin C, Ling W, et al. (2020). *J Hosp Infect*, 106, 226–231
16. Chan KH, Sridhar S, Zhang RR, et al. (2021). *Front Microbiol*, 12, 667956
17. Cheung KS, Hung IFN, Chan PPY, et al. (2020). *Gastroenterology*, 159, 81–95
18. Sun J, Zhu A, Li H, et al. (2020). *Emerg Microbes Infect*, 9, 991–993

富山県の小児科医療機関における感染性胃腸炎ウイルス検出状況 (2023年度)

高田 嵩久¹ 早川 倫子² 村上美也子¹ 新谷 尚久²
 上勢敬一郎³ 梅川 悟司⁴ 島田 智恵⁵ 板持 雅恵
 佐賀由美子 矢澤 俊輔 大石 和徳 谷 英樹

Infectious Gastroenteritis Viruses Detected in Pediatric Institutions in Toyama Prefecture in the Fiscal Year 2023

Takahisa SHIMADA, Noriko HAYAKAWA, Miyako MURAKAMI, Naohisa SHINTANI,
 Keiichiro UESE, Satoshi UMEKAWA, Tomoe SHIMADA, Masae ITAMOCHI,
 Yumiko SAGA, Shunsuke YAZAWA, Kazunori OISHI, and Hideki TANI

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

材料と方法：富山県内小児科4医療機関（むらかみ小児科アレルギークリニック、しんたにこどもクリニック、うえせこどもクリニック、ふくみつこども診療所）において、2022年8月から2024年3月までの期間に、医師が感染性胃腸炎と診断した一部の患者を対象に便検体を採取した。また、その際、調査票により患者情報（年齢、性別、検体採取日、臨床症状、発生状況等）についても入手した。その後、富山県衛生研究所にて調査対象となった症例の便検体についてリアルタイムPCRを行い、RVAs・RVCs、NoV GI・GII、SaV、ADV、AstV、AiV、EV、PeVの検出を試みた [4]。RVAsが検出された場合は、VP7遺伝子領域のPCRおよびシーケンスにより型別を行った。患者情報とウイルスの検出状況を紐づけ、疫学情

報および重症度の評価を解析した。重症度については、2010年にFreedmanらに提唱され、国内でも用いられ始めた重症度評価ツールである modified Vesikari score (MVS) を用いた [5]。

結果および考察：感染性胃腸炎患者192症例について検査した。年齢中央値は1.5歳（範囲：0歳－16歳）であり、女児が44%であった。ウイルスは117症例（61%）から検出され、単一感染が102例、二重感染が14例、三重感染が1例であった。検出されたウイルスは多い順に、NoV GII 33例（17%）、ADV 25例（13%）、SaV 23例（12%）、PeV 19例（10%）、AstV 19例（10%）、EV 12例（6%）、RVAs 2例（1%）であり、NoV GI、AiVおよびRVCsは検出されなかった（表1）。

2009年から2013年に国内の医療機関にて行われた2,381例の下痢症患者の便検体を対象とした調査ではRVAsが検出された割合が20%であったが [6]、今回の192症例の感染性胃腸炎患者を対象とした調査ではRVAsが検出された割合は1%と低かった。今回RVAsが検出された2症例の年齢はそれぞれ7歳および8歳であり、両症例ともRVワクチン（ロタリックス）接種済みであった。2症例から検出されたRVAsの遺伝子型はそれぞれG8であり、ワクチン株（G1P[8]）とは異なっていた。国内においてはRVワクチンが、2011年からは任意接種として2020年からは定期接種として導入されている。本研究におけるRVAsの検出割合

1. むらかみ小児科アレルギークリニック、2. しんたにこどもクリニック、3. うえせこどもクリニック
4. ふくみつこども診療所、5. 国立感染症研究所

が、RV ワクチンの任意接種導入前から定期接種導入前の間に行われた前述の研究に比べて大きく減少した所見は、RV ワクチンの定期接種導入の効果と考えられる。また、RVAs が検出された年長児 2 例はワクチン接種後 7 年以上が経過しており、ワクチン効果の減弱に伴うブレイクスルー感染と考えられた。

NoV GII については冬季の感染性胃腸炎症例でよく見られた(表 1)。ウイルスが検出された 117 症例のうち、発熱を生じない症例(≤ 37.5℃)は 80 症例(68%)であった。単一のウイルスが検出された 102 例を発生状況別にみると、散発症例が 65 例、家族内発生ありの症例が 11 例、集団発生ありの症例が 24 例、集団発生・家族内発生ありの症例が 2 例であった。集団発生のあった 26 症例の検出ウイルスの内訳は NoV GII (n = 8)、ADV (n = 7)、AstV (n = 5)、SaV (n = 3)、EV (n = 2)、PeV (n = 1) であった。全 192 症例のうち中等症以上の症例は 39 例であり、そのうちウイルスが検出された症例は 30 症例であった。検出ウイルスの内訳は NoV GII (n = 9)、ADV (n = 6)、AstV (n = 4)、PeV (n = 5)、RVAs (n = 2)、EV (n = 2)、SaV および AstV (n = 2)

であった。

本研究によって様々なウイルスによる感染性胃腸炎の集団発生が県内で起こっていること、様々なウイルスの感染により中等症以上の胃腸炎が引き起こされうることが推察された。

文 献

1. Krisztián B, Mary KE, Vito M, et al. (2018). Lancet., 392(10142), 175-186
2. Enrique R, Jesu ´ s LR, (2020). Virol Sin., 35(5), 501-516
3. S C M de Crom, J W A Rossen, A M van Furth, et al. (2016). Eur J Pediatr., 175(8), 1023-1029
4. 稲崎 倫子, 瀧田 嵩久, 五十嵐 笑子, 他. (2023). 富山衛研年報, 46, 70-73
5. Stephen BF, Mohamed E, Marc G, (2010). Pediatrics., 125(6), e1278-1285
6. Thongprachum A, Takanashi S, Kalesaran AFC, et al. (2015). J Med Virol., 87(7), 1141-1148

表 1. 感染性胃腸炎症例からのウイルス検出状況

検体採取月		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
検査症例数		19	19	18	7	7	10	8	23	24	14	22	21	192
ウイルス検出症例数		10	14	16	4	4	7	2	9	13	11	13	14	117
検出ウイルスの内訳*	NoV GII	4	10	10	2	1	1	0	0	1	0	2	2	33
	ADV	2	2	1	2	0	1	1	2	2	1	8	3	25
	SaV	2	1	7	0	2	2	0	2	2	2	2	1	23
	AstV	2	3	1	0	2	3	2	1	0	0	0	5	19
	PeV	1	0	0	0	0	2	0	1	6	7	1	1	19
	EV	0	0	0	0	0	0	0	3	4	3	0	2	12
	RVAs	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2
	NoV GI	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	RVCs	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	AiV	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

* 重複感染例は検出ウイルス毎に計上した。重複感染の内訳は NoV GII + ADV 3 例, NoV GII + SaV 3 例, EV + PeV 2 例, SaV + AstV 2 例, SaV + ADV 1 例, SaV + PeV 1 例, ADV + AstV 1 例, ADV + EV 1 例, SaV + ADV + EV 1 例であった。

感染症媒介蚊の生息状況調査(2023年度)

矢澤 俊輔 佐賀由美子 嵩田 嵩久 川上 利恵
福山 圭 板持 雅恵 谷 英樹

Distribution of Mosquitoes in Toyama Prefecture in the Fiscal Year 2023

Shunsuke YAZAWA, Yumiko SAGA, Takahisa SHIMADA, Rie KAWAKAMI,
Kei FUKUYAMA, Masae ITAMOCHI, and Hideki TANI

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]。2014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、散発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、蚊の発消長を3年ぶりに調査した。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：2023年5～10月に月3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。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。285匹の蚊が捕集され、4属6種（種未同定のイエカ属 *Culex* spp.を含む）に分類された。過去の調査では過半数を占めていたヒトスジシマカは、今年度の捕集割合は26.7%であり、例年と比べて大きく減少した。

太閤山ランドにおける令和5年のヒトスジシマカの発生は5月中旬から10月下旬にかけて観察された。ヒトスジシマカが多数捕集された期間は、9月中旬であった（表2、図2）。

太閤山ランドにおける2017～2020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、2023年の捕集数が多くなる時期は9月中旬であり過去4年（2017年～2020年）と同程度であった。



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

種	捕集数(匹)			捕集割合(%)
	♀	♂	小計	
ヒトスジシマカ	75	1	76	26.7
ヤマトヤブカ	4	0	4	1.4
イエカ類	182	0	182	63.9
キンバラナガハシカ	8	0	8	2.8
オオクロヤブカ	15	0	15	5.3
計	284	1	285	

ピーク時の捕集数は過去4年間と比較して最も少なかった(図2)。

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時期別捕集数

調査時期 月 旬	採集数(匹)		計
	地点1	地点2	
5月 中下	2	1	3
	0	0	0
6月 上中下	0	4	4
	1	0	1
	4	1	5
7月 上中下	0	0	0
	8	0	8
	0	1	1
8月 上中下	0	0	0
	0	0	0
	2	4	6
9月 上中下	2	0	2
	20	7	27
	2	0	2
10月 上中下	4	2	6
	6	2	8
	2	0	2
計	53	22	75

考察：県内におけるヒトスジシマカの2023年の発生は、5月中旬から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蚊媒介ウイルスが持ち込まれる可能性がある。2014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]。2014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られた。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り、そういった場合観光地における調査も考える必要がある。

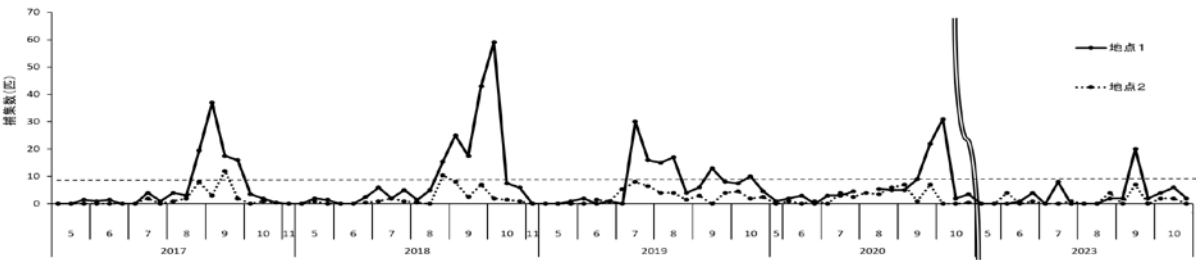


図2. 太閤山ランドにおけるヒトスジシマカ雌成虫の年次別季節消長(平成29～令和2年)

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。

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> (2024年9月17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, 寫田嵩久, 稲崎倫子, 他. (2021). 富山県衛生研究所年報, 44, 80-82
5. 佐賀由美子, 寫田嵩久, 稲崎倫子, 他. (2020). 富山県衛生研究所年報, 43, 101-103
6. 佐賀由美子, 寫田嵩久, 名古屋真弓, 他. (2019). 富山県衛生研究所年報, 42, 107-109
7. 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
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

伴侶動物の重症熱性血小板減少症候群ウイルス感染状況調査(2023年度)

佐賀由美子 矢澤 俊輔 嵩田 嵩久 川上 利恵
板持 雅恵 谷 英樹

Survey of Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Virus Infection in Companion Animals in Toyama Prefecture in the Fiscal Year 2023

Yumiko SAGA, Shunsuke YAZAWA, Takahisa SHIMADA, Rie KAWAKAMI,
Masae ITAMOCHI, and Hideki TANI

重症熱性血小板減少症候群 (SFTS) は、2011年に中国の研究者より報告されたフェニユウイルス科バンダウイルス属に属するSFTSウイルス (SFTSV) によるマダニ媒介性感染症である[1]。国内では2013年に初めて発症者が確認[2]されて以降、西日本を中心に年間50～100症例程度の患者が報告されている。北陸地域では、2015年に石川県で、2017年に福井県でヒトのSFTS症例が報告されている[3]。一方、富山県では、2021年までヒトおよび動物のSFTS症例は報告されていなかったが、2022年5月にイヌの、同年11月にヒトのSFTS症例が初めて確認された[4-6]。SFTSの国内における致死率は27%と高く[7]、流行地域において公衆衛生上重要な問題となっている。

近年、SFTSVに感染したネコやイヌ等の伴侶

動物の咬傷や体液を介してヒトに感染したと推定されるSFTS症例が報告されている[7-11]。このため、ヒトにおけるSFTSV感染リスクを検討する際には、SFTSを発症した伴侶動物を介した感染も考慮する必要がある。

そこで、本県の伴侶動物のSFTSV感染状況を把握することを目的として、県内動物病院を受診した伴侶動物のSFTSV抗体保有状況およびSFTS発生状況について調査した。なお、本年度より、SFTS発生状況調査において検体として全血が提出された場合には、鑑別診断としてリケッチアの検査も併せて実施することにした。その結果、2頭のネコから紅斑熱群リケッチア (Spotted fever group *Rickettsiae*; SFGR) 遺伝子が検出された。この2頭のリケッチア症例の検査所見についても報告する。

(1) 抗原のコーティング

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

↓ 0.05% Tween20 in PBS (PBST) で1回洗浄

(2) ブロッキング

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

↓ PBSTで1回洗浄

(3) 1次抗体 (血清) の反応

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

↓ PBSTで3回洗浄

(4) 標識2次抗体の反応

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

↓ PBSTで3回洗浄

(5) 基質の反応

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

(6) OD値の測定

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

図 1. SFTSV に対するIgG 抗体検出用 ELISA のプロトコル

材料と方法：

1. SFTSV 抗体保有状況調査

2023 年 2 月～2024 年 1 月に県内動物病院 2 施設を受診したイヌ 96 頭およびネコ 25 頭の血清を材料とした (表 1)。SFTSV に対する IgG 抗体検出スクリーニングとして、国立感染症研究所獣医科学部のプロトコルに準じた酵素免疫測定法 (ELISA) を実施した (図 1)。

2. SFTS 発生状況調査

(1) SFTSV 検査

2023 年 5 月～2024 年 1 月に県内動物病院を受診し、SFTS を疑う症状を呈したネコ 7 頭から採取した全血、血清、尿を材料とした (表 2)。リアルタイム RT-PCR 法 [12] により SFTSV 遺伝子検出を行った。間接蛍光抗体法 (IF 法) により SFTSV 特異的 IgG 抗体価および IgM 抗体価の判定を行った。IF 法の抗原は、SFTSV YG-1 株感染 VeroE6 細胞を用い、抗体価 40 倍以上を陽性とした。

(2) リケッチア検査

上記の SFTSV 検査に用いたネコ 7 頭の全血を材料とした (表 2)。リアルタイム RT-PCR 法 [13 - 14] により、SFGR およびつつが虫病リケッチア (*Orientia tsutsugamushi*; Ot) の遺伝子検出を

表 1. SFTSV 抗体保有状況調査において血清を採取した伴侶動物の概要

動物種		イヌ	ネコ	合計
検体数		96	25	121
動物病院 (所在地)	A(高岡市)	79	16	95
	B(射水市)	17	9	26
年齢	0	1	0	1
	1～5	12	13	25
	6～10	28	8	36
	11～	52	4	56
	不明	3	0	3
性別	♀	7	0	7
	♀(避妊)	42	6	48
	♂	15	3	18
	♂(去勢)	32	15	47
	不明	0	1	1
飼育地	氷見市	8	1	9
	高岡市	59	11	70
	射水市	24	8	32
	砺波市	1	3	4
	富山市	3	2	5
	舟橋村	1	0	1
マダニ予防薬	有	37	4	41
	なし	59	20	79
	不明	0	1	1
屋外行動	有	87	15	102
	なし	9	9	18
	不明	0	1	1

表 2. SFTS 発生状況調査において検体を採取した伴侶動物の概要

症例 No.	動物種	年齢	性別	飼育市町村	マダニ予防薬	屋外行動	発症日	検体採取日	検体の種類	備考
1	ネコ	14	♂ (去勢)	滑川市	なし	なし	2023/4/28	2023/5/22	全血	4月上旬に保護猫と数日間の接触あり (保護猫は動物愛護団体に譲渡済)。基礎疾患 (心疾患) あり。2023/5/27に死亡。
								2023/5/26	全血	
2	ネコ	11	不明	滑川市	なし	なし	2023/5/16	2023/5/22	全血	症例1の同居猫
3	ネコ	0	♂ (去勢)	入善町	不明	不明	2023/5/10	2023/5/23	全血	2023年2月に保護団体より入手。過去にマダニの付着有。
4	ネコ	15	♀ (避妊)	射水市	なし	有	2023/6/29	2023/7/2	血漿	ノミの寄生有。頸部腫瘍あり (2023/7/26発見)。2023/8/5に死亡。
								2023/7/4	全血	
								2023/7/4	尿	
5	ネコ	1	♂	高岡市	なし	有	2023/7/9	2023/7/10	全血	ノミの寄生有
6	ネコ	9	♀ (避妊)	高岡市	有	有	2023/9/8	2023/9/11	全血	保護猫。FIV(-), FeLV(-)
7	ネコ	19	♀ (避妊)	射水市	なし	有	不明	2024/1/25	全血	ノミの寄生有。消化管腫瘍あり。2024/1/25に死亡。

行った。リアルタイム RT-PCR 法でSFGR 遺伝子が検出されたネコ 2 頭については、SFGR の 17kDa または *gltA* 領域を対象としたコンベンショナル PCR 法 [14] による遺伝子検出および IF 法による SFGR 特異的 IgG 抗体価および IgM 抗体価の判定も行った。IF 法の抗原は、SFGR の 1 種である *Rickettsia montana* を感染させた L929 細胞を用い、抗体価 40 倍以上を陽性とした。

結果：

1. SFTSV 抗体保有状況調査

イヌ 96 検体およびネコ 25 検体について、SFTSV に対する IgG 抗体検出のスクリーニング検査として ELISA を実施したところ、全て陰性であった。

2. SFTS 発生状況調査

(1) SFTSV 検査

SFTS を疑う症状を呈したネコ 7 頭（表 2）について検査したが、いずれの個体からも SFTSV 遺伝子および SFTSV 特異的抗体は検出されなかった。

(2) リケッチア検査

SFTS を疑う症状を呈したネコ 7 頭全てで検体として全血が提出されたため、鑑別診断として Ot および SFGR の遺伝子検出を行ったところ、Ot 遺伝子は 7 頭とも検出されなかったが、2 頭（症例 No.1 および 7）から SFGR 遺伝子が検出された（表 3）。SFGR 陽性が判明したネコ 2 頭の症例概要および検査所見は下記のとおりである。

① ネコの SFGR 感染症例（症例 No.1）

発症ネコは 14 歳の去勢雄で、2023 年 4 月 28 日に発症（発熱、元気食欲消失、白血球数減少）した。このネコは同居猫 1 頭と共に完全室内飼育されていたが、4 月上旬に保護された野良猫と数日間の接触歴があった。SFTSV 検査のため提出された 5 月 22 日採取の血液について SFTSV・SFGR・Ot を検出するリアルタイム PCR 法を実施したところ、SFGR が検出された（表 3）。なお、SFGR 遺伝子量が少なかったためか、コンベンショナル PCR 法は陰性であった（表 3）。IF 法で SFGR 特異的 IgM 抗体および IgG 抗体が検出された（表 3）。5 月 26 日採取の血液で SFGR の陰性化を確認したが（表 3）、基礎疾患である心疾患の悪化が原因と考えられる循環器障害により、5 月 27 日に死亡した。

② ネコの SFGR 感染症例（症例 No.7）

発症ネコは 19 歳の避妊雌で、屋内外で飼育されていた。2024 年 1 月 25 日に動物病院を受診した際には、脱水、虚脱、意識混濁と極度の消瘦、黄疸が認められた。血液検査では、血小板低下（8.7 万）、CPK 上昇（>1,000）等が認められた。また、エコー検査で小腸内に腫瘍性病変が認められた。このネコの発症日は不明であるが、来院前日までは食餌していたとのことであったが、動物病院で検査中に状態が急変し死亡した。SFTS 疑い症例として、1 月 25 日採取の全血が当所に提出されたため、SFTSV・SFGR・Ot を検出するリアルタイム PCR 法を実施したところ、SFGR が検出された（表 3）。IF 法を実施したが、SFGR 特異的 IgM 抗体および IgG 抗体は検出されな

表 3. ネコ 7 頭の SFGR 検査結果

症例 No.	発症日	検体採取日	検体の種類	リアルタイム PCR 検査結果 (Ct 値)	コンベンショナル PCR 検査結果		IF 抗体価	
					17kDa	<i>gltA</i>	IgM	IgG
1	2023/4/28	2023/5/22	全血	+(39.1)	—	—	80	160
		2023/5/26	全血	—	NT	NT	NT	NT
2	2023/5/16	2023/5/22	全血	—	NT	NT	NT	NT
3	2023/5/10	2023/5/23	全血	—	NT	NT	NT	NT
4	2023/6/29	2023/7/4	全血	—	NT	NT	NT	NT
5	2023/7/9	2023/7/10	全血	—	NT	NT	NT	NT
6	2023/9/8	2023/9/11	全血	—	NT	NT	NT	NT
7	不明	2024/1/25	全血	+(41.7)	NT	NT	<40	<40

＋：陽性，－：陰性，NT：検査未実施

かった (表3)。

考察：抗体保有状況調査においては、過去の調査分と合わせるとイヌ271頭、ネコ83頭について検査したが、SFTSV特異的IgG抗体を保有している動物はみつからなかった。また、今年度の発生状況調査で検査したネコからSFTSVは検出されなかった。しかしながら、2022年に県内でイヌおよびヒトのSFTSV症例が確認されたことから[4-6]、県内にSFTSVを保有するマダニが分布している可能性が考えられる。

今年度から、SFTSVの鑑別診断としてリケッチアの検査も併せて実施するようにしたところ、ネコ2頭のSFGR感染症例が確認された。ただし、ネコからリアルタイムPCR法により検出されたSFGRの遺伝子量は少なく、コンベンショナルPCR法は陰性でシーケンスを実施できなかったため、リケッチア種は特定できなかった。SFGRには多数の種が含まれており、病原性が不明な種も多いこと、ネコ2頭はいずれも基礎疾患（心疾患または消化管腫瘍）を有していたことから、今回検出されたリケッチアがネコの病態に関与していたかどうかは不明であった。なお、症例No.7のネコについては、マダニ刺咬歴は不明だが、屋外でマダニに刺咬されたことにより感染した可能性が推定された。一方、症例No.1のネコは、完全室内飼育であったが発症前に保護猫との接触があったことから、保護猫もしくは保護猫に付着していたマダニが感染原因となった可能性が推定された。

今年度、SFTSVと同じくマダニ媒介性であるSFGRがネコ2頭から検出され、伴侶動物にマダニ媒介性病原体が感染するリスクがあらためて示された。伴侶動物はヒトの生活と密接に関わることから、そのSFTSV感染状況を把握することは、ヒトへのSFTSV感染防止対策を実施する上で重要である。したがって、今後も継続して調査を実施する必要があると考えられた。

また、県内のSFTSV浸淫状況を把握する上で、野生動物のSFTSV保有状況を調査することは意義がある。当所の過去の調査では、2014～2018年に採取したイノシシ129頭の血清からSFTSV抗体や遺伝子は検出されなかった。しかしながら、2019年以降の状況は把握していない。2022年に

イヌおよびヒトのSFTSV症例が確認されたことから[4-6]、今後、野生動物のモニタリングを行うことについても検討する必要があると考えられた。

謝 辞

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

文 献

1. Yu XJ, Liang MF, Zhang SY, et al. (2011). *N Engl J Med*, 364, 1523-1532
2. Takahashi T, Maeda K, Suzuki T, et al. (2014). *J Infect Dis*, 209(6), 816-827
3. 国立感染症研究所．重症熱性血小板減少症候群（SFTS）．<https://www.niid.go.jp/niid/ja/sfts/3143-sfts.html>（2024年5月17日アクセス可能）
4. Saga Y, Yoshida T, Yoshida R, et al. (2023). *Viruses*, 15(11), 2228.
5. 佐賀由美子, 矢澤俊輔, 畠田嵩久, 他. (2022). *IASR*, 43, 218-219
6. 坂東彬人, 村田久仁男, 村井祐至, 他. (2023). *IASR*, 44, 42-43
7. Kobayashi Y, Kato H, Yamagishi T, et al. (2020). *Emerg Infect Dis*, 26(4), 692-699
8. Yamanaka A, Kirino Y, Fujimoto S, et al. (2020). *Emerg Infect Dis*, 26(12), 2994-2998
9. Kida K, Matsuoka Y, Shimoda T, et al. (2019). *Jpn J Infect Dis*, 72, 356-358
10. Oshima H, Okumura H, Maeda K, et al. (2022). *Jpn J Infect Dis*, 75, 423-426
11. 石嶋慧多, 平良雅克, 松嶋 彩, 他. (2023). *IASR*, 44, 31-32
12. Yoshikawa T, Fukushima S, Tani H, et al. (2014). *J Clin Microbiol*, 52, 3325-3333
13. Kawamori F, Shimazu Y, Sato H, et al. (2018). *Jpn J Infect Dis*, 71(4), 267-273
14. 国立感染症研究所．リケッチア感染症診断マニュアル（令和元年度6月版）．<https://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/Rickettsia20190628.pdf>（2024年5月17日アクセス可能）

尿からウイルスが長期間検出および分離された イヌの重症熱性血小板減少症候群症例

佐賀由美子 吉田 俊一¹ 吉田理栄子¹ 矢澤 俊輔
 嵩田 嵩久 早川 倫子 板持 雅恵 山崎 笑子
 大石 和徳 谷 英樹

Long-Term Detection and Isolation of Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome (SFTS) Virus in Dog Urine

Yumiko SAGA, Toshikazu YOSHIDA, Rieko YOSHIDA, Shunsuke YAZAWA,
Takahisa SHIMADA, Noriko HAYAKAWA, Masae ITAMOUCHI, Emiko YAMAZAKI,
Kazunori OISHI, and Hideki TANI

重症熱性血小板減少症候群 (Severe fever with thrombocytopenia syndrome; SFTS) は、2011年に中国の研究者から報告されたマダニ媒介性感染症で[1, 2]、フェニユウイルス科バンダウイルス属に属するダビエ・バンダウイルス (旧称 SFTS ウイルス; SFTSV) を原因とする。これまでに、中国、日本、韓国、ベトナム、台湾から SFTS 症例の報告がある[1-6]。日本では年間 50～130 名程度の患者が発生している[7]。SFTS は、ヒトの致死率が約 30% と非常に高いことから[8, 9]、その流行地域において公衆衛生上、重要な疾患となっている。2024 年 4 月現在、日本では西日本を中心に 47 都道府県中 30 都府県で 963 例の SFTS 患者発生が報告されている[7]。現在、SFTS の検査診断としては主にリアルタイム PCR を含む PCR 検査が利用されている。臨床現場で即時に結果が得られる逆転写ループ媒介等温増幅法 (LAMP 法) やイムノクロマト法の開発も進められているがまだ実践的ではない[10-13]。

近年、SFTSV のヒトへの感染様式として、マダニからの刺咬だけでなく、SFTS を発症したイヌやネコの体液からの接触感染が報告されている[8, 14-16]。

富山県においては、これまで猟犬が SFTSV 抗体を保有していたことは報告されているが[17]、ヒトおよび動物の SFTS 症例は報告されていなかった。今回、2022 年 5 月に県内で飼育されている同居のイヌ 4 頭のうち 2 頭が同時期に SFTS を疑う症状を呈したため検査したところ、SFTSV 感染

が初確認された。2022 年 11 月にはヒトの SFTS 症例も県内で初めて確認された[18]。

SFTSV のイヌ-ヒト感染防止策を講じるためには、どのような体液にどのくらいの期間 SFTSV 排出が認められるか等の情報を得ておくことが求められる。そこで、SFTSV 陽性が判明した 2 頭について経時的に検体を収集し、SFTSV 遺伝子および抗体の消長と SFTSV の感染性について調査した。また、疫学情報の聞き取りにより判明したイヌの推定感染地のマダニ調査を実施した。

材料および方法：

1. 検体採取

イヌ A (去勢雄, 8 歳) については、発症後 6～81 日の期間で血清、尿、口腔拭い液、直腸拭い液を採取した。イヌ B (去勢雄, 14 歳) については、発症後 9～82 日の期間で血清、尿を採取した。また、発症後 5 日目のイヌ A と発症後 9 日目のイヌ B の体表から採取された各 1 個体のマダニも検査材料とした。イヌ A およびイヌ B の同居犬 2 頭 (避妊雌, 10 歳と避妊雌, 8 歳) については、イヌ A の発症後 8 日目時点で血清を採取した。

2022 年 6 月に、イヌ 2 頭の推定感染地である県内西部の低山地の植生上から旗ずり法によりマダニ類を採取した[19]。採取したマダニ類は実体顕微鏡下で分類・計数した。

2. SFTSV 抗体検出

血清中の SFTSV に対する抗体の有無は間接蛍

1. 吉田動物病院

光抗体法 (IF 法) によって評価した. YG-1 株感染 VeroE6 細胞をアセトンで固定した. 次に, 固定細胞を 40–80,000 倍に 2 倍階段希釈した血清と反応させ, 続けて FITC 標識抗イヌ IgM 抗体 (Abcam) もしくは FITC 標識抗イヌ IgG 抗体 (Bio-Rad) で染色した.

3. SFTSV 遺伝子検出

イヌから採取した検体は, QIAamp Viral RNA mini Kit (QIAGEN) を用いて RNA 抽出した. マダニ類は, 成虫は 1 個体ずつ, 若虫は 5 個体までをプールし 1 検体とし, Isogen II (ニッポンジーン) により RNA 抽出を行った. 抽出した RNA を用い, 既報 [20] に軽微な修正を加えリアルタイム RT-PCR 法 (RT-qPCR) により SFTSV の NP 遺伝子の検出を行った. イヌ検体は各 3 ウェル, マダニ検体は各 1 ウェルで測定した. TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix (Applied Biosystems) を使用した. RT-qPCR の反応条件は, 50℃ で 2 分間の逆転写, 95℃ で 20 秒間の不活性化, そして 95℃ で 15 秒間, 60℃ で 1 分間 PCR 反応を 45 サイクルであった.

4. ウイルス分離

臨床検体は, 細胞に接種するまで 4℃ または – 80℃ で保管した. ウイルスの分離および増殖には, American Type Culture Collection (住商ファーマインターナショナル) から入手した VeroE6 細胞を用いた. 24 ウェルプレートに前日播種した VeroE6 細胞に, RT-qPCR で SFTSV 陽性を示した血清, 直腸ぬぐい液, 尿をそれぞれ 25 µL 添加し, 5% CO₂ 下, 37℃ で培養した. 3 ~ 6 日間培養後, 培養上清を回収した. 各上清中のウイルス量を, 前述の RT-qPCR 法を用いてウイルスゲノム RNA 量により測定した [20]. ウイルス分離により得られた感染ウイルスは, 抗 SFTSV 核タンパク質抗体 (AF10; LGC Clinical Diagnostics) と Goat Anti-Mouse IgG H&L (Alexa Fluor 488) (Abcam) を用いた IF 法により確認した. ウイルス分離は, VeroE6 細胞で 3 回継代後, RT-qPCR でウイルスゲノムが検出されなかった場合, 陰性と判断した. ウイルス分離はすべて富山県衛生研究所のバイオセーフティレベル 3 の実験室で行った.

5. SFTSV の遺伝子解析

ゲノム配列解読のため, RT-qPCR で陽性の検体およびイヌ A と B の尿から分離された SFTSV 株から抽出された RNA を用い, RT-PCR 法 [15] により SFTSV の NP 遺伝子の増幅を行った. 塩

基配列の決定は, BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用い, キャピラリー DNA シーケンサー (3500xL Genetic analyzer; Applied Biosystems) を用いて, Sanger 法に基づき, メーカーの指示に従って行った. 配列アライメントは, MEGA 6.06 ソフトウェアプログラム (Kumar et al. MBE 2018) でサポートされている ClustalW ソフトウェアプログラムを用いて行った. 系統解析は, MEGA 6.06 ソフトウェアプログラムを用いて最尤法により行った. 得られた系統樹の統計的有意性は, 1,000 反復のブートストラップ検定によって評価した.

6. 倫理審査

調査の実施に際し, 富山県衛生研究所倫理審査委員会により承認を受け (R2-4, R3-9, R4-5, R5-7), ヘルシンキ宣言に従った. イヌの飼い主には, 本調査への協力について同意を得た.

結果:

1. 疫学情報

富山県は, 日本のほぼ中央部に位置する県であり, これまで SFTS は富山県よりも西の地域で多く発生が見られている (図 1A). しかしながら, 最近, 愛知県や静岡県, 千葉県など日本の中央地域から東地域においても SFTS の初症例が相次いで確認されている (図 1A) [7, 22]. 今回のケースでは, SFTSV 陽性となったイヌ 2 頭は, 他の同居犬 2 頭とともに平野部郊外にある自宅室内および室外 (庭で放し飼い) で飼育されていた. また, イヌの飼育者は県内西部の低山地に私有地を所有しており, イヌは発症 1 週間前と発症直前に低山地 (図 1B) で行動していた. イヌにはマダニ予防薬は投与されておらず, 自宅内ではマダニの付着を認めなかったものの, 低山地で行動した際にはマダニの付着が確認された.

図 2A にイヌ 2 頭の発症前と発症後の疫学情報を時系列で記す. 5 日目のイヌ A の体表から 1 個体のキチマダニ *Hemaphysalis flava* 雌成虫が (図 2B), 9 日目のイヌ B の体表から 1 個体のフタトゲチマダニ *H. longicornis* 雌成虫が採取され (図 2C), これらのマダニからも SFTSV RNA が検出された. なお, これらのマダニは, 吸血の程度が軽度から中程度であったため, 感染源となったマダニではなく, SFTSV 陽性のイヌを吸血したことにより陽性となったと推定された. マダニから検出された SFTSV の遺伝子配列は解読でき

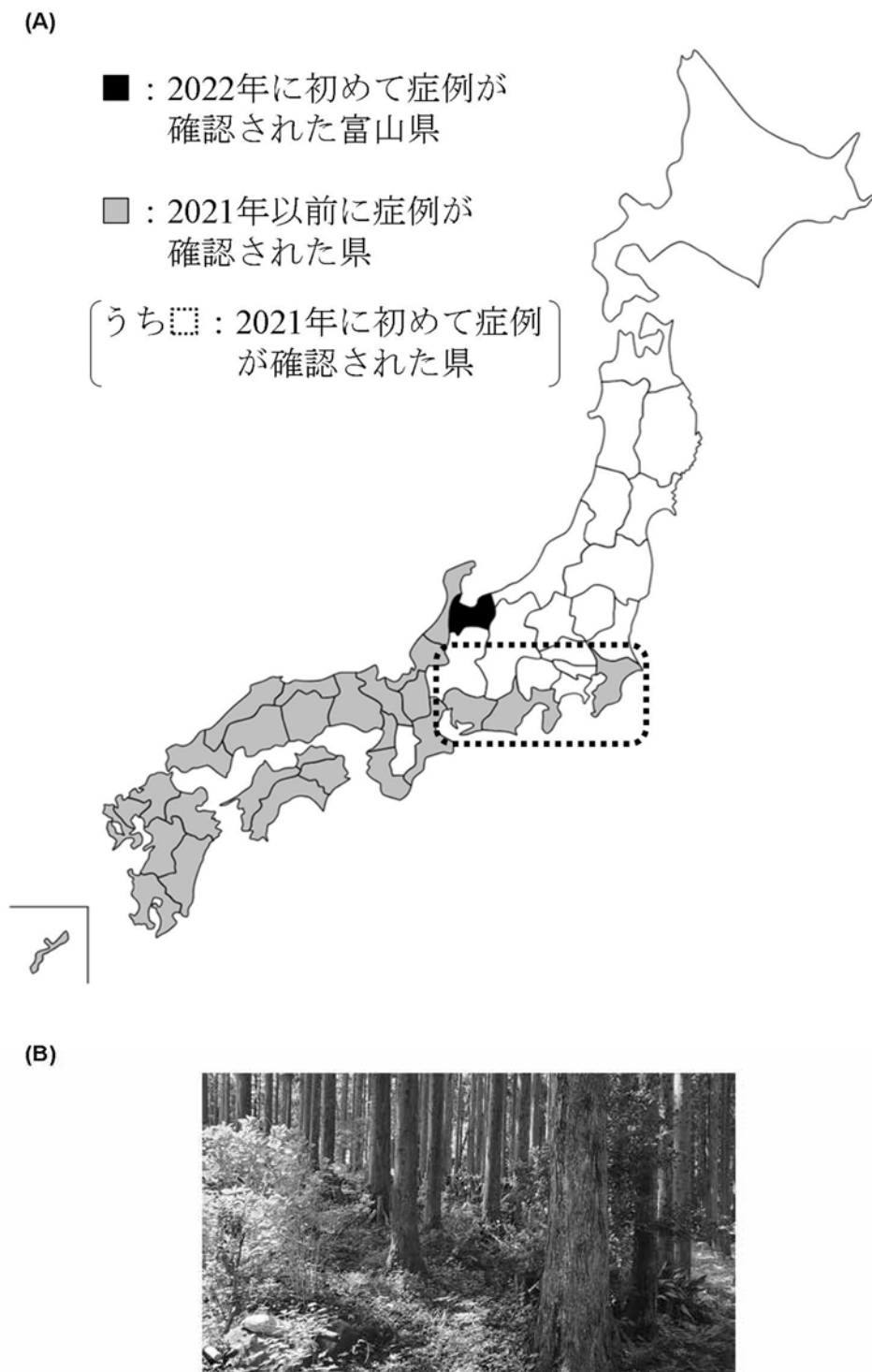
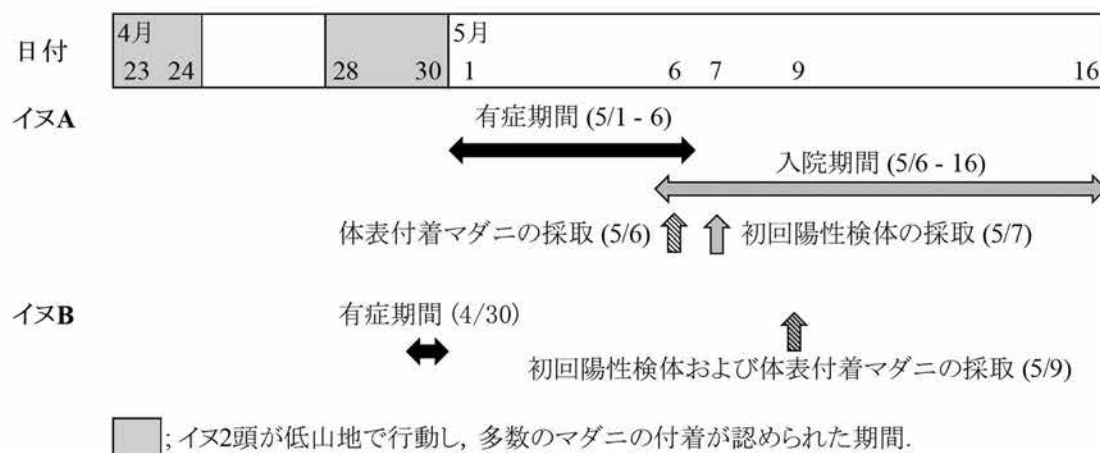


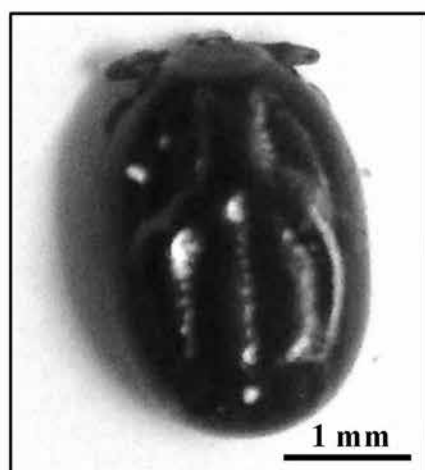
図 1. 地理的疫学情報

(A) 国内のヒト SFTS 症例の推定感染地域. (B) 本研究のイヌ症例の推定感染地.

(A)



(B)



(C)

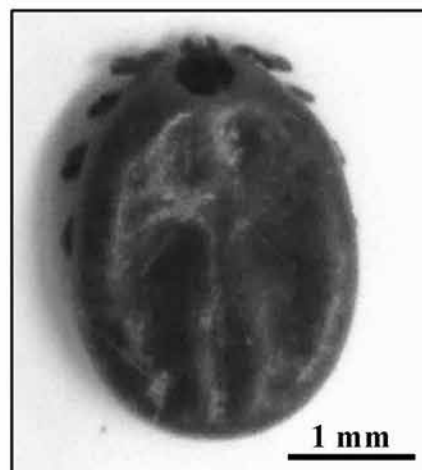


図 2. 本研究の SFTS のイヌ 2 頭の時系列順の疫学情報とマダニの種類

(A) イヌ A とイヌ B の疫学情報の時系列. (B) 発症後 5 日目にイヌ A から採取されたキチマダニ.
(C) 発症後 9 日目にイヌ B から採取されたフトトゲチマダニ.

なかったため、イヌとマダニから分離された SFTSV の遺伝子配列が同一であるか否かは確認できなかった。

SFTSV 陽性が判明したイヌ 2 頭に関わった飼育者や動物病院スタッフで体調不良を呈した者はいなかった。また、同居犬 2 頭も体調不良を示さず、SFTSV 遺伝子および抗体も検出されなかった。

2. 臨床症状および臨床検査所見

表 1 にイヌ A の症状および臨床検査所見を示す。イヌ A は 5 月 1 日 (0 日目) に発熱、嘔吐、元気消失で発症し、1 日目からは食欲不振も認められた。5 日目には皮下出血、粘血便、赤色尿、右眼瞬膜露出が認められ、入院となったが、6 日目には諸症状は消失した。臨床検査値では赤血球

減少、白血球減少および血小板減少、ビリルビン値、肝酵素、CRP 値、CK 値、BUN 値の上昇等が認められた。赤色尿がみられた 5 日目には、CK 値が非常に高かったため、筋肉損傷によるミオグロビン尿が疑われたが、同じ日に尿潜血も観察された。発症後 5 日目に凝固系の検査を行ったところ、プロトロンビン時間は 7.1 秒と正常範囲内であったものの、活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT) は 27.6 秒と延長していた。6 日目には、APTT は 14.3 秒と正常範囲内に戻っていた。臨床検査値がほぼ正常化した第 16 病日に退院した。

イヌ B は、イヌ A の発症前日 (4 月 30 日) に発熱 (39.7℃)、食欲不振、元気消失を認めたものの、症状は 1 日で消失した。臨床検査では、発病

表 1. SFTS のイヌ A の臨床症状および臨床検査所見

臨床症状, 臨床検査所見	正常範囲	発症後日数											
		0	1	2	3	4	5	6	8	9	12	15	
体温 (℃)	38.0-39.0	40.2	40.7	40.5	39.2	38.0	38.1	38.8	38.0	38.0	38.2	38.6	
元気消失		+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	
嘔吐		+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	
食欲不振		-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	
皮下出血		-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	
粘血便		-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	
赤色尿		-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	
瞬膜露出		-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	
RBC (10 ⁴ /μL)	550-850	626	-	-	-	619	630	552	517	466	394	429	
WBC (10 ² /μL)	60-150	36	-	-	-	135	135	89	55	41	126	228	
PLT (10 ⁴ /μL)	20-50	14.4	-	-	-	2.2	2.7	5.1	12.0	7.1	2.5	11.1	
T-Bil (mg/dL)	0.1-0.4	-	-	-	-	12.2	12.8	12.1	1.8	1.5	1.2	0.9	
AST (U/L)	0-52	-	-	-	-	476	293	159	64	51	49	52	
ALP (U/L)	0-120	-	-	-	-	615	635	633	699	-	-	156	
CRP (mg/dL)	≦1.0	-	-	-	-	-	14	9.5	4.2	3.45	2.15	2.05	
CK (IU/L)	100-200	-	-	-	-	-	>2,000	1,811	206	-	-	198	
BUN (mg/dL)	6-31	10	-	-	-	31	35	28	33	28	40	38	

RBC：赤血球数，WBC：白血球数，PLT：血小板数，T-Bil：総ビリルビン，AST：アスパラギン酸トランスアミナーゼ，ALP：アルカリホスファターゼ，CRP：C反応性蛋白，CK：クレアチンキナーゼ，BUN：血中尿素窒素，+：有症状，-：無症状または検査未実施，太字：異常値を示した臨床検査値。

日には血小板減少とCRP上昇が認められたが、9日目には正常化していた。

3. SFTSV 検査所見

イヌ2頭の血清中のSFTSVに対する抗体価をIF法で測定した(図3A)。2頭とも初回採取時点(イヌA:6日目, イヌB:9日目)でIgM抗体とIgG抗体が検出され, この時点で抗体価はピークに達していた。2頭のIgG抗体価はほぼ同等であったが, IgM抗体価はイヌAの方が高かった。

一方, RT-qPCR法で測定したSFTSV遺伝子量は2頭ともほぼ同様に減衰する経過をたどった(図3Bと表2)。血清と直腸スワブでは6~12日目で低コピー数の遺伝子が検出された。イヌAでは, 直腸拭い液の遺伝子量は血液と同程度であり, 口腔拭い液からは12日目時点で遺伝子は検出限界以下であった。一方, 2頭とも, 尿からは他の検体に比べて数千倍高い遺伝子量が検出された。発症後1ヶ月以降は遺伝子量が減少したものの, 2か月以上の長期間にわたり遺伝子が検出された。

4℃保管の検体を用いたウイルス分離試験では, SFTSV遺伝子量が $4.6 \pm 2.7 \text{ Log}_{10} \text{ copies/mL}$ 以上と多かった発症3週間までの尿からは, ウイルスが分離され, 感染性のあるウイルスが存在することが確認された(図3Cと表2)。遺伝子陽性の他の検体からは, ウイルスは分離されなかった。ただし, 凍結融解した検体を用いた再試時には, 感染性ウイルスが分離されたのは, $5.8 \pm 4.9 \text{ Log}_{10} \text{ copies/mL}$ と最も多いゲノムが検出された発症15日目の尿だけであった。遺伝子解析のために, 分離株およびリアルタイムPCRで陽性の検体について, RT-PCRを行った。その結果, ウイルスゲノムのコピー数が $5.6 \pm 3.9 \text{ Log}_{10} \text{ copies/mL}$ より高い検体(分離株と発症後15日までの尿)はRT-PCR陽性, ウイルスゲノムのコピー数が $4.8 \pm 3.5 \text{ Log}_{10} \text{ copies/mL}$ 以下の検体はRT-PCR陰性であった(表2)。2頭から分離されたSFTSV株について遺伝子解析したところ, 解読したNP遺伝子453bpの配列は完全に一致しており, 日本で最も報告の多いJ1クレードに属していた(図4)。

4. 推定感染地のマダニ調査

植生上から3属4種44個体のマダニ類が採取された(表3)。これらのマダニ類から抽出したRNA16検体についてSFTSV遺伝子の検出を行ったが, すべて陰性であった。

考察: 本研究では, 同時期に発生した2匹のイヌのSFTS症例についてウイルス学的な検査を行い, 尿から長期に渡りウイルスが検出されることを見出した。

SFTSVに自然感染したイヌ7頭のうち, 日本では3頭(43%)が致命的な転帰をたどった[23]。一方, SFTSVに感染してもイヌは無症状あるいは軽症であることが示唆されており[23, 24], 実際, イヌでは抗体陽性率が高いにもかかわらず, SFTSと診断された症例はネコやヒトよりも少なかった。本研究でも, イヌBは発熱と食欲不振が1日続いただけの軽症例であり, 重症例であるイヌAと同居していたためにSFTSと診断された。それにもかかわらず, イヌBのSFTSVの排出期間と排出量は, 検体が得られた限りではイヌAと同様であった。

今回の2症例で特筆すべき所見は, 尿からSFTSV遺伝子が他の検体に比べて高濃度に検出され, 検出期間も2か月以上と長期間であったことである。Parkらによると, イヌのSFTSV実験感染例では, 尿からSFTSV RNAは検出されるものの, RNA検出量は他の検体と同程度で, 検出期間も感染後6日以内であった[25]。この違いの原因は不明であるが, 今回の症例2頭と実験感染例では, 感染株や年齢(本研究の症例が8歳と14歳, 実験感染例が6か月齢)が異なることが影響しているかもしれない。というのも, SFTSVは株によって病原性が異なることや, 年齢が病原性に影響を与える重要なリスク要因であることが報告されているからである[26-28]。なお, イヌのSFTSV自然感染例については, 日本の報告[16, 23]では尿検体は採取されておらず, 韓国の報告[29]では7頭中1頭の尿からSFTSV遺伝子が検出されているが, 定量されていないためコピー数は不明である。

今回のイヌ2頭のウイルス検査所見から, イヌにおいてはSFTSV検出のための検体として尿が有用である可能性が示唆されたが, この点については, 今後より多くの症例で検証していく必要があると考えられた。

なお, イヌ以外の動物(ネコやマウス, フェレット)におけるSFTSV実験感染においても, 尿に排出されるSFTSV RNAは, 血液等の他の検体に比べて検出量に明らかな差はなく, 検出期間も12日以内と長くなく, 他の検体との検出期間の差も6日以内であると報告されている[28, 30, 31]。また, ヒトのSFTS症例においても尿中から

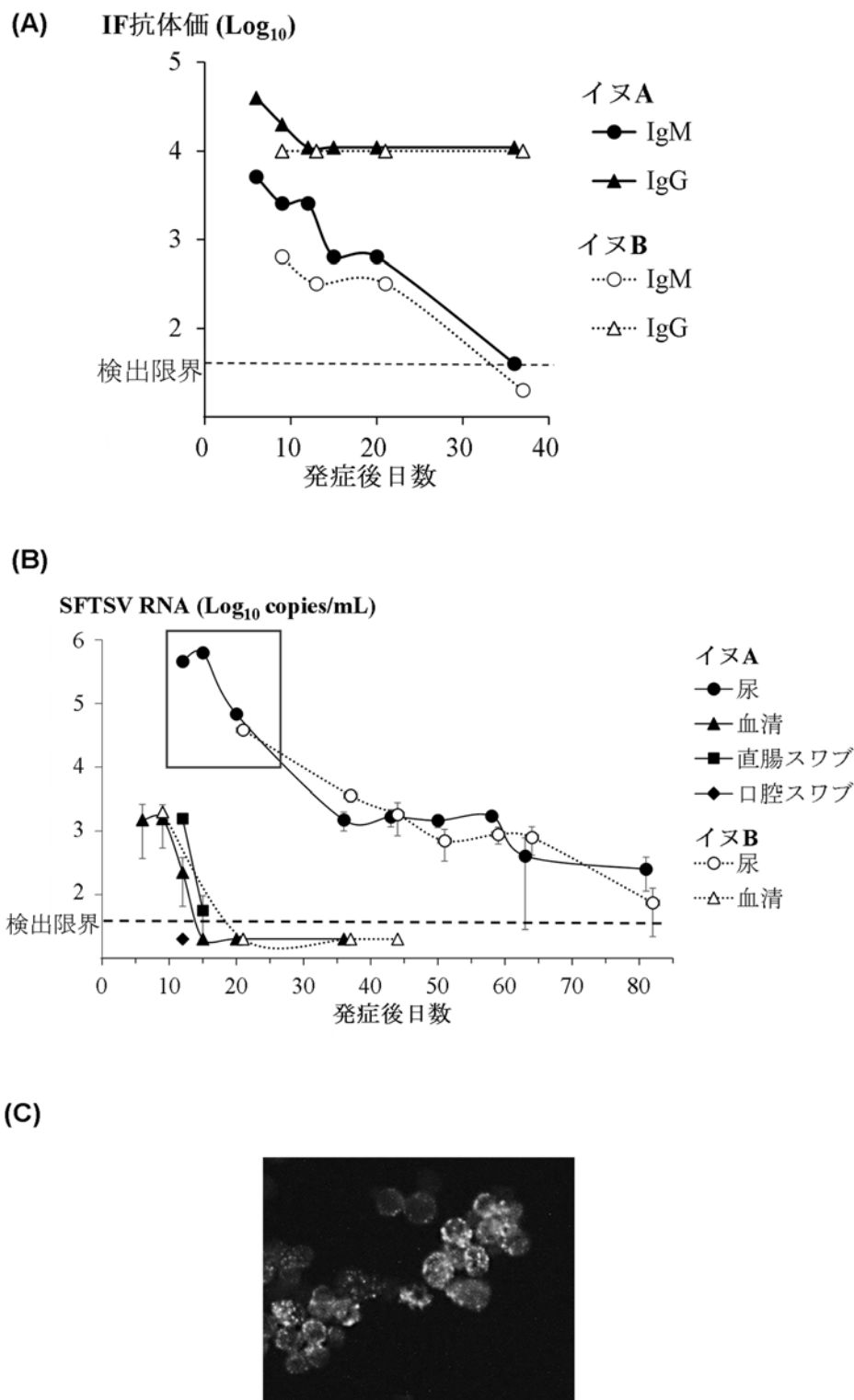


図 3. イヌ 2 頭の SFTSV 検査所見

(A) IF 法により判定した血清中の SFTSV に対する IgM または IgG の抗体価。検出限界は 40 倍であり、破線で示した。測定に用いた血清は、表 2 に示す発症後日数で採取した。(B) RT-qPCR 法により測定した各種検体中の SFTSV NP 遺伝子のゲノムコピー数。検出限界は 100 コピー/mL であり、破線で示した。測定に用いた検体は、表 2 に示す発症後日数に採取した。エラーバーは標準偏差を表す。実線で囲んだ検体は SFTSV 分離陽性のものである。(C) SFTSV 分離を確認するための IF 法。画像の蛍光粒子は、イヌ A の 15 日目に採取した尿検体を接種後、培養した VeroE6 細胞で検出された SFTSV の核タンパク質を示している。

表 2. イヌ 2 頭の検体の SFTSV RNA 検出およびウイルス分離結果

イヌ	検体	検体採取日 (発症後日数)	SFTSV RNA (Log ₁₀ copies/mL)	ウイルス 分離結果*	コンベンショナルRT-PCR検査結果	
					N1	N2
A	尿	12	5.7 ± 3.9	(+)	(+)	(-)
		15	5.8 ± 4.9	(+)	(+)	(-)
		20	4.8 ± 3.5	(+)	(-)	(-)
		36	3.2 ± 2.7	(-)	(-)	(-)
		43	3.2 ± 2.7	(-)	(-)	(-)
		50	3.2 ± 2.5	(-)	(-)	(-)
		58	3.2 ± 2.5	(-)	(-)	(-)
		63	2.6 ± 2.6	(-)	(-)	(-)
		81	2.4 ± 2.1	(-)	(-)	(-)
	血清	6	3.2 ± 3.1	(-)	(-)	(-)
		9	3.2 ± 3	(-)	(-)	(-)
		12	2.3 ± 2.2	(-)	(-)	(-)
		15	BDL	NT	NT	NT
		20	BDL	NT	NT	NT
		36	BDL	NT	NT	NT
	直腸スワブ	12	3.2 ± 2.3	(-)	(-)	(-)
		15	1.7 ± 1.6	(-)	(-)	(-)
	口腔スワブ	12	BDL	NT	NT	NT
B	尿	21	4.6 ± 2.7	(+)	(-)	(-)
		37	3.6 ± 2.9	(-)	(-)	(-)
		44	3.3 ± 3	(-)	(-)	(-)
		51	2.8 ± 2.6	(-)	(-)	(-)
		59	2.9 ± 2.4	(-)	(-)	(-)
		64	2.9 ± 2.6	(-)	(-)	(-)
		82	1.9 ± 1.7	(-)	(-)	(-)
	血清	9	3.3 ± 3.2	(-)	(-)	(-)
		13	BDL	NT	NT	NT
		21	BDL	NT	NT	NT
		37	BDL	NT	NT	NT

BDL: 検出限界以下, (-): 陰性, (+): 陽性, NT: 検査未実施

*ウイルス分離は, 4℃で8日間以内保管していた検体を用いた.

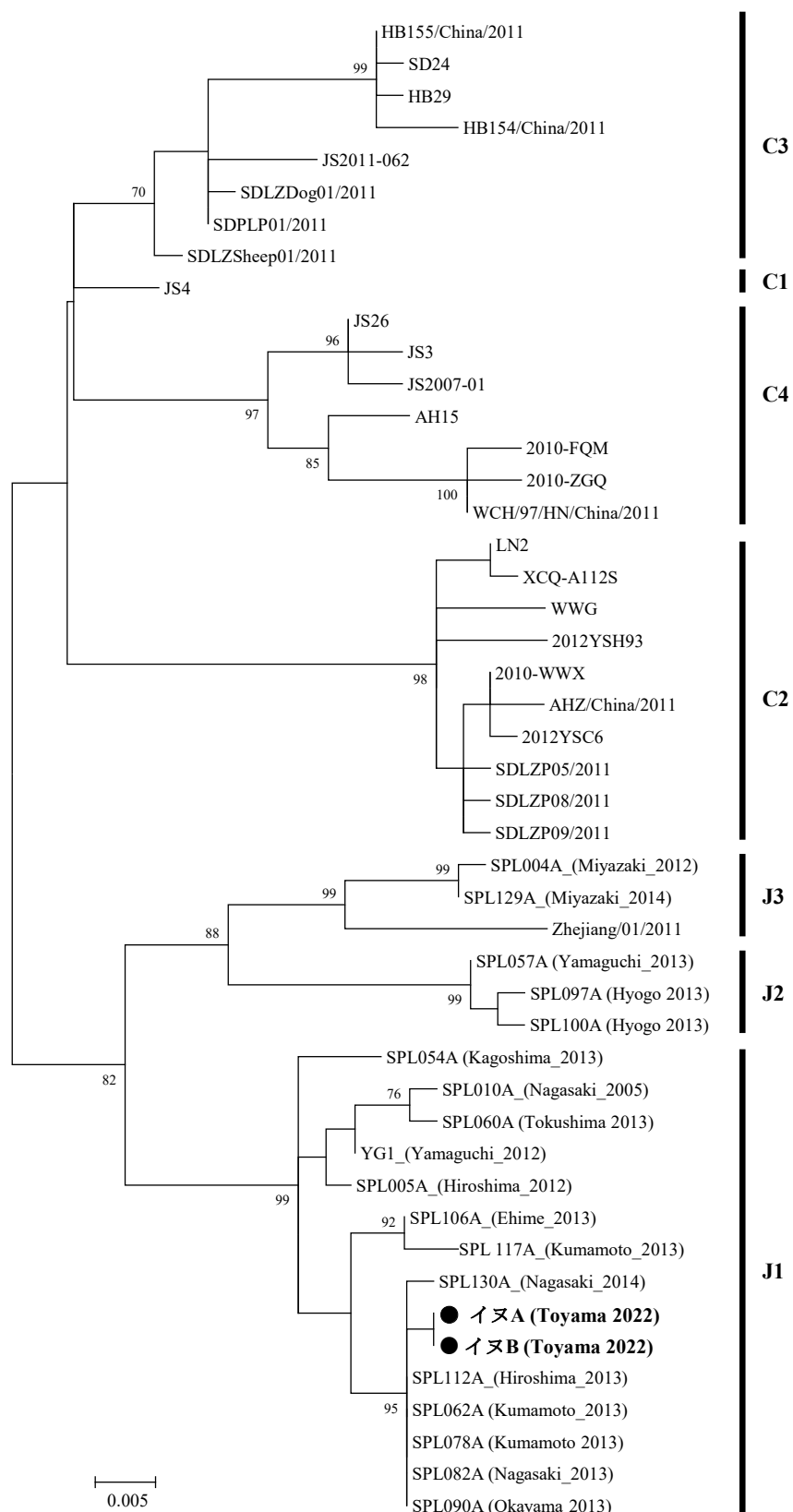


図 4. イヌ 2 頭から分離された SFTSV の NP 遺伝子 (453bp) の系統樹解析

Kimura2 パラメータモデルに基づく最尤法で作成. 1,000 回反復のブートストラップ解析で検証した. 系統樹の分岐のブートストラップ値は70% 以上のものを示した. イヌ A および B から分離された SFTSV 株は黒丸および太字で示した. J1 ~ J3 は日本株, C1 ~ C4 は中国株を示す.

表 3. イヌ SFTS 症例の推定感染地で採取されたマダニ類のSFTSV 遺伝子検出結果

マダニ種	発育期	個体数	陽性数 / 検体数*
キチマダニ	♀成虫	4	0 / 4
<i>Haemaphysalis flava</i>	若虫	14	0 / 3
フタトゲチマダニ	♀成虫	1	0 / 1
<i>H. longicornis</i>	若虫	22	0 / 5
タカサゴキララマダニ	若虫	2	0 / 2
<i>Amblyomma testudinarium</i>			
ベルルスカクマダニ	♀成虫	1	0 / 1
<i>Dermacentor vellulus</i>			
合計		44	0 / 16

*一部のマダニはプールして検査した。

長期間の遺伝子検出例は報告されていない。ただし、入院 51 日後まで肺炎が認められたヒト SFTS 症例では、喀痰からは入院 71 日後まで SFTSV RNA が検出されたが、血清からは入院 16 日後までしか検出されなかったことが報告されている [32]。この症例では、血液中に *Candida glabrata*、肺胞洗浄液中に *Aspergillus niger* も検出されていた。

本研究で重要なこととして、イヌ 2 頭の臨床症状の消失は発症後 2 日目と 7 日目であったが、尿には感染性ウイルスが少なくとも発症後 3 週間まで排出されていた。一つ特筆すべき点は、凍結した検体ではウイルス分離が成功せず、冷蔵保存していた検体からのみウイルス分離ができたことである。これは凍結融解によって、感染性のウイルス粒子は結構壊れてしまうのが原因かもしれない。このような所見を踏まえて、飼育者や獣医療従事者は、症状が消失した後も体液、特に尿の取り扱いには留意する必要があると考えられた。

この研究の制限は、得られた検体が症状消失後にしか入手できなかったため、発症初期における SFTSV 感染の動態が不明であったことである。ヒト SFTS の生存例では、血液中のウイルス RNA コピー数は時間の経過とともに有意に減少することが報告されている [33]。したがって、本研究のイヌも発症初期に多くのウイルスを排出し、ヒトへの感染源となるリスクが高かった可能性がある。

SFTSV の動物から人への感染を防止する観点から、伴侶動物症例を早期に診断し、隔離管理し、飼い主に早期に注意喚起する必要があると考えら

れた。そのためには、イムノクロマト法や RT-LAMP 法など、動物病院で使用できる簡便な検査法の開発・普及が望まれる。また、医療関係者や獣医療関係者だけでなく、飼い主等に対しても SFTS に関する知識の啓発を行う必要がある。

結論：本研究では、同時に SFTSV 感染した 2 頭の飼育犬のウイルス学的診断を実施したところ、症状が消失した後も長期間にわたって尿中に感染性ウイルスおよび遺伝子が検出された。したがって、飼い主や獣医療従事者は、症状が消失した後も体液、特に尿との接触には注意が必要である。

謝 辞

本研究の実施にあたり、有益なご意見をいただいた富山県獣医師会の久保博文氏、松村隆治氏、技術支援くださった川口泉氏、金森陽子氏にお礼申し上げます。

本研究の一部は、国立研究開発法人日本医療研究開発機構（AMED）の研究助成（助成番号 JP21fk0108081）、株式会社ニッポンジーンとの共同研究、公益財団法人武田科学振興財団の医学研究費補助金により行われた。

本資料の一部は、Viruses. 2023; 15 (11): 2228 に報告した。

文 献

1. Xu B, Liu L, Huang X, et al. (2011). PLoS

- Pathog, 7, e1002369
2. Yu XJ, Liang MF, Zhang SY, et al. (2011). *N Engl J Med*, 364, 1523–1532
 3. Takahashi T, Maeda K, Suzuki T, et al. (2014). *J Infect Dis*, 209, 816–827
 4. Kim KH, Yi J, Kim G, et al. (2013). *Emerg Infect Dis*, 19, 1892–1894
 5. Tran XC, Yun Y, Van AL, et al. (2019). *Emerg Infect Dis*, 25, 1029–1031
 6. Lin TL, Ou SC, Maeda K, et al. (2020). *Emerg Microbes Infect*, 9, 148–151
 7. 国立感染症研究所. 感染症発生動向調査で届出られたSFTS症例の概要 (2024年4月30日更新). <https://www.niid.go.jp/niid/ja/sfts/sfts-idwrs/12675-sfts-2.html> (2024年5月20日アクセス可能)
 8. Kobayashi Y, Kato H, Yamagishi T, et al. (2020). *Emerg Infect Dis*, 72, 356–358
 9. Li J, Li S, Yang L, et al. (2021). *Crit Rev Microbiol*, 47, 112–125
 10. Umeki K, Yasuda A, Umekita K, et al. (2020). *J Virol Methods*, 285, 113942
 11. Ishijima K, Yokono K, Park E, et al. (2023). *J Vet Med Sci*, 85, 329–333
 12. Sano S, Fukushi S, Yamada S, et al. (2021). *Viruses*, 13, 693
 13. Lee JW, Won YJ, Kang LH, et al. (2020). *J Microbiol*, 58, 711–715
 14. Yamanaka A, Kirino Y, Fujimoto S, et al. (2020). *Emerg Infect Dis*, 26, 2994–2998
 15. Kida K, Matsuoka Y, Shimoda T, et al. (2019). *Jpn J Infect Dis*, 72, 356–358
 16. Oshima H, Okumura H, Maeda K, et al. (2022). *Jpn J Infect Dis*, 75, 423–426
 17. 森川茂, 宇田晶彦, 加来義浩, 他. (2014). *IASR*, 35, 75–76
 18. 坂東彬人, 村田久仁男, 村井佑至, 他. (2023). *IASR*, 44, 42–43
 19. Castro MB, Clover JR. (2010). *J Vector Ecol*, 35, 435–438
 20. Yoshikawa T, Fukushi S, Tani H, et al. (2014). *J Clin Microbiol*, 52, 3325–3333
 21. Kumar S, Stecher G, Li M, et al. (2018). *Mol Biol Evol*, 35, 1547–1549
 22. 平良雅克, 追立のり子, 西嶋陽奈, 他. *IASR*, 42, 150–152
 23. Ishijima K, Tatemoto K, Park E, et al. (2022). *Viruses*, 14, 1963
 24. Niu G, Li J, Liang M, et al. (2013). *Emerg Infect Dis*, 19, 756–763
 25. Park SC, Park JY, Choi JY, et al. (2022). *Transbound Emerg Dis*, 69, 3090–3096
 26. Shin J, Kwon D, Youn SK, et al. (2015). *Emerg Infect Dis*, 21, 1704–1710
 27. Yun SM, Park SJ, Kim YI, et al. (2020). *JCI Insight*, 5, e129531
 28. Park SJ, Kim YI, Park A, et al. (2019). *Nat Microbiol*, 4, 438–446
 29. Han SW, Oh YI, Rim JM, et al. (2022). *Vet Res Commun*, 46, 1195–1207
 30. Park SC, Park JY, Choi JY, et al. (2020). *Lab Anim Res*, 36, 38
 31. Park ES, Shimojima M, Nagata N, et al. (2019). *Sci Rep*, 9, 11990
 32. Akagi K, Miyazaki T, Oshima K, et al. (2020). *BMC Infect Dis*, 20, 281
 33. Jo HN, Kim J, Hwang SY, et al. (2022). *Viruses*, 14, 881

富山県における 2023 年の病原微生物検出情報

齋藤 和輝 前西 絵美 池田 佳歩 金谷 潤一
木全 恵子 磯部 順子 大石 和徳

Pathogenic Bacteria Isolated in Toyama Prefecture in 2023

Kazuki SAITO, Emi MAENISHI, Kaho IKEDA, Jun-ichi KANATANI,
Keiko KIMATA, Junko ISOBE, and Kazunori OISHI

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

結果：2023 年 1 月から 12 月までの検出情報を菌種別（図 1）および材料別（表 1、2）に集計した。医療機関で分離された *Staphylococcus aureus* については、Methicillin-Resistant *S. aureus* (MRSA)

の割合（表 3）を算出した。

医療機関における分離数 18,028 株は、昨年の 15,990 株と比較して 12.7% 増加した（表 1）。菌種別では *Escherichia coli* が分離数 4,932 株（27.4%）と最も多かった（図 1）。次いで、*S. aureus* 2,981 株（16.5%）、コアグラゼ陰性 *S. aureus* 1,718 株（9.5%）、*Pseudomonas aeruginosa* 1,371 株（7.6%）、*Klebsiella pneumoniae* 1,328 株（7.4%）と、上位 5 菌種は昨年と同様であった。

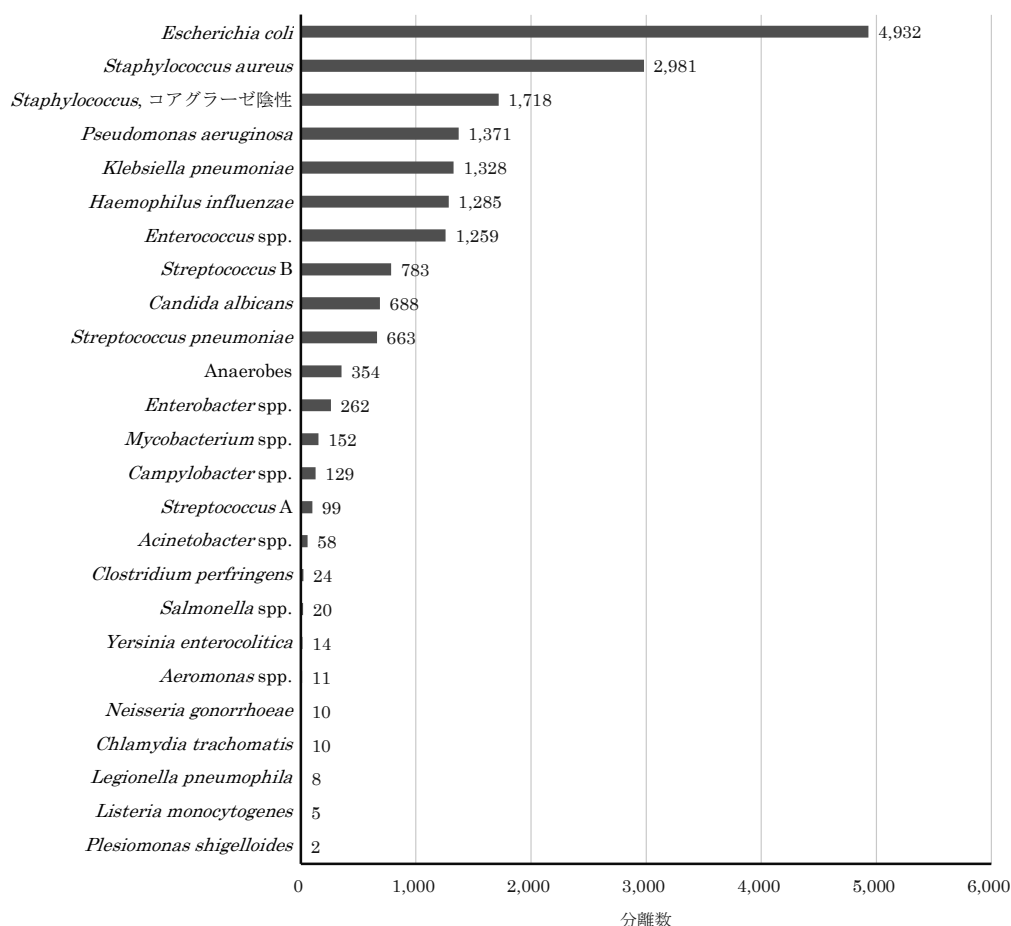


図 1. 2023 年における菌種別病原細菌分離状況（医療機関、保健所および地衛研を含む）

表 1. 材料別病原細菌分離状況 (医療機関のみ)

分離材料	分離数	割合 (%)
尿	8,009	44.4
喀痰, 気管吸引液および下気道からの材料	4,183	23.2
血液	2,515	14.0
咽頭および鼻咽頭からの材料	1,314	7.3
陰部尿道頸管擦過 (分泌)物	1,014	5.6
糞便	592	3.3
穿刺液 (胸水, 腹水, 関節液など)	395	2.2
髄液	6	0.0
合計	18,028	100

検出材料別 (表1) では, 尿からが8,009 株 (44.4%) と最も多く, 続いて喀痰, 気管吸引液および下気道の材料から4,183 株 (23.2%), 血液から2,515 株 (14.0%) の順であった. これらの材料からの分離菌で全体の81.6% を占めた. この傾向は昨年と同様であった.

以下に材料別の分離状況について報告する.

糞便: 分離菌株数は, 医療機関からの報告が592 株 (表 2-1 ①) で, これに保健所・地衛研からの報告 (表 2-2) の *Legionella pneumophila* 以外 42 株を含めて計 634 株 (前年比 110.8%) であった. 最も多かったのは MRSA 101 株を含む *S. aureus* 235 株 (前年比 104.0%) であった. 次に多かったのは *E. coli* (EPEC) 173 株 (前年比 111.6%) であった. *E. coli* 腸管出血性 (EHEC/VTEC) は医療機関から6 株, 保健所・地衛研から21 株が分離された. *Campylobacter* は, 医療機関から120 株 (前年比 102.6%), 保健所・地衛研から9 株が分離された.

穿刺液: 分離菌数は395 株 (前年比 97.8%) であった (表 2-1 ②). *E. coli*, コアグララーゼ陰性 *S. aureus* および MRSA 以外の *S. aureus* などが多く分離された.

髄液: 分離菌数は6 株であり, *E. coli*, *H. influenzae*, *S. aureus* (MRSA 以外), *Streptococcus B*, PRSP/PISP および *S. pneumoniae* (PRSP/PISP 以外) がそれぞれ1 株ずつ分離された (表 2-1 ③).

血液: 分離菌数は2,515 株 (前年比 98.8%) であった (表 2-1 ④). *E. coli* 999 株, コアグララーゼ

陰性 *S. aureus* 831 株, *S. aureus* (MRSA 以外) 236 株, MRSA 123 株が多く, これらで87.0% を占めた.

咽頭および鼻咽頭: 分離菌数は1,314 株 (前年比 395.8%) であった (表 2-1 ⑤). 分離されたのは *S. pneumoniae* 394 株 (前年比 243.2%), *H. influenzae* 839 株 (前年比 595.0%) で全体の93.8% を占めた. 特に, *H. influenzae* の検出数が前年と比較して6 倍程度増加した. これら分離数の大幅な増加について, 明確な理由は不明である.

喀痰, 気管吸引液および下気道: 分離菌数は4,183 株 (前年比 114.1%) であった (表 2-1 ⑥). *S. aureus* 1,766 株がもっとも多く, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* なども多く分離された.

尿: 分離菌数は8,009 株 (前年比 107.6%) であった (表 2-1 ⑦). *E. coli* 3,666 株がもっとも多く, 尿からの分離菌のおよそ半数 (45.8%) を占めた. *Enterococcus spp.*, コアグララーゼ陰性 *Staphylococcus*, *K. pneumoniae* などが *E. coli* に次いで多く分離された.

陰部尿道頸管擦過 (分泌) 物: 分離菌数は1,014 株 (前年比 96.9%) であった (表 2-1 ⑧). 昨年同様 *Streptococcus B*, *Candida albicans* が多く分離された.

材料別 MRSA 分離率を表 3 に示す. 年間を通した MRSA 分離率は29.4% であった. 特に, 糞便から43.7%, 喀痰, 気管吸引液および下気道からの材料から46.7% と, それぞれ高い分離率を示した. その他, 穿刺液, 尿および血液からは15% 程度の分離率であり, 髄液, 咽頭および鼻咽頭からの材料, および陰部尿道頸管擦過 (分泌) 物からは分離されなかった.

謝 辞

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

表 2. 月別・菌種別病原体微生物検出状況

1) 医療機関からの分離菌

① 分離材料：糞便

菌種・群・型	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	検出数	輸入例
<i>Escherichia coli</i> 腸管出血性(EHEC/VTEC)	0	0	0	0	1	1	1	2	0	0	0	1	6	0
<i>Escherichia coli</i> 病原大腸菌血清型(EPEC)	14	17	14	16	21	10	12	20	12	11	12	14	173	0
<i>Salmonella</i> O4	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	5	0
<i>Salmonella</i> O7	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	2	0	5	0
<i>Salmonella</i> O8	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
<i>Salmonella</i> O9	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0	0	0	3	0
<i>Salmonella</i> O3,10	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0
<i>Salmonella</i> 上記以外の群	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0
<i>Salmonella</i> 群不明	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	3	0
<i>Yersinia enterocolitica</i>	1	1	0	2	2	4	0	1	2	1	0	0	14	0
<i>Aeromonas hydrophila</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
<i>Aeromonas sobria</i>	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	3	0
<i>Aeromonas hydrophila/sobria</i> 種別せず	0	0	0	2	0	0	1	1	1	1	1	0	7	0
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	2	0
<i>Campylobacter jejuni</i>	0	0	2	3	4	4	8	10	5	3	5	1	45	0
<i>Campylobacter coli</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	2	0
<i>Campylobacter jejuni/coli</i> 種別せず	5	6	6	3	7	7	8	18	7	1	2	3	73	0
MRSA	5	7	13	9	7	10	14	6	10	4	10	6	101	0
<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA以外)	8	11	12	15	11	5	17	5	15	12	14	9	134	0
<i>Clostridium perfringens</i>	1	1	2	1	1	0	1	0	0	1	0	4	12	0
合計	34	44	49	53	55	43	64	70	58	36	46	40	592	0

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	検出数	輸入例
<i>Escherichia coli</i>	5	6	5	11	6	3	4	4	5	4	5	8	66	0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0	1	1	0	2	2	3	4	5	4	0	2	24	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2	1	1	4	3	4	4	3	8	3	1	4	38	0
MRSA	3	0	4	1	0	1	0	5	4	1	3	1	23	0
<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA以外)	3	1	4	5	6	4	5	7	6	4	8	0	53	0
<i>Staphylococcus</i> , コアグラールゼ陰性	4	6	3	7	5	6	7	13	5	7	1	0	64	0
PRSP/PISP	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
<i>Streptococcus pneumoniae</i> (PRSP/PISP以外)	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Anaerobes	9	8	11	12	16	7	16	10	11	8	8	9	125	0
合計	26	23	29	41	39	27	39	46	44	31	26	24	395	0

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	検出数	輸入例
<i>Escherichia coli</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0
<i>Haemophilus influenzae</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0
<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA以外)	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
<i>Streptococcus</i> B	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
PRSP/PISP	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
<i>Streptococcus pneumoniae</i> (PRSP/PISP以外)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0
合計	0	0	0	1	0	0	0	2	2	0	1	0	6	0

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	検出数	輸入例
<i>Escherichia coli</i>	71	61	69	73	83	67	86	99	79	107	92	112	999	0
<i>Salmonella</i> spp.	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
<i>Haemophilus influenzae</i>	0	0	1	2	2	1	2	2	0	0	0	2	12	0
<i>Listeria monocytogenes</i>	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	2	0	5	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10	5	6	5	7	4	8	1	8	12	7	2	75	0
MRSA	11	14	9	15	10	6	7	10	10	10	7	14	123	0
<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA以外)	21	21	19	22	19	23	15	17	23	21	20	15	236	0
<i>Staphylococcus</i> , コアグラールゼ陰性	71	53	52	78	63	58	95	93	96	70	51	51	831	0
<i>Streptococcus</i> B	5	7	0	2	5	6	3	5	3	5	5	6	52	0
PRSP/PISP	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0
<i>Streptococcus pneumoniae</i> (PRSP/PISP以外)	2	1	0	4	2	2	3	1	0	0	4	4	23	0
Anaerobes	11	17	19	16	19	10	16	4	7	9	12	12	156	0
合計	202	179	177	218	211	177	236	245	223	232	197	218	2,515	0

⑤ 分離材料：咽頭および鼻咽頭からの材料

菌種・群・型	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	検出数	輸入例
<i>Haemophilus influenzae</i>	17	21	32	88	132	150	106	85	50	40	50	68	839	0
<i>Streptococcus</i> A 型別せず	2	0	5	6	9	6	11	2	4	4	13	19	81	0
PRSP/PISP	3	5	2	3	11	5	1	3	2	3	6	2	46	0
<i>Streptococcus pneumoniae</i> (PRSP/PISP以外)	7	10	4	23	44	63	62	38	26	23	26	22	348	0
合計	29	36	43	120	196	224	180	128	82	70	95	111	1,314	0

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	検出数	輸入例
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	6	3	5	4	7	4	6	4	2	0	3	1	45	0
<i>Mycobacterium avium</i> ・intracellulare complex	10	7	5	9	9	9	9	15	6	13	10	5	107	0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	61	38	34	33	46	42	41	67	53	56	51	50	572	0
<i>Haemophilus influenzae</i>	15	18	29	34	51	49	40	46	36	27	45	43	433	0
<i>Legionella pneumophila</i>	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	2	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	78	47	57	49	42	54	58	80	86	67	66	53	737	0
MRSA	77	67	65	75	61	52	56	84	67	64	74	82	824	0
<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA以外)	99	89	63	86	89	82	69	73	79	58	78	77	942	0
<i>Streptococcus</i> A型別せず	2	1	0	0	1	0	1	4	0	1	5	3	18	0
<i>Streptococcus</i> B	30	21	6	17	17	16	12	15	15	12	17	12	190	0
PRSP/PISP	0	0	0	0	4	1	1	0	1	2	3	1	13	0
<i>Streptococcus pneumoniae</i> (PRSP/PISP以外)	17	7	10	10	15	17	19	35	20	18	30	29	227	0
Anaerobes	10	9	5	9	12	6	3	1	6	4	5	3	73	0
合計	405	307	279	326	354	333	316	424	371	322	387	359	4,183	0

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	検出数	輸入例
<i>Escherichia coli</i>	311	286	268	268	301	300	318	341	292	327	344	310	3,666	0
<i>Enterobacter</i> spp.	14	20	14	22	23	18	24	36	26	25	21	19	262	0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	52	64	50	44	64	50	67	73	69	75	71	53	732	0
<i>Acinetobacter</i> spp.	6	1	3	2	3	4	8	6	5	7	10	3	58	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	42	42	42	35	40	38	41	61	35	59	36	50	521	0
MRSA	14	17	22	17	16	21	14	15	22	15	15	16	204	0
<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA以外)	23	17	12	28	27	14	19	30	15	21	20	24	250	0
<i>Staphylococcus</i> , コアグラーゼ陰性	52	61	66	65	70	93	90	82	56	65	62	61	823	0
<i>Enterococcus</i> spp.	98	116	106	91	104	116	105	111	99	96	104	113	1,259	0
<i>Candida albicans</i>	28	16	20	18	17	14	18	21	23	23	22	14	234	0
合計	640	640	603	590	665	668	704	776	642	713	705	663	8,009	0

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	検出数	輸入例
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	1	0	1	0	5	1	0	0	1	1	0	0	10	0
<i>Streptococcus</i> B	43	46	46	35	46	41	35	50	45	68	46	39	540	0
<i>Chlamydia trachomatis</i>	0	1	0	2	2	1	1	0	0	0	3	0	10	0
<i>Candida albicans</i>	29	41	42	37	46	32	31	38	35	44	45	34	454	0
合計	73	88	89	74	99	75	67	88	81	113	94	73	1,014	0

2) 保健所・地衛研からの分離菌

菌種・群・型	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	検出数	輸入例
<i>Escherichia coli</i> 腸管出血性(EHEC/VTEC)	0	0	0	0	1	1	3	3	5	4	3	1	21	0
<i>Campylobacter jejuni</i>	0	0	0	0	0	0	0	9	0	0	0	0	9	0
<i>Clostridium perfringens</i>	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	12	0
<i>Legionella pneumophila</i>	0	0	1	0	0	0	1	0	3	0	1	0	6	0
合計	12	0	1	0	1	1	4	12	8	4	4	1	48	0

表 3. 材料別および月別のMRSA 分離率 *

材料	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	31.3	50.0	65.0	50.0	38.9	41.7	53.8	42.9	41.7	21.1	40.0	46.2	43.7
穿刺液(胸水、腹水、関節液など)	30.0	0.0	36.4	7.7	0.0	9.1	0.0	20.0	26.7	8.3	25.0	100.0	16.4
髄液	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
咽頭および鼻咽頭からの材料	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
尿	15.7	17.9	22.0	15.5	14.2	16.4	11.4	11.8	23.7	14.9	15.5	15.8	16.0
血液	10.7	15.9	11.3	13.0	10.9	6.9	6.0	8.3	30.3	32.3	25.9	48.3	13.3
喀痰，気管吸引液および下気道からの材料	43.8	42.9	50.8	46.6	40.7	38.8	44.8	53.5	45.9	52.5	48.7	51.6	46.7
陰部尿道頸管擦過（分泌）物	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
合計	27.9	29.2	33.3	28.1	24.5	23.4	22.6	27.0	36.3	33.0	34.8	39.3	29.4

*分離率 (%) : (MRSA 分離数/*S. aureus* 分離数)×100

富山県内の腸管出血性大腸菌感染症発生状況(2023年)

木全 恵子 金谷 潤一 齋藤 和輝 池田 佳歩
前西 絵美 磯部 順子 百石祐一朗¹ 大石 和徳

Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Infectious Diseases Detected in Toyama Prefecture in 2023

Keiko KIMATA, Jun-ichi KANATANI, Kazuki SAITO, Kaho IKEDA,
Emi MAENISHI, Junko ISOBE, Yuichiro HYAKKOKU, and Kazunori OISHI

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

当所では県内で発生したEHEC感染症について分離株の収集・解析を行っている。2023年1月

から12月までに富山県において発生したEHEC感染事例は25件、感染者は28名であった。以下に2023年の富山県におけるEHEC感染症の発生状況について、概要、疫学的解析結果を報告する。

材料と方法：2023年1月から12月までに富山県で発生したEHEC感染事例25件の届出について、感染者の年齢層、性別および症状の有無の3つの項目について集計した。

また、分離株の細菌学的解析は、菌株を入手できなかった県外発生事例（表1、事例No.8）1件を除いた24件について行った。

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

薬剤感受性試験は、13薬剤（ノルフロキサシン、ナリジクス酸、カナマイシン、ゲンタマイシン、ホスホマイシン、アンピシリン、SXT合剤、テトラサイクリン、ストレプトマイシン、セファゾリン、クロラムフェニコール、セフトジジム、セフォタキシム）について行った。CLSIのプロトコルに準拠し、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。また、阻害剤を用いたβ-ラクタマーゼ産生性の確認およびβ-ラクタマーゼ遺伝子のPCRによる検出は既報に従い行った[3,4]。CIT型AmpC β-ラクタマーゼ遺伝子の同定は既報[5]に従い行った。

各事例の分離株について接着因子遺伝子 *eae*、ペロ毒素遺伝子 *stx1*、*stx2* および凝集付着性大腸

表1. 富山県腸管出血性大腸菌感染症発生状況 (2023)

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}	ペロ毒素遺伝子型
1	2023.5	1	散発	O157:H7	<i>stx2</i>
2	2023.5	1	散発	O157:H7	<i>stx2</i>
3	2023.6	1	散発	O111:Hg8	<i>stx1</i>
4	2023.6	1	散発	O157:Hg7	<i>stx1stx2</i>
5	2023.7	1	散発	O157:H7	<i>stx2</i>
6	2023.7	1	散発	O103:H2	<i>stx1</i>
7	2023.7	1	散発	O103:H2	<i>stx1</i>
8	2023.7	1	散発	O157:HNT	<i>stx2</i>
9	2023.8	1	散発	O157:H7	<i>stx1stx2</i>
10	2023.8	1	散発	O157:Hg7	<i>stx1stx2</i>
11	2023.8	1	散発	O157:H7	<i>stx1stx2</i>
12	2023.8	2	集団	O157:Hg7	<i>stx1stx2</i>
13	2023.8	2	集団	O103:H2	<i>stx1</i>
14	2023.8	1	散発	O157:H7	<i>stx2</i>
15	2023.9	2	集団	O157:H7	<i>stx2</i>
16	2023.9	1	散発	O157:H7	<i>stx1stx2</i>
17	2023.10	1	散発	O103:H2	<i>stx1</i>
18	2023.10	1	散発	O91:Hg14	<i>stx1</i>
19	2023.10	1	散発	Og105:Hg7	<i>stx2</i>
20	2023.10	1	散発	O157:H7	<i>stx1stx2</i>
21	2023.11	1	散発	O157:Hg7	<i>stx2</i>
22	2023.11	1	散発	O26:H11	<i>stx1</i>
23	2023.11	1	散発	Og76:Hg7	<i>stx1</i>
24	2023.12	1	散発	Og5:Hg9	<i>stx1</i>
25	2023.12	1	散発	Og76:Hg19	<i>stx1</i>

O157 14件(16名)、O103 4件(5名)、Og76 2件(2名)、O111 1件(1名)、O26 1件(1名)、Og5 1件(1名)、O91 1件(1名)、Og105 1件(1名) 計25件(28名)

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

菌耐熱性毒素遺伝子 *astA* のPCR による検出を行った。

O157, O26, O111 の multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis (MLVA) は当所で、O103 および O91 の MLVA は国立感染症研究所で行った[6]。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。得られたMLVAの各標的遺伝子座の反復配列数情報に基づいて国立感染症研究所で付与されたMLVA型(MLVA type)を示した。また、1遺伝子座の反復配列数のみ異なるMLVA型は遺伝的関連性があると判定し、これらの1遺伝子座のみ異なる複数のMLVA型をひとつの関連性のある一群、「コンプレックス」とし、コンプレックス型(MLVA comp)として標記した(表3)。また、互いに2つの遺伝子座の反復配列数が異なるMLVA型は関連する可能性を示し、3つ以上の遺伝子座の反復配列数が異なるMLVA型は遺伝的関連性がないと判定した[7]。

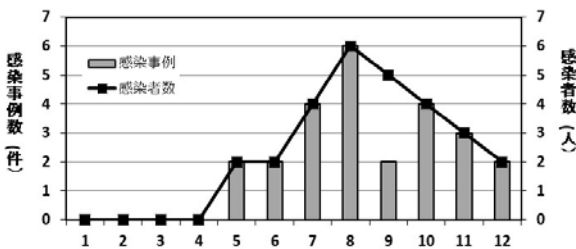


図1. 富山県における腸管出血性大腸菌感染症月別発生動向(2023)

結果：

2023年におけるEHEC感染症発生状況：2023年の富山県におけるEHEC感染事例は散发事例が22件、集団事例が3件であった。これらの内訳は、EHEC O157感染事例が14件、16名、EHEC O103感染事例が4件、5名、O76感染事例が2件、2名、EHEC O111, O26, Og5, O91, Og105感染事例がそれぞれ1件、1名であった(表1)。このうち健康診断で探知された感染事例は散发事例8件(表1, 事例No. 7, 14, 17, 18, 19, 20, 23および25)および集団事例1件(表1, 事例No.13)であった。事例数、感染者数はそれぞれ前年比1.67, 1.27(15件, 22名)で、事例数が増加した(表1)。事例数及び感染者数の月別動向を図1に示した。2023年は7月から11月にかけて事例数の76%(19件/25件)とEHEC感染症が多

く発生した。感染者に対する有症者の割合は67.9%(19名/28名)であった。年代別の割合は20歳代が、35.7%(10名/28名)を占めていた(図2)。男女比は男性35.7%, 女性64.3%で女性がやや多い傾向がみられた。

また、HUSを発症した患者が1名報告された(表1, 事例12)。この患者からEHECは分離することができなかったが、血清からのO抗原凝集抗体の検出によりEHEC感染が診断された。

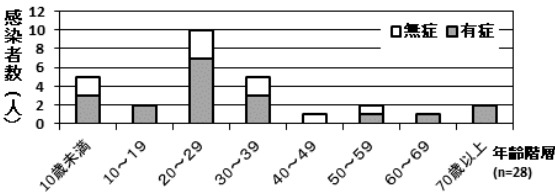


図2. 年齢別腸管出血性大腸菌感染症発生状況

分離株の薬剤感受性：表1の事例No.8をのぞく各事例の代表24株について、薬剤感受性試験を行った。供試菌株の45.8%(11株/24株)が、上述の13薬剤のいずれかに耐性を示した(表2)。このうち3剤(SXT合剤、クロラムフェニコール、テトラサイクリン)耐性株が16.7%(4株/24株)、4剤(SXT合剤、クロラムフェニコール、ストレプトマイシン、テトラサイクリン)耐性株が12.5%(3株/24株)と、複数株検出された。複数の感染事例で同一薬剤耐性パターンを示した分離株が検出されたが、これらの事例間の関連性は不明であった。

表2. 分離株の薬剤感受性

事例No.	分離株の血清型およびベロ毒素遺伝子型	耐性を示した抗菌剤*
1	O157 (<i>stx2</i>)	ABPC ST CP SM TC
2	O157 (<i>stx2</i>)	ST CP SM TC
5	O157 (<i>stx2</i>)	ST CP SM TC
10	O157 (<i>stx1stx2</i>)	CP SM TC
11	O157 (<i>stx1stx2</i>)	CP SM TC
12	O157 (<i>stx1stx2</i>)	CP SM TC
14	O157 (<i>stx2</i>)	KM CP SM
17	O103 (<i>stx1</i>)	ABPC SM
18	O91 (<i>stx1</i>)	CP SM TC
21	O157 (<i>stx2</i>)	ST CP SM TC
24	Og5 (<i>stx1</i>)	ABPC CTX NA CAZ CP SM TC CEZ

* ABPC: アンピシリン, ST: SXT合剤, CP: クロラムフェニコール, SM: ストレプトマイシン, TC: テトラサイクリン, KM: カナマイシン, CTX: セフトキシム, NA: ナリジクス酸, CAZ: セフトジウム, CEZ: セファゾリン

分離株の病原因子：各事例の代表24株のベロ毒素遺伝子型は、*stx1 stx2*保有型が7株、*stx2*保有型が7株、*stx1*保有型が10株であった。事例No. 18および事例25の分離株O91 (*stx1*)、Og76 (*stx1*)

は *eae* を保有していなかった。

O157, O26, O111 の MLVA による遺伝子型別：表3に2023年に県内で分離されたO157, O26およびO111の各事例分離株について、当所で取得したMLVAの各標的遺伝子座の反復配列数と、MLVA型(表3, MLVA type)およびコンプレックス型(表3, MLVA comp)を示した。また、遺伝子座で2種類の反復配列数が検出された場合は、表3に「/」をつけて該当する配列数を併記した。これは、標的遺伝子座が複数コピーあること等が原因となり、2種類の反復配列数が検出されたためであると考えられた。また、EHEC O103(事例No.6, 7, 13および17)とEHEC O91(事例No.18)は国立感染症研究所で型別された。

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No.10, 11および12(表3, MLVA型23m0273, MLVAコンプレックス23c041)であった。これらの事例は2023年8月に発生した感染事例であったが、事例間の関連性は不明であった。

国立感染症研究所のMLVAによる分子疫学サーベイランスの結果、2023年に全国5機関以上の地衛研等から検出された広域流行株のMLVA型またはMLVAコンプレックスは、46種類であった[8]。このうち、本県で検出された広域流行株のMLVA型および、MLVAコンプレックスは事例No.21の23c026(表3)であった。MLVAコンプレックス23c026は9県で7月から11月にかけて検出された。

2023年に本県で検出されたMLVA型は、O157が11タイプ、O103が5タイプ、O26・O111・O91がそれぞれ1タイプであった。他県のEHEC感染事例と同じMLVA型またはMLVAコンプレックスは、O157で6種類(表1, 事例No. 2, 9, 10, 11, 12, 14, 15および21)、O103が2種類(表1, 事例No. 6および7)、O111が1種類(表1, 事例No. 3)が検出された(表3)。しかし、これらの事例について、他県の同じMLVA型またはMLVAコンプレックスが検出された感染事例との関連性は不明であった。

特記すべき事例の報告：2023年の感染事例のうち、上述の広域流行株以外的事例について以下に詳細を報告する。

県内で発生した2つのEHEC Og76感染事例：2023年11月および12月に市販の大腸菌O血清群

抗血清に凝集せず、OUTと報告された感染事例がそれぞれ1件報告された(表1, 事例No.23, 25)。この事例の分離株のO血清群およびH血清型について、PCRによる遺伝子型別[1,2]を実施したところ、それぞれOg76:Hg7およびOg76:Hg19であった。これら2事例を含め、EHEC O76による感染事例は2023年に全国で3件発生しているが、有症事例は本県で発生した感染事例(表1, 事例No. 25)のみであった。

AmpC β-ラクタマーゼ産生性EHECが分離された感染事例：2023年12月にO血清群不明のEHECによる散発感染が1件報告された(表1, 事例No. 24)。当所でO血清群不明のEHECのO血清群遺伝子型別[1]を行った結果、Og5であった。この事例の分離株について、薬剤感受性試験を行った結果、β-ラクタマーゼ産生株であることが推測された(表2)。このため、β-ラクタマーゼ遺伝子およびβ-ラクタマーゼ産生性の解析を行った[3-5]。その結果、本菌がCIT型AmpC β-ラクタマーゼを保有しており、その遺伝子型は、*bla*_{CMY-2}であることが判明した。本県でのAmpC β-ラクタマーゼ産生性EHECによる感染事例は2015年(2事例)につづき3事例目であった。

考察：2023年のEHEC感染事例数およびEHEC感染者数は、25件、28名であり、新型コロナウイルス感染症流行前の2012年から2019年の本県の感染事例数および感染者数の平均値(19.1件、36.6名)の131%、76.5%であった。2021年・2022年のEHEC感染事例数は新型コロナウイルス感染症流行前の平均値に対して約80%前後(83.8%、78.5%)であったのに対し、2023年は増加傾向がみられた。これは、2023年に新型コロナウイルス感染症が5類感染症に指定され、感染症対策が緩和されたことなどの影響が考えられたが、原因は明確ではない。このため、今後もEHEC感染症の発生状況の変化を注視する必要がある。

また、2023年は、AmpC β-ラクタマーゼ産生性EHECによる感染事例が報告された。AmpC β-ラクタマーゼ産生菌はAmpC β-ラクタマーゼの過剰発現により、β-ラクタム系抗菌薬に耐性を示す薬剤耐性菌である。また、AmpC β-ラクタマーゼは染色体性とプラスミド性のものが存在しており、プラスミド性AmpC β-ラクタマーゼは菌株や菌種間で伝播する。今回検出されたEHECはプラスミド性であるCIT型AmpC β-ラクタマーゼ遺伝子 *bla*_{CMY-2} を保有していた。こ

表 3. MLVA における各標的遺伝子座の反復配列数

O157				EH111-11	EH111-14	EH111-8	EH157-12	EH26-7	EHC-1	EHC-2	EHC-5	EHC-6	O157-3	O157-34	O157-9	O157-25	O157-17	O157-19	O157-36	O157-37
事例No.	血清型	MLVAtype	MLVAcomp																	
1	O157	23m0099		2	-2	1	6	-2	12	5	-2	9	12	9	11	5	5	7	-2	2/7
2	O157	22m0275		2	-2	1	6	-2	7	6	-2	-2	8	9	16	5	4	7	9	5
4	O157	18m0098		2	-2	1	4	-2	5	4	-2	-2	9	12	13	8	7	6	3	6
5	O157	21m0355		2	-2	1	7	-2	9	5	-2	-2	9	9	7	5	4	7	11	7
9	O157	23m0385	23c047	2	-2	1	4	-2	5	4	2/11	-2	8	12	13	11	7	6	3	7
10	O157	23m0273	23c041	2	-2	1	4	-2	6	5	12	-2	9	11	13	5	7	6	6	6
11	O157	23m0273	23c041	2	-2	1	4	-2	6	5	12	-2	9	11	13	5	7	6	6	6
12	O157	23m0273	23c041	2	-2	1	4	-2	6	5	12	-2	9	11	13	5	7	6	6	6
14	O157	19m0299		2	-2	1	1	-2	7	5	-2	-2	7	8	8	3	3	5	7	6
15	O157	23m0378		2	-2	1	3	-2	9	4	-2	-2	8	9	-2	4	3	6	4	9
16	O157	23m0393		2	-2	1	1	-2	7	6	3	-2	-2	9	11/12	5	3	5	5	9
20	O157	23m0672		2	-2	1	4	-2	5	4	6	-2	10	12	13	8	8	6	3	5
21	O157	23m0212	23c026	2	-2	1	8	-2	9	6	-2	-2	6	9	7	5	4	7	11	8
O26-O111																				
事例No.	血清型	MLVAtype	MLVAcomp	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
3	O111	23m3005		4	1	5	2	-2	14	9	-2	3	-2	3	10	2	-2	1	-2	11
22	O26	23m2098		2	1	1	2	2	9	13	-2	-2	-2	1	10	2	-2	1	-2	-2
O103-O91																				
事例No.	血清型	MLVAtype	MLVAcomp																	
6	O103	17m4017																		
7	O103	18m4024																		
13	O103	16m4003																		
17	O103	16m4013																		
18	O91	23m8027																		

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。

のことから、本菌株も他の菌から *bla*_{CMY-2} をコードするプラスミドを獲得し、β -ラクタム系抗菌薬に耐性を獲得したと考えられる (表 2)。

このように、EHEC においても薬剤耐性を獲得する株が検出されていることから、今後も EHEC における薬剤耐性について監視する必要があると考える。

謝 辞

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

文 献

1. Iguchi A, Iyoda S, Seto K, et al. (2015). J Clin Microbiol, 53, 2427-2432

2. Iguchi A, Nishii H, Seto K, et al. (2020). J Clin Microbiol, 58, e01493-20

3. 国立感染症研究所 病原体検出マニュアル 薬剤耐性菌, 39-42
<https://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/AMR20240321.pdf>

4. Watahiki M, Kawahara R, Suzuki M, et al. (2020) Jpn J Infect Dis., 7, 166-172

5. Pérez-Pérez FJ, Hanson ND. (2002) J Clin Microbiol., 40, 2153-2162

6. Pei Y, Terajima J, Saito Y, et al. (2008). Jpn J Infect Dis, 61, 58-64

7. 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

8. 泉谷秀昌, 李 謙一, 伊豫田淳, 他. (2024) 病原微生物検出情報, 45, 80-82

富山県内で分離された溶血性レンサ球菌の細菌学的解析(2023 年)

池田 佳歩	磯部 順子	前西 絵美	齋藤 和輝
金谷 潤一	木全 恵子	柴山 直美 ¹	野口 範子 ¹
堀江 妙子 ¹	竹島 亜実 ¹	池辺 忠義 ²	大石 和徳

Serotypes and Antibiotic Susceptibilities of Clinical Hemolytic Streptococcal Isolates in Toyama Prefecture in 2023

Kaho IKEDA, Junko ISOBE, Emi MAENISHI, Kazuki SAITO,
Jun-ichi KANATANI, Keiko KIMATA, Naomi SHIBAYAMA, Noriko NOGUCHI,
Taeko HORIE, Ami TAKESHIMA, Tadayoshi IKEBE, and Kazunori OISHI

目的：溶血性レンサ球菌（溶レン菌）は、急性咽頭炎、扁桃炎、膿痂疹など様々な感染症を引き起こすだけでなく、時には進行が早く、致死率の高い劇症型の疾患を引き起こすことが知られている。感染症法では、本菌による咽頭炎は5類感染症小児科定点把握疾患に、また、劇症型溶レン菌感染症は、5類感染症全数報告疾患に位置付けられる。全国の劇症型溶レン菌感染症の患者から分離され、レファレンスセンターで検査された溶レン菌は、昨年続きA群（70株）よりG群（106株）が多かった。しかしながら、劇症型となる要因や発生機序は未だ明らかではないため、流行株の調査を実施することは重要である。

当所では、衛生微生物技術協議会溶レン菌レファレンスセンターの東海・北陸支部センターとして、A群溶レン菌の血清型別や劇症型溶レン菌感染症由来株の収集および疫学調査を実施している。ここでは、2023年に富山県内で分離されたA群溶レン菌の血清型別結果および劇症型溶レン菌感染症の病原体サーベイランス結果について報告する。

材料と方法：**(1) 感染症発生動向調査による患者数**

2023年1～12月に富山県で報告されたA群溶レン菌咽頭炎および劇症型溶レン菌感染症の届出数を集計した。

(2) A群溶レン菌の血清型別

供試菌株は、2023年に富山県内の1医療機関で患者から分離されたA群溶レン菌17株について、

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

(3) 劇症型溶レン菌感染症患者分離株の病原体サーベイランス

2023年に富山県内で届出された劇症型溶レン菌感染症は13件であった。これらのうち、収集された9株について、群別、T血清型別、菌種同定、emm遺伝子型別、薬剤感受性試験を実施した。群別試験は、「ストレプトLA NX」（デンカ）を用いた。T血清型別は、上記の(2)A群溶レン菌の血清型別と同様に行った。菌種同定は、「API 20 STREP」（バイオメリュウ）を用いた。emm遺伝子型別および薬剤感受性試験は、国立感染症研究所細菌第一部にて実施した。調べた薬剤は、ペニシリンG (PCG)、アンピシリン (ABPC)、セファゾリン (CEZ)、セフトキシム (CTX)、メロペネム (MEPM)、バンコマイシン (VCM)、ダプトマイシン (DAP)、エリスロマイシン (EM)、クリンダマイシン (CLDM)、EM/CLDM、リネゾリド (LZD)、シプロフロキサシン (CPFX)、ミノサイクリン (MINO) の13薬剤である。

結果と考察：**(1) 感染症発生動向調査による患者数**

富山県における2023年のA群溶レン菌咽頭炎の患者報告数は3,723人（定点あたり128.38人）で、定点報告数をこれまでと比較すると、2022年の17.76人に比べおよそ7.2倍に増加した。これは

1. 富山市民病院, 2. 国立感染症研究所細菌第一部

COVID-19 流行前の2019年の115.1人に近い報告数である[1]。COVID-19が5類に位置付けられ、感染対策が緩やかになっていることが少なからず影響したものと考えられる。一方、2023年の劇症型溶レン菌感染症の患者報告数は13人で、2022年(21人)のおよそ6割と減少した(図1)。しかしながら、感染率(対10万人感染者数)は1.26と全国(0.75)より高い状況が続いており、動向の監視が必要である。

(2) A群溶レン菌のT血清型別

2023年に収集されたA群溶レン菌17株のうちW12が4株(23.5%)、T-1が3株(17.6%)と多く、U28、X25が各1株で、残る8株(47.1%)はすべて型別不能(UT)であった。2021、2022年の2年間は型別不能株数が約90%以上と高かったが、2023年の割合は減少した(図2)。

(3) 劇症型溶レン菌感染症患者分離株の病原体サーベイランス

収集した劇症型溶レン菌感染症患者から分離された溶レン菌9株について、検査結果を表1に示した。血清群別の結果、4株(44.4%)がG群、3株(33.3%)がA群、2株がB群であった。G群はすべ

てが*Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*で、それらのemm型はstG 840.0が2株、stG 652.1、stG653.0が各1株であった。A群は3株とも*S. pyogenes*で、すべてT型、M型共にUTであった。

薬剤感受性については、MINO耐性が2株、CPFX低感受性株が1株であった。

謝 辞

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

文 献

1. 国立感染症研究所 IDWR 速報データ 2023 年第 52 週
<https://www.niid.go.jp/niid/ja/data/12442-idwr-sokuho-data-j-2352.html>
(2024 年 3 月 30 日アクセス可能)

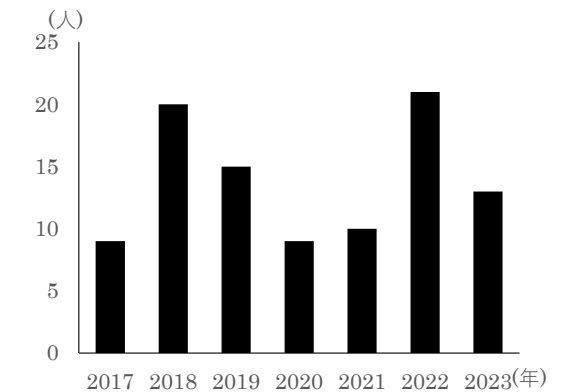


図 1. 劇症型溶レン菌感染症患者報告数の推移(富山県)

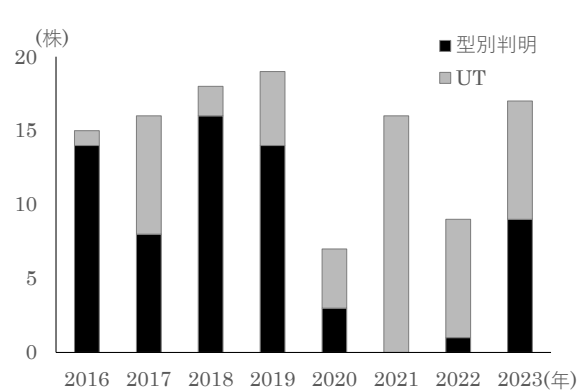


図 2. A群溶血性レンサ球菌のT血清型別結果(富山県)

表 1. 劇症型溶血性レンサ球菌感染症患者からの分離菌の解析結果(2023 年富山県)

No.	発症月	性別	年代	菌種	血清型別		emm遺伝子型	spe	薬剤耐性
					群	T血清	M血清		
1	1月	男	70	<i>S. agalactiae</i>	B	VI			
2	1月	男	80	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	G			stG652.1	
3	1月	男	70	<i>S. pyogenes</i>	A	UT	UT	emm81.0	B,F MINO耐性
4	1月	男	70	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	G			stG840.0	
5	1月	男	80	<i>S. pyogenes</i>	A	UT	UT	emm81.0	B,F MINO耐性
6	2月	女	90	<i>S. agalactiae</i>	B	I b			CPFX低感受性
7	2月	女	50	<i>S. pyogenes</i>	A	UT	UT	emm49.0	B,F
8	5月	女	70	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	G			stG840.0	
9	9月	女	60	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	G			stG653.0	

富山県内の入浴施設における水検体中の レジオネラ属菌分離状況(2023年度)

金谷 潤一 木全 恵子 磯部 順子 齋藤 和輝
池田 佳歩 前西 絵美 大石 和徳

Isolation of *Legionella* Species from Public Bath Water in Toyama Prefecture in the
Fiscal Year 2023

Jun-ichi KANATANI, Keiko KIMATA, Junko ISOBE, Kazuki SAITO,
Kaho IKEDA, Emi MAENISHI, and Kazunori OISHI

目的：レジオネラ属菌は土壌や淡水などの自然環境に生息するが、冷却塔、加湿器、循環式浴場など人工的な水環境にも広く生息する。このレジオネラ属菌が肺胞マクロファージの中で増殖し、ヒトに経気道感染（レジオネラ症）を引き起こす。レジオネラ症は、レジオネラ属菌を含むエアロゾルを吸い込むことで発症する。国内では、循環式入浴施設での集団感染事例が多く報告され、レジオネラ症と入浴施設は強く関連していることが明らかとなっている[1-4]。レジオネラ症の届出数は全国的に増加傾向を示し、2023年には暫定値で2,271件報告されている[5]。富山県のレジオネラ症罹患率（人口10万人当たりの患者数）は3.58で、全国の罹患率1.80のおよそ2倍と高い状況である。富山県では、レジオネラ症の発生予防に資することを目的として、主な感染源となる入浴施設におけるレジオネラ属菌による汚染実態調査を継続している。ここでは2023年の結果を報告する。

材料と方法：2023年7月から2023年11月にかけて、県内7施設から採取した浴槽水31検体、シャワー水8検体、カラン水7検体、計46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。検体は採取後直ちにハイポ入り滅菌採水瓶に入れ、当日中または翌日（冷蔵保存）に当所へ搬入された。

検査は、令和元年9月19日付け薬生衛発0919第1号「公衆浴場における浴槽水等のレジオネラ属菌検査方法について」の「別添 公衆浴場における浴槽水等のレジオネラ属菌検査方法」を参考に実施した[6]。すなわち、検水500 mLをポリカーボネート製メンブランフィルター（直径47

mm, 0.22 μ m, 日本ミリポア）で吸引ろ過した。このフィルターを50 mL滅菌コニカルチューブに入れ5 mLの滅菌蒸留水を加え、ボルテックスミキサーで1分間攪拌し、100倍濃縮試料とした。レジオネラ属菌以外の細菌（夾雑菌）の発育を抑制するために、濃縮試料のうち0.5 mLはpH 2.2の0.2 M KCl-HCl（レジオネラ検体用前処理液、極東製薬工業）を等量加え5分間静置し、酸処理試料とした。また、0.5 mLは50℃で20分間処理し、加熱処理試料とした。酸処理試料は200 μ Lを、加熱処理試料は100 μ LをGVPC寒天培地（日水製薬）にコンラージ棒で全面に広げ、試料が吸収されるまで室温で静置した。菌数が多く、濃縮試料では菌数が測定できない場合も想定されるため、検体の原液（非濃縮検体）を用いて、濃縮試料と同様に100 μ LをGVPC寒天培地に塗布して培養した。培地は乾燥しないよう湿潤箱に入れ、35℃で7日間培養した。培養3日目から実体顕微鏡を用いてレジオネラ属菌に特異的に見られるモザイク模様、カットガラス様の形態を斜光法[7]により平板上の発育菌で観察した。

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

血清凝集試験のため、1検体あたり1～10個のBCYE α 寒天培地に発育した菌を用い、病原体検出マニュアルに従い、加熱抗原を作製した[8]。反応はレジオネラ免疫血清（デンカ）および*Legionella* Latex Test Kit（オキソイド）を用い

て実施した。

LAMP 法による遺伝子検査のため、分離株を5%キレックス懸濁液（バイオラッド）に懸濁し、100℃で10 分間加熱処理を行い、遠心（15,000 rpm, 5 分）して得られた上清をDNA 溶液とした。Loopamp レジオネラ検出試薬キット E（栄研化学）を用い、濁度装置 Loopamp EXIA で判定した。本法は定量性がないため、定性試験として遺伝子の増幅が認められた場合、レジオネラ属菌陽性とした。

結果：レジオネラ属菌の検出状況を表1に示した。平板培養法では浴槽水、シャワー水およびカラン水の各3検体からレジオネラ属菌が検出された。検出率は、浴槽水が9.7%であったのに対し、シャワー水は37.5%、カラン水は42.9%であった。LAMP 法による検出率は、浴槽水が51.6%（16/31 検体）、シャワー水が50.0%（4/8 検体）カラン水が71.4%（5/7 検体）であり、例年と同様、平板培養法より高かった。

検出されたレジオネラ属菌の菌数を見ると、浴槽水およびシャワー水は全てが10～99 CFU/100 mL であったのに対し、カラン水の1 検体では100 CFU/100 mL 以上であった（表2）。分離されたレジオネラ属菌の血清群別を実施した結果、浴槽水の2 検体から *L. pneumophila* 血清群 1 が検出された（表3）。平板培養法とLAMP 法の相関を見ると、全体の56.5%（26/46 検体）の検体では、両方の結果が一致した（表4）。2 検体は平板培養法陽性・LAMP 法陰性であり、18 検体は平板培養法陰性・LAMP 法陽性であった。

考察：富山県におけるレジオネラ症患者の感染源は、患者への聞き取り調査などからおおよそ4 割が入浴施設であると推定されるが、感染源の特定には至らない場合がほとんどである。このような背景のなか、これら4 割の患者を減らすため、入浴施設のレジオネラ属菌の調査を継続し、施設の衛生管理を徹底するための資料としている。

県内の浴槽水のレジオネラ属菌検出率は、培養法では9.7%であり、昨年度（9.1%）と同等であった。一方、シャワー水の37.5%、カラン水の42.9%からもレジオネラ属菌が検出され、その値は浴槽水の検出よりも高かった。レジオネラ症は、レジオネラ属菌を含むエアロゾルを吸い込むことで発症することから、エアロゾルが多く発生するシャワーの管理は特に重要である。

遺伝子検査法（LAMP 法）は、全体的に平板培養法よりも陽性率が高かった。この理由として、死菌のDNA を検出している可能性が考えられた。また、培養法の検出下限値である10 CFU/100 mL 未満のレジオネラ属菌が存在した可能性や、生きているが培養できない（viable but non-culturable, VNC）状態のレジオネラ属菌を検出している可能性も考えられた。検出されたレジオネラ属菌の血清群の内訳では、レジオネラ肺炎の原因菌の90%以上を占める *L. pneumophila* 血清群 1 が浴槽水から検出された。このことから、レジオネラ症発生防止のためには、施設への指導が重要であると考えられた。

富山県では2016 年3 月にはレジオネラ症患者発生時における対応要領を制定するなど、入浴施設に対する行政指導を強化しているが、患者数は減っておらず、レジオネラ症対策の難しさを示している。本調査により、入浴施設の水系にはレジオネラ属菌がある一定の割合で生息していることが明らかとなっている。県内の入浴施設の汚染実態を明らかにするため、継続して監視する必要がある。

謝 辞

本研究を実施するにあたり、検体採取にご協力いただきました入浴施設、厚生センターおよび生活衛生課の関係各位に心より感謝いたします。

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

文 献

1. 岡田美香, 河野喜美子, 倉 文明, 他. (2005). 感染症学雑誌, 79, 365-374
2. Nakamura H, Yagyu H, Kishi K, et al. (2003). Intern Med, 42, 806-811
3. 平成 29 年度生活衛生関係技術担当者研修会. 2017 年に広島県内で発生したレジオネラ症集団感染事案について.
<https://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-10900000-Kenkoukyoku/0000194768.pdf?msckid=7f316ecbd0d011ecacef11c37956a6b8> (2024 年 5 月 9 日アクセス可能)
4. 厚生労働省. 静岡市内の入浴施設におけるレジオネラ症患者の集団発生について

- <https://www.mhlw.go.jp/content/10900000/000590890.pdf>
(2024 年 5 月 9 日アクセス可能)
5. 国立感染症研究所 IDWR 速報データ 2023 年第 52 週
<https://www.niid.go.jp/niid/ja/data/12442-idwr-sokuho-data-j-2352.html>
(2024 年 5 月 9 日アクセス可能)
6. 厚生労働省. 「公衆浴場における浴槽水等のレジオネラ属菌検査方法について」の「別添公衆浴場における浴槽水等のレジオネラ属菌検査方法」. 令和元年 9 月 19 日付け薬生衛発 0919 第 1 号
7. 森本 洋. (2010). 日本環境感染学会誌, 25, 8-14
8. 国立感染症研究所, 全国地方衛生研究所. 病原体検出マニュアル レジオネラ症 2020 年 9 月版

表 1. 平板培養法および LAMP 法におけるレジオネラ属菌の検出結果

	陽性数／検体数 (%)			
	平板培養法		LAMP 法	
浴槽水	3／31	(9.7)	16／31	(51.6)
シャワー水	3／8	(37.5)	4／8	(50.0)
カラン水	3／7	(42.9)	5／7	(71.4)

表 2. 平板培養法によるレジオネラ属菌数

菌数 (CFU/100 mL)	検体数		
	浴槽水	シャワー水	カラン水
10未満	28	5	4
10～99	3	3	2
100以上	0	0	1
計	31	8	7

表 3. 分離菌の血清群別の検体数

		浴槽水	シャワー水	カラン水
レジオネラ・ ニューモフィラ	SG 1	2		
	SG 2		1	1
	SG 4	1		
	SG 6		1	1
	SG 8		1	1

表 4. 平板培養法と LAMP 法との相関

		平板培養 (CFU/100 mL)		
		≥10	<10	計
LAMP	+	7	18	25
	−	2	19	21
		9	37	46

富山県における2023年のカルバペネム耐性腸内細菌目細菌感染症の患者発生動向と患者由来株の β -ラクタマーゼ遺伝子保有状況について

齋藤 和輝 池田 佳歩 前西 絵美 木全 恵子
金谷 潤一 磯部 順子 大石 和徳

Surveillance of Carbapenem-Resistant *Enterobacterales* Infectious Diseases and Detection of β -Lactamase Genes from the Isolates in Toyama Prefecture in 2023

Kazuki SAITO, Kaho IKEDA, Emi MAENISHI, Keiko KIMATA,
Jun-ichi KANATANI, Junko ISOBE, and Kazunori OISHI

目的：カルバペネム耐性腸内細菌目細菌 (Carbapenem-Resistant *Enterobacterales*, CRE) 感染症は、メロペネムなどのカルバペネム系薬剤および広域 β -ラクタム剤に対して耐性を示す腸内細菌目細菌による感染症の総称である。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引き起こす。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引き起こし、医療関連感染の原因になることがある。また、無症状で腸管等に保菌される場合がある[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。加えて、2017年3月28日に、厚生労働省健康局結核感染症課長通知が発出され、地域における流行状況を把握するために、CRE感染症の届出があった際には地方衛生研究所等で耐性遺伝子等の試験検査が実施されることになった。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2023年の患者発生動向と、県内医療機関で分離され、当所に搬入されたCRE菌株における β -ラクタム剤分解酵素である β -ラクタマーゼ遺伝子保有状況について報告する。

材料と方法：

1. CRE感染症届出数

富山県および全国の過去6年間のCRE感染症の届出数を集計した。あわせて2023年1～12月

に県内の医療機関から報告されたCRE感染症について菌種別に集計した。

2. CREの β -ラクタマーゼ遺伝子保有状況

県内医療機関で分離され、当所に搬入されたCRE 11株について調査した。腸内細菌目細菌のカルバペネム耐性化に最も寄与するカルバペネマーゼ遺伝子 (IMP型, NDM型, VIM型, KPC型, OXA-48型, GES型) の検出はマルチプレックスPCR法[3]により行った。また、カルバペネマーゼ遺伝子以外の β -ラクタマーゼ遺伝子 (基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ (ESBL) 遺伝子: TEM型, SHV型, CTX-M-1型, CTX-M-2型, CTX-M-8型, CTX-M-9型および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マルチプレックスPCR法にて調査を行った[4,5]。

結果と考察：

1. CRE感染症届出数

富山県及び全国の過去6年間のCRE感染症届出数を表1に示した。2023年は28件の届出があった (速報値)。全国のCRE感染症届出数のうち、本県が占める割合は1%程度であった。また、2018年において全国では2,289件、本県では18件の届出があったが、2019～2021年において全国および本県の届出数はいずれも減少した。2022年以降、全国の届出数は2,000件前後で推移しているのに対して、本県の届出数は増加傾向である。

菌種別では、*Klebsiella aerogenes* (旧名: *Enterobacter aerogenes*) が17株、*Enterobacter cloacae* が4株、*Enterobacter cloacae* complex が

表 1. CRE 感染症の届出数 (2018～2023 年)

診断年	富山県	全 国
2018年	18	2,289
2019年	11	2,333
2020年	13	1,956
2021年	12	2,038
2022年	23	1,965
2023年	28	2,113

表 2. 富山県における菌種別 CRE 感染症届出状況

菌種	届出数 (件)
<i>Klebsiella aerogenes</i>	17
<i>Enterobacter cloacae</i>	4
<i>Enterobacter cloacae</i> complex	2
<i>Citrobacter braakii</i>	1
<i>Escherichia coli</i>	1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1
<i>Serratia marcescens</i>	1
不詳	1
計	28

2 株, *Citrobacter braakii*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens* が各 1 株, 菌種不詳が 1 株であった (表 2)。

2. CRE の β -ラクタマーゼ遺伝子保有状況

2023 年に県内医療機関で分離され, 当所に搬入された CRE 菌株について, カルバペネマーゼ遺伝子および ESBL 遺伝子はいずれも検出されなかった。AmpC β -ラクタマーゼ遺伝子は, EBC 型が *Enterobacter cloacae* complex 1 株から検出された (表 3)。

CRE のカルバペネム耐性はカルバペネマーゼの産生, あるいは外膜タンパクの変化を伴った β -ラクタマーゼの産生量の増加による。CRE の中でもカルバペネマーゼを産生する腸内細菌目細菌

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

謝 辞

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

文 献

1. 病原微生物検出情報<特集> (2019). 40 (2), 1-2
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目細菌 (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, 2017 年 3 月 28 日
3. Watahiki M, Kawahara R, Suzuki M, et al. (2020). Jpn J Infect Dis, 7, 166-72
4. Le QP, Ueda S, Nguyen TNH, et al. (2015). Foodborne Pathog Dis, 12, 719-725
5. Pérez-Pérez FJ, Hanson ND. (2002) J Clin Microbiol, 40, 2153-2162
6. 八木哲也, 松本あかね, 富田ゆうか, 他. (2019). 病原微生物検出情報, 40(2), 24-25

表 3. 富山県におけるCRE 患者分離株の β -ラクタマーゼ遺伝子検出状況 (2023 年)

菌種	検査数/分離数	カルバペネマーゼ遺伝子				
		IMP型	VIM型	NDM型	KPC型	OXA-48型
<i>Klebsiella aerogenes</i> ^{*1}	11/17	0	0	0	0	0
<i>Enterobacter cloacae</i> ^{*1}	1/4	0	0	0	0	0
<i>Enterobacter cloacae</i> complex	2/2	0	0	0	0	0
<i>Citrobacter braakii</i> ^{*2}	0/1	0	0	0	0	0
<i>Escherichia coli</i> ^{*2}	0/1	0	0	0	0	0
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ^{*2}	0/1	0	0	0	0	0
<i>Serratia marcescens</i>	1/1	0	0	0	0	0
不詳 ^{*2}	0/1	0	0	0	0	0

菌種	検査数/分離数	基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ (ESBL) 遺伝子				
		TEM型	SHV型	CTX-M-1型	CTX-M-2型	CTX-M-9型
<i>Klebsiella aerogenes</i> ^{*1}	11/17	0	0	0	0	0
<i>Enterobacter cloacae</i> ^{*1}	1/4	0	0	0	0	0
<i>Enterobacter cloacae</i> complex	2/2	0	0	0	0	0
<i>Citrobacter braakii</i> ^{*2}	0/1	0	0	0	0	0
<i>Escherichia coli</i> ^{*2}	0/1	0	0	0	0	0
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ^{*2}	0/1	0	0	0	0	0
<i>Serratia marcescens</i>	1/1	0	0	0	0	0
不詳 ^{*2}	0/1	0	0	0	0	0

菌種	検査数/分離数	AmpC β -ラクタマーゼ遺伝子					
		MOX型	CIT型	DHA型	ACC型	EBC型	FOX型
<i>Klebsiella aerogenes</i> ^{*1}	11/17	0	0	0	0	0	0
<i>Enterobacter cloacae</i> ^{*1}	1/4	0	0	0	0	0	0
<i>Enterobacter cloacae</i> complex	2/2	0	0	0	0	1	0
<i>Citrobacter braakii</i> ^{*2}	0/1	0	0	0	0	0	0
<i>Escherichia coli</i> ^{*2}	0/1	0	0	0	0	0	0
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ^{*2}	0/1	0	0	0	0	0	0
<i>Serratia marcescens</i>	1/1	0	0	0	0	0	0
不詳 ^{*2}	0/1	0	0	0	0	0	0

*1) 未搬入株含む； *2) 未搬入

令和5年度富山県食品衛生検査の精度管理調査(2023年度) －微生物学的検査－

金谷 潤一 木全 恵子 磯部 順子 齋藤 和輝
池田 佳歩 前西 絵美 大石 和徳

Quality Control of the Bacterial Testing of Foods for Good Laboratory Practice in Toyama Prefecture in the Fiscal Year 2023

Jun-ichi KANATANI, Keiko KIMATA, Junko ISOBE, Kazuki SAITO,
Kaho IKEDA, Emi MAENISHI, 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、1999年から県内の食品衛生検査機関に対して検査水準の維持、向上を目的として精度管理調査を実施している[1]。本年の微生物学的検査の精度管理調査は、牛乳中に添加した生菌数測定および模擬食品（加熱食肉製品 加熱殺菌後包装）中のサルモネラ属菌検査（成分規格 陰性）とした。検査用試料は、衛生研究所で調製後、各検査機関に配布し、各々の検査結果の報告を集計・解析した。

材料と方法：新川厚生センター、中部厚生センター、高岡厚生センター、砺波厚生センター、食肉検査所、富山市保健所および衛生研究所の7機関を対象とし、2023年12月5日～2023年12月14日に実施した。

生菌数測定用の検体（牛乳 10 mL）は、2検体の菌数がそれぞれ 1.3×10^4 CFU/mL（牛乳 A）、 1.3×10^3 CFU/mL（牛乳 B）となるよう枯草菌（栄研化学）を調製し、精製水に添加し作製した。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。

サルモネラ属菌検査用の模擬食品は、市販のコンビーフにサルモネラ属菌の培養液を表1の通り接種して作製した。なお、接種前のコンビーフか

らサルモネラ属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 1.37×10^4 CFU/mL、最大値 1.47×10^4 CFU/mL、最小値 1.25×10^4 CFU/mL であった。SD は 739.9 となり、すべて平均値 ± 2 SD ($1.22 \times 10^4 \sim 1.52 \times 10^4$) の範囲内であった。Z スコアの絶対値もすべて 2 以下で、ばらつき度合いは良好と判断された。各機関の実測値を見ると、標準偏差（SD）は 805.9 となり、機関 No. 1 の 1 回の値が平均値 ± 2 SD ($1.21 \times 10^4 \sim 1.53 \times 10^4$) の範囲を超えた。実測値の Z スコアの絶対値は、ほとんどが 2 以下であったが、機関 No. 1 の 1 回の値が 2 を超えた。

牛乳 B については、報告された測定値の平均は 1.34×10^3 CFU/mL、最大値 1.46×10^3 CFU/mL、最小値 1.22×10^3 CFU/mL であった。SD は 72.1 となり、すべて平均値 ± 2 SD ($1.19 \times 10^3 \sim 1.48 \times 10^3$) の範囲内であった。Z スコアの絶対値もすべて 2 以下で、ばらつき度合いは良好と判断された。各機関の実測値を見ると、標準偏差は 91.4 となり、すべての機関が平均値 ± 2 SD ($1.15 \times 10^3 \sim 1.52 \times 10^3$) の範囲内であった。実測値の Z スコアの絶対値もすべて 2 以下で、ばらつき度合いは良好と判断された。

令和元年度（2019 年度）～令和 4 年度（2022 年度）に継続して参加していた 6 機関においては、生菌数の測定値および実測値の Z スコアを示した（図 1, 2）。測定値については、すべての機関の値が絶対値 2 以下であった。実測値については、機

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	サルモネラ属菌	約 7.2×10 ² CFU/g
模擬食品 D	精製水	0 CFU/g

表 2. 牛乳中の生菌数

A. 牛乳A

機関名	報告値	測定値			実測値		
			偏差	Zスコア		偏差	Zスコア
No. 1	1.25×10 ⁴	12500	-1221.4	-1.65	12000	-1721.4	-2.14
					13000	-721.4	-0.90
No. 2	1.39×10 ⁴	13850	128.6	0.17	14000	278.6	0.35
					13700	-21.4	-0.03
No. 3	1.30×10 ⁴	13000	-721.4	-0.98	13200	-521.4	-0.65
					12800	-921.4	-1.14
No. 4	1.40×10 ⁴	13950	228.6	0.31	14300	578.6	0.72
					13600	-121.4	-0.15
No. 5	1.38×10 ⁴	13800	78.6	0.11	13700	-21.4	-0.03
					13900	178.6	0.22
No. 6	1.47×10 ⁴	14650	928.6	1.26	14600	878.6	1.09
					14700	978.6	1.21
No. 7	1.43×10 ⁴	14300	578.6	0.78	13600	-121.4	-0.15
					15000	1278.6	1.59
平均値 ($\bar{X}$)	1.37×10 ⁴	13721.4			13721.4		
標準偏差 (SD)		739.9			805.9		
X+2SD		15201.1			15333.3		
X-2SD		12241.7			12109.6		

B. 牛乳B

機関名	報告値	測定値			実測値		
			偏差	Zスコア		偏差	Zスコア
No. 1	1.32×10 ³	1320	-16.4	-0.23	1300	-35.7	-0.39
					1340	4.3	0.05
No. 2	1.36×10 ³	1355	18.6	0.26	1320	-15.7	-0.17
					1390	54.3	0.59
No. 3	1.36×10 ³	1355	18.6	0.26	1420	84.3	0.92
					1290	-45.7	-0.50
No. 4	1.30×10 ³	1300	-36.4	-0.51	1290	-45.7	-0.50
					1310	-25.7	-0.28
No. 5	1.46×10 ³	1460	123.6	1.71	1450	114.3	1.25
					1460	124.3	1.36
No. 6	1.22×10 ³	1220	-116.4	-1.61	1210	-125.7	-1.38
					1230	-105.7	-1.16
No. 7	1.35×10 ³	1345	8.6	0.12	1480	144.3	1.58
					1210	-125.7	-1.38
平均値 ($\bar{X}$)	1.34×10 ³	1336.4			1335.7		
標準偏差 (SD)		72.1			91.4		
X+2SD		1480.6			1518.5		
X-2SD		1192.2			1153.0		

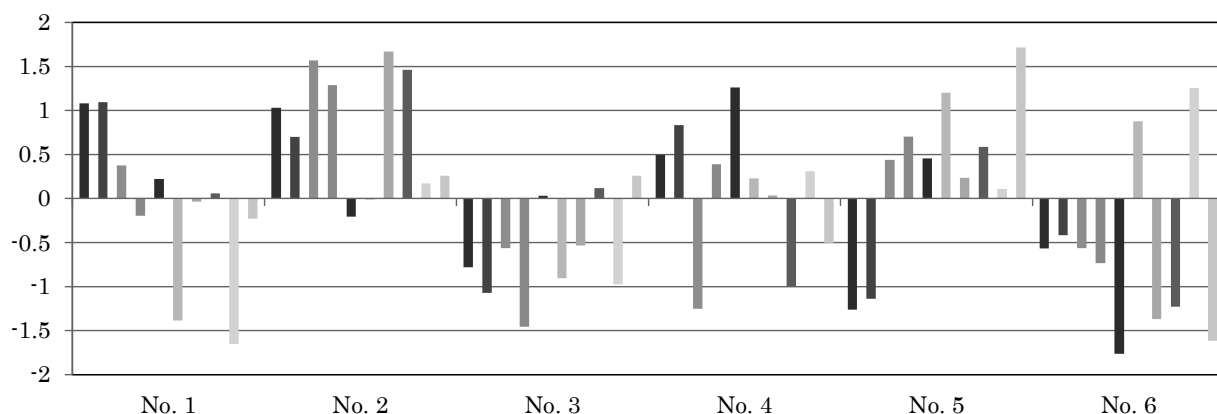


図 1. 各機関における生菌数の測定値のZスコア (R01 ~ R05)

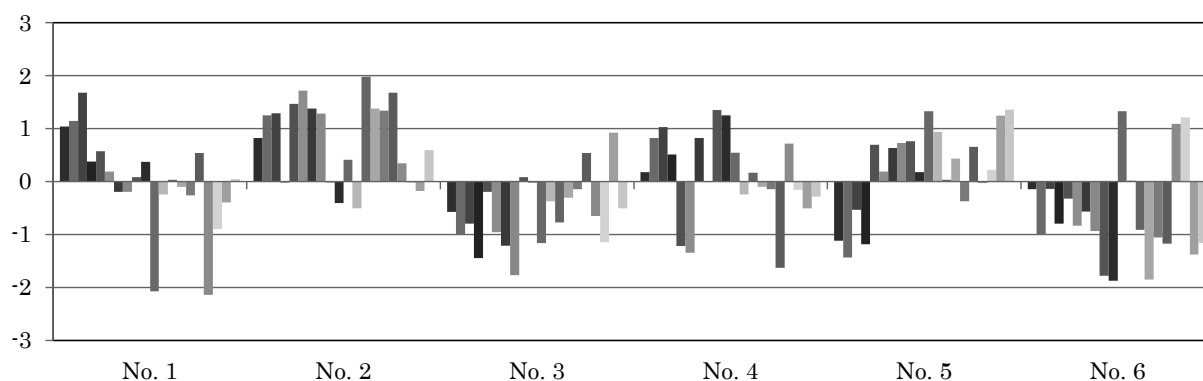


図 2. 各機関における生菌数の実測値のZスコア (R01 ~ R05)

表 3. 模擬食品からのサルモネラ属菌検出

機関名	食品C	食品D
No. 1	陽性	陰性
No. 2	陽性	陰性
No. 3	陽性	陰性
No. 4	陽性	陰性
No. 5	陽性	陰性
No. 6	陽性	陰性
No. 7	陽性	陰性

関 No. 1 の2 回の値が $2 < |Z| < 3$ であった。

サルモネラ属菌検査については、すべての機関が食品 C からサルモネラ属菌を検出できた。一方、精製水のみを接種した食品 D からは、すべての機関でサルモネラ属菌は検出されず、検査精度に問題はなかった (表 3)。

考察：令和元年度 (2019 年度) ~ 令和 4 年度 (2022 年度) において、生菌数の Z スコアをみると、測定値ではすべての機関の値が絶対値 2 以下であった。一方、実測値では 1 つの機関の 2 回の

値が $2 < |Z| < 3$ 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数は多くないため、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。一部の機関では、培地表面に菌

が遊走し、菌数測定が困難となった検体が認められた。昨年度も、複数の機関で同様に菌の遊走が認められた。検体に添加した枯草菌が遊走したと考えられるが、原因は不明である。培地の量や培養時の湿潤の程度によって結露が生じ、菌が遊走した可能性は考えられる。菌の遊走が認められた機関においては、培養時の条件を検討することが望ましい。

サルモネラ属菌による食中毒は、近年は卵を原因とする集団食中毒事件が減少していることから、行政的に検査する機会も減少傾向にある。しかしながら、厚生労働省の食中毒統計資料によると、2023年には全国で25件（患者数655名）のサルモネラ属菌による食中毒が発生している。鶏肉からのサルモネラ属菌の検出率は高く、最も注意しなければならない食中毒原因菌のひとつであることには変わりはない。また、加熱食肉製品（加熱殺菌後包装）や食鳥卵（殺菌液卵）からはサルモネラ属菌が検出されてはいけないこととなっているため、この検査の必要性は高い。

今回、食品Cに接種したサルモネラ属菌は硫化水素を産生しない非定型菌であったため、硫化水素産生性を指標とする培地（MLCB培地、DHL

培地など）ではサルモネラ属菌を鑑別できない。一方、特定酵素基質培地上ではサルモネラ属菌とサイトロバクター属菌の典型的な集落が異なるため、容易に鑑別が可能である。ただし、TSI培地での生化学的性状は硫化水素非産生となることに注意する必要がある。すべての機関において、LIM培地による生化学的性状、O血清群別に加え、その他の生化学的性状試験（オキシダーゼ試験、クエン酸利用能試験、VP試験、ONPG試験、マロン酸利用能試験、API20E test、ラテックス凝集反応試験等）を適宜実施し、サルモネラ属菌を確認していた。非定型的サルモネラ属菌が疑われた際は、その他の生化学的性状試験を実施し、サルモネラ属菌を確認することが望ましい。また、収去検査でサルモネラ属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も望ましい。

文 献

1. 富山県厚生部長通知，薬食1,229号，1998年12月16日

令和5年度富山県水道水質検査精度管理事業 (細菌検査項目)について(2023年度)

池田 佳歩 木全 恵子 前西 絵美 齋藤 和輝
金谷 潤一 磯部 順子 大石 和徳

Quality Control Survey of Bacterial Testing of Drinking Water in Toyama Prefecture in the Fiscal Year 2023

Kaho IKEDA, Keiko KIMATA, Emi MAENISHI, Kazuki SAITO,
Jun-ichi KANATANI, Junko ISOBE, and Kazunori OISHI

目的：富山県では県内の水質検査を実施する検査機関について試験分析技術の向上および検査精度の確保を図るため、「富山県水道水質検査精度管理実施要領」に基づく精度管理を実施している。当所はこの精度管理の細菌検査について検体調製および検査結果の解析を担当している。ここに、2023年度に実施した検査項目「一般細菌」の調査結果について報告する。

材料と方法：

- (1) 検査項目：一般細菌
- (2) 検体等の配付年月日：2023年11月7日
- (3) 参加機関：富山県内で水道水等の水質検査を実施している検査機関で水道事業者、水道用水供給事業者、水道法第20条に規定する登録検査機関および地方公共団体の22機関
- (4) 配付検体：検体配付当日に下記のとおり枯草菌添加液を調製した。

予備試験によりあらかじめ菌数を確認した市販の枯草菌芽胞液 (1.2×10^7 CFU/mL, 栄研化学) をリン酸緩衝希釈液で100倍希釈した。希釈した枯草菌芽胞液を滅菌水に添加し、最終菌数133 CFU/mLの枯草菌添加液4.5 Lを調製した。この枯草菌添加液を150 mLずつ採水ビンに分注し、各機関へ配付した。

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

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

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

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

・棄却評価基準

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

・変動係数 (CV%)

= 各機関の標準偏差 (σ) / $X_2 \times 100$

・範囲 (R) = | 最大値 - 最小値 |

・Xbar-R管理図における管理基準

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

・Zスコア (Z) = $(X - X_2) / \sigma$

・その他の集計項目

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

結果：

(1) 棄却評価

22機関の中央値は140 CFU/mLであり、112 CFU/mL以上、168 CFU/mL以下の範囲から外れた機関はなかった。

(2) 細菌数

22機関より報告された2回の実測値の平均値から、有効数字2桁の菌数を求め、これを測定値 (X) とした。数値の丸め方はJIS Z 8401に従った。各機関の菌数、標準偏差および変動係数 (%) を表1に、測定値 (X) の度数分布 (ヒストグラム) を図1に示した。

22機関全体では、菌数中央値140 CFU/mL、

平均値 139 CFU/mL, 標準偏差は9.7 CFU/mL, および変動係数は2.19%(最小 0.00%, 最大 5.36%)であった。

22 機関の測定値 (X) を用いて Xbar-R 管理図を作成した (図 2)。評価の妥当な管理範囲として、菌数は平均値 (Xbar) $\pm 2\sigma$ から計算される、即ち LCL (120 CFU/mL) ~ UCL (158 CFU/mL) 内に、22 機関のうち 20 機関は収まったが、機関 u,v については、UCL 値を超え、管理外となった。R 管理図における UCL (上方管理限界) は 19.9 であり、22 機関すべて管理範囲内であった (図 2)。

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

(3) その他

滅菌脱イオン水の温度は、機関到着時の平均は 12.3℃ (最大 20.0℃, 最小 4.7℃), 検査開始時の平均は、9.8℃ (最大 20.1℃, 最小 3.8℃) であった。機関毎に報告された滅菌脱イオン水の温度については、図 4 に示した。検体配付から検査開始に至る時間の平均は、3.9 時間 (最大 7 時間, 最小 37 分) であった (図 5)。全機関が、検査方法告示 [1] で規定された時間内 (採水から 12 時間以内) に検査を行った。検査に使用した標準寒天培

地の製造元については、栄研化学が 11 機関、日水製薬が 7 機関、島津ダイアグノスティクスが 2 機関、関東化学および日研生物が各 1 機関であった (図 6)。担当者の業務経験年数については、最小 0 年, 最大 26 年で、うち 3 年以内の担当者が 11 名であった (図 7)。

考察： 今回の精度管理に用いた枯草菌添加液は、市販の枯草菌芽胞標準液から、最終菌数 133 CFU/mL を目標に調製したものである。参加した 22 機関から報告された菌数について、棄却評価を行ったところ、棄却されたところはない。細菌数の平均値度数分布についても、正規分布に近い山型を示した (図 1)。今回、業務経験年数 (図 7) が 3 年以内の担当者が半数を占めたが、業務経験年数と結果に関連性はなかった。

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

文 献

1. 厚生労働省 (2003). 平成 15 年 7 月 22 日厚生労働省告示第 261 号

表 1. 一般細菌 結果

機関ID	実測値 n1	実測値 n2	測定値	測定値 (X)	各機関内 標準偏差	各機関 変動係数 (%)
a	122	124	123	120	1.0	0.83
b	124	126	125	120	1.0	0.83
c	122	134	128	130	6.0	4.62
d	129	134	132	130	2.5	1.92
e	126	137	132	130	5.5	4.23
f	131	137	134	130	3.0	2.31
g	134	138	136	140	2.0	1.43
h	139	135	137	140	2.0	1.43
i	135	138	137	140	1.5	1.07
j	134	140	137	140	3.0	2.14
k	131	145	138	140	7.0	5.00
l	136	141	138	140	2.5	1.79
m	134	141	138	140	3.5	2.50
n	138	140	139	140	1.0	0.71
o	140	143	142	140	1.5	1.07
p	142	142	142	140	0.0	0.00
q	141	143	142	140	1.0	0.71
r	136	151	144	140	7.5	5.36
s	140	149	144	140	4.5	3.21
t	149	153	151	150	2.0	1.33
u	163	151	157	160	6.0	3.75
v	155	161	158	160	3.0	1.88
機関数				22		
中央値 (cfu/mL)				140		
平均 (Xbar, cfu/mL)				139		
標準偏差 (σ, cfu/mL)				9.7		
全機関変動係数 (%)				2.19		

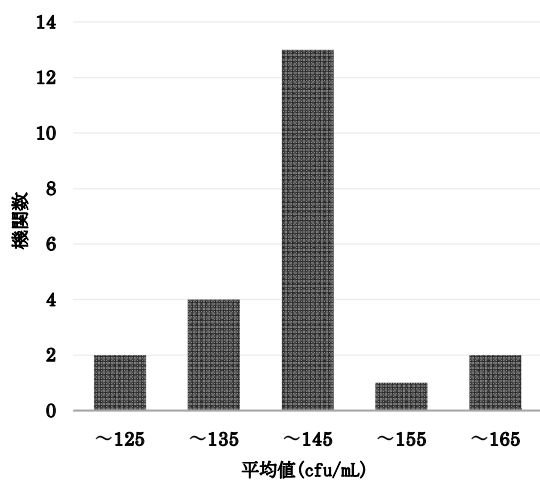


図 1. 一般細菌 [測定値 (x)] の度数分布

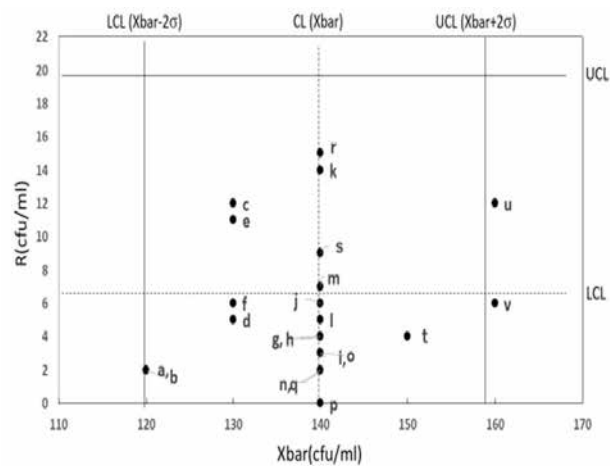


図 2. 一般細菌数 Xbar-R 管理図

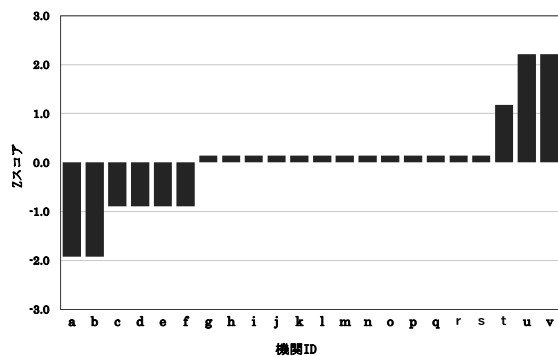


図 3. Zスコアによる機関順位

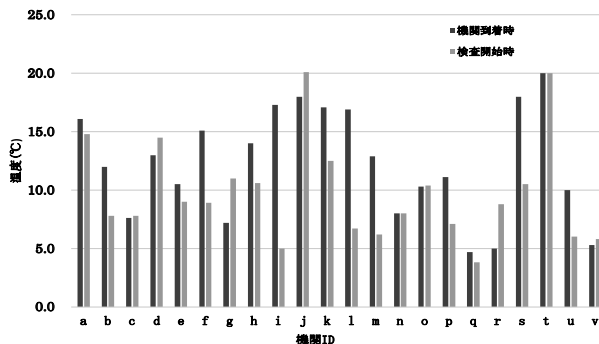


図 4. 機関到着時および検査開始時の滅菌脱イオン水の温度

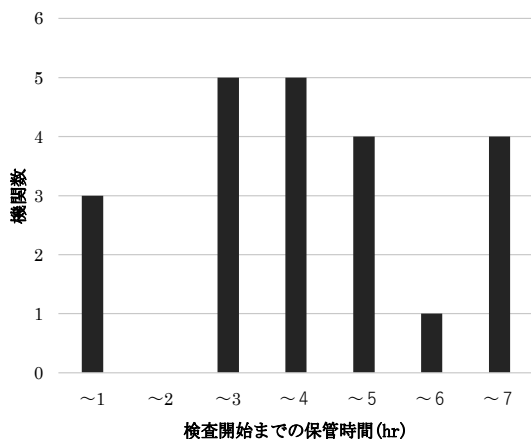


図 5. 検体受け取りから検査開始までの保管時間

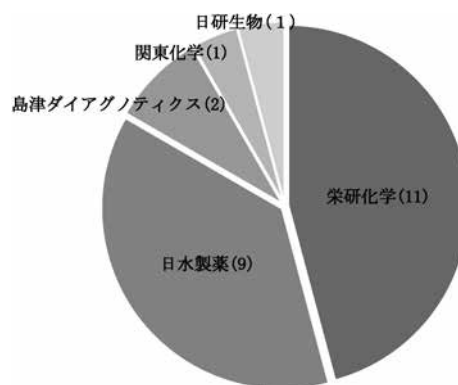


図 6. 使用した寒天培地の製造元

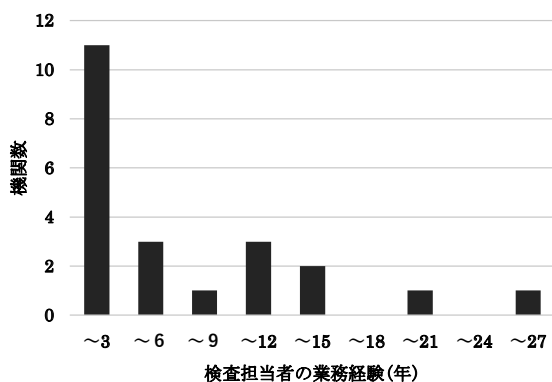


図 7. 検査担当者の業務経験年数の分布

令和5年度富山県病原体等検査の精度管理調査(2023年度)
ー腸管出血性大腸菌, サルモネラ属菌, 赤痢菌, カンピロバクターの検査ー

木全 恵子 磯部 順子 金谷 潤一 齋藤 和輝
池田 佳歩 前西 絵美 大石 和徳

Quality Control of the Bacterial Testing of Pathogen in Toyama Prefecture in 2023
-Test of Enterohemorrhagic *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Shigella*, and *Campylobacter*-

Keiko KIMATA, Junko ISOBE, Jun-ichi KANATANI, Kazuki SAITO,
Kaho IKEDA, Emi MAENISHI, 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（2016年度）より実施している。令和5年度（2023年度）の調査は、腸管出血性大腸菌、サルモネラ属菌、赤痢菌、カンピロバクターを対象項目とした。検査用試料は、衛生研究所で培地に上述の菌いずれか1種類を接種し、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：県内6機関を対象とし、2023年12月5日～2024年1月19日に実施した。

配布試料を便検体とみなし、腸管出血性大腸菌、サルモネラ属菌、赤痢菌、カンピロバクターのいずれかを疑う菌を分離・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 腸管出血性大腸菌	O111 : HNM (Hg8) VT1,2
B 腸管出血性大腸菌	O165 : HNM (Hg25) VT2

検査法は各機関の検査実施標準作業書（SOP）等に準拠して行い、検査終了後は、検体はSOPに従い、滅菌廃棄した。

結果：全ての機関が、試料Aを大腸菌O111（VT1,2）、試料Bを大腸菌O165（VT2）と正しく回答した。

各機関が、今回の分離培養に用いた培地の種類を表2に示した。上記の4種類の腸内細菌の分離について、選択性の異なる培地を複数組み合わせ

て使用していた。

以下の通り、提出された記録から詳細を解析した結果を示す。

表2 各参加機関で使用した培地

機関	培地
A	クロモアガーサルモネラ寒天培地 CT-クロモアガーSTEC寒天培地 DHL寒天培地 mCCDA培地 SS寒天培地 スキロー寒天培地
B	クロモアガーサルモネラ寒天培地 CT-SMAC寒天培地 DHL寒天培地 クロモアガーSTEC寒天培地 SSB寒天培地 クロモアガーSTEC寒天培地 SS寒天培地 (サブリメント非添加) TSA寒天培地 CCDA培地
C	クロモアガーサルモネラ寒天培地 CT-クロモアガーSTEC寒天培地 DHL寒天培地 クロモアガーSTEC寒天培地 SS寒天培地 (サブリメント非添加) CT-SMAC寒天培地 CCDA培地
D	クロモアガーサルモネラ寒天培地 CT-SMAC寒天培地 DHL寒天培地 CT-RMAC寒天培地 SS-SB寒天培地 CT-SBMAC寒天培地 SS寒天培地 クロモアガーSTEC寒天培地 マッコンキー寒天培地 クロモアガーO157寒天培地 RMAC寒天培地 mCCDA培地 SBMAC寒天培地
E	クロモアガーサルモネラ寒天培地 クロモアガーSTEC寒天培地 DHL寒天培地 クロモアガーO157寒天培地 SS-SB寒天培地 BDキャンピロバクター血液寒天培地 CT-SMAC寒天培地 mCCDA培地
F	クロモアガーサルモネラ寒天培地 CT-クロモアガーSTEC寒天培地 DHL寒天培地 mCCDA培地 SS寒天培地

(1) 腸管出血性大腸菌（EHEC）

使用培地：使用した培地名と分離されたコロニーの色調を表3-1に示す。各機関で使用した選択分離培地の組み合わせは異なっていたが、酵素基質培地であるクロモアガーSTEC寒天培地は全ての機関で使用されていた。クロモアガーSTEC寒天

培地は、腸管出血性大腸菌を分離するための選択分離培地で、EHECの血清型や糖の代謝能に関わらず、コロニーが藤色～紫色を呈するため汎用性が高い。

セフェキシム・亜テル酸塩 (CT) またはクロモアガーSTEC寒天培地付属のサプリメントは夾雑菌の発育を抑制し、EHECの選択性を高める添加剤である。今回の調査では、全ての参加機関が、CTを添加した培地を使用した (CT-SMAC寒天培地：4 機関、CT-RMAC寒天培地：1 機関、CT-SBMAC寒天培地：1 機関、CT添加クロモアガーSTEC寒天培地：3 機関)。また、3 機関が付属のサプリメントを添加したクロモアガーSTEC寒天培地を使用した。

一方、全ての機関でCT非添加の培地も使用された (DHL寒天培地：6 機関、付属のサプリメント非添加のクロモアガーSTEC寒天培地：2 機関、クロモアガーO157寒天培地：2 機関、CT非添加SMAC寒天培地、RMAC寒天培地、SBMAC寒天培地：各1 機関)。検体Bの大腸菌はCT感受性で、サプリメントやCTを含まない培地でのみコロニーの生育が認められた。

作製した培地について、3 機関が陽性コントロールとしてEHEC保存株を培養し、培地の性能を確認していた。また、分離培地の培養温度は未記載の1 機関を除き35℃～36℃であった。

性状確認試験：全ての機関で性状確認試験に用いられた培地は、TSI、LIM、VP、MR、シモンズのクエン酸培地、およびCLIG (MUGの β グルクロニダーゼ産生性を含む) であった (表3-2)。その他に性状確認試験として、SIM培地による硫化水素産生性・インドール・運動性確認試験 (1 機関)、ソルビトール代謝試験 (3機関)、酢酸ナトリウム培地による酢酸代謝試験 (1機関)、アピ20Eによる菌種同定試験 (1機関)、メラー培地によるリジン脱炭酸試験 (1機関) を実施していた。また、確認培地および添加試薬について、確認培地の性能試験 (陽性コントロール EHEC, 1 機関)、調製したVP試薬の性能試験 (陽性コントロール菌 セレウス菌, 1 機関) が実施されていた。

生化学性状試験では、おおむね生化学性状は一致していたが、ガス産生性および運動性の有無について不一致がみられた (表3-2)。

遺伝子検査：6 機関の遺伝子検査法は、リアルタイムPCR (4 機関)、コンベンショナルPCR (1 機関)、LAMP法 (1 機関) であった。どの機関もペロ毒素を型別するプライマーを使用し、型別ま

で実施した。全ての機関で陽性・陰性対照について同様の試験を実施しており、結果はすべて正しかった。

血清型別試験：大腸菌のO群別について、すべての機関が正しく回答した。

検体Aの大腸菌O111は生菌による試し凝集が見づらいため、判定しにくいという指摘があった。大腸菌の菌体の周囲に形成された莢膜様物質はO群免疫血清との凝集反応を阻害するため、生菌による試し凝集が検出されない場合がある。このため、大腸菌のO群別は、菌体の周囲に形成された莢膜様物質を不活化した加熱死菌を用いて最終判定を行う。全ての機関は加熱死菌を用いてO群別の最終判定を行った。

(2) サルモネラ属菌および赤痢菌

サルモネラ属菌および赤痢菌の分離培養には全機関が複数の選択性の異なる培地 (DHL寒天培地、SS寒天培地・SS-SB寒天培地 (栄研化学)、SSB寒天培地 (日水製薬・島津ダイアグノスティクス)、マッコンキー寒天培地、およびクロモアガーサルモネラ培地等) を併用していた (表4)。2 機関はサルモネラ属菌および赤痢菌について、保存株を用いた分離培地の性能確認を行っていた。赤痢菌のコロニーは、クロモアガーサルモネラ培地を除く上記の培地で、乳糖非代謝性を示す半透明の色調を示す。また、サルモネラ属菌のコロニーは、マッコンキー寒天培地を除く上記の培地で硫化水素産生性の黒変を示す。選択性が強いSS寒天培地では一部のサルモネラ属菌や赤痢菌の発育が阻害されることがある。このため、参加機関では、SS寒天培地に比べて選択性がやや弱いSS-SB寒天培地、SSB寒天培地、選択性が弱いDHL寒天培地・マッコンキー寒天培地など、複数の選択分離培地が使用されていた。また、サルモネラ属菌には硫化水素産生性が弱い菌も存在する。このため、硫化水素産生性を指標とする上記の培地以外に、酵素基質培地クロモアガーサルモネラ培地を全ての機関が使用していた。クロモアガーサルモネラ培地では、サルモネラ属菌は藤色を呈する。

参加機関は全て、検体Aおよび検体Bではこれらの培地でサルモネラ属菌および赤痢菌が疑われるコロニーの生育は認められず、サルモネラ属菌および赤痢菌は陰性と回答していた。しかし、結果の記載に関して、各機関でばらつきがみられた。機関Aは用いた培地全てでサルモネラ属菌

表 3-1 腸管出血性大腸菌検査 使用培地およびコロニー色調

機関	培地	培養温度	培養時間	コロニー色調	
				検体A	検体B
A	CT-クロモアガー-STECC寒天培地	35℃	22.1時間	藤色	生育なし
	DHL寒天培地			赤	赤
B	CT-SMAC寒天培地	36℃	19.8時間	ピンク	生育なし
	クロモアガー-STECC寒天培地			藤色	生育なし
	クロモアガー-STECC寒天培地（サプリメント非添加）			藤色	藤色
	DHL寒天培地			ピンク	ピンク
	TSA寒天培地			白	白
C	CT-SMAC寒天培地	35℃	20.2時間	ピンク	生育なし
	CT-クロモアガー-STECC寒天培地			紫	生育なし
	クロモアガー-STECC寒天培地（サプリメント非添加）			紫	紫
	DHL寒天培地			赤	赤
D	CT-SMAC寒天培地	35℃	24時間	ピンク	生育なし
	CT-RMAC寒天培地			ピンク	生育なし
	CT-SBMAC寒天培地			透明	生育なし
	クロモアガー-STECC寒天培地			紫	生育なし
	クロモアガー-O157寒天培地			紫	青
	RMAC寒天培地			ピンク	透明
	SBMAC寒天培地			透明	透明
	DHL寒天培地			ピンク	ピンク
	マッコンギー寒天培地			ピンク	ピンク
E	CT-SMAC寒天培地	不明	24時間	ピンク	生育なし
	クロモアガー-STECC寒天培地			藤色～紫	生育なし
	クロモアガー-O157寒天培地			藤色～青紫	青
	DHL寒天培地			赤ピンク	赤
F	CT-クロモアガー-STECC寒天培地	35℃	20.3時間	藤色	生育なし
	DHL寒天培地			ピンク	ピンク
検体Bでコロニーの生育がみられなかった培地					

と赤痢菌の陽性コントロール株の培養を行った。機関 A は、クロモアガーサルネラ培地上で赤痢菌のコロニーが白色を呈すること、検体 A・B のクロモアガーサルモネラ培地では当該コロニーが生育しなかったことを確認し、赤痢菌「陰性」と回答した。機関 F は、サルモネラ属菌の判定は DHL 寒天培地、クロモアガーサルモネラ培地、SS 寒天培地の培養結果を、赤痢菌の判定は DHL 寒天培地、SS 寒天培地の培養結果の結果から行ったことを記載していた。その他の機関はサルモネラ属菌・赤痢菌の培養結果を全てひとつにとりまとめて「陰性」と記載していた。通常クロモアガーサルモネラ培地のコロニーでは赤痢菌の判定は行わない（上述の機関 A のように陽性コントロールを併用する場合を除く）ため、結果を記載する場合は、サルモネラ属菌と赤痢菌それぞれについて判定の根拠となった分離平板の種類を記載するべきである。

(3) カンピロバクター

全機関が mCCDA 培地もしくは CCDA 培地を使用し、約 48 時間前後の微好気培養を行って

た（表 5）が、2 機関は微好気培養に使用したアネロパックの Lot および使用期限の記録があった。また、2 機関は上記の選択分離培地のほかにスキロー寒天培地もしくは BD キャンピロバクター血液寒天培地を併用していた。今回の 2 検体ではカンピロバクターが疑われるコロニーの生育は認められず、カンピロバクターは陰性と回答されており、全ての機関の結果は正しかった。

考察：本年度は複数の菌種を検査項目とする精度管理調査を行った。全ての機関は、それぞれの菌種について分離培地の選択性を考慮した検査を行っていた。参加した機関は、サルモネラ属菌では硫化水素産生を指標とする寒天培地と酵素基質培地、赤痢菌では選択剤の強さを考慮した培地を組み合わせ使用していた。また、EHEC では選択剤 CT 感受性の株の可能性を考慮し、検査には CT 等の選択剤を含まない培地を使用していた。

今回の精度管理では分離した EHEC の菌株の生化学性状について、運動性やガス産生性などの結果にばらつきがみられた。これらの表現型は、同じ菌株でもコロニーごとに異なることがある。ま

表 3-2 腸管出血性大腸菌検査 分離株の生化学性状

機関	TSI	LIM	SIM	シモンズ クエン酸培地	VP	MR	CLIG	MUG	ソルビトール	その他
<u>検体A O111 : HNM (Hg8) VT1,2</u>										
A	A/AG	- + + _w		-	-	+	-/AG	+	+	
B	A/AG	- + -		-	-	+	-/AG	+		酢酸ナトリウム培地試験
C	A/AG	- + + _w		-	-	+	-/AG	+		
D	A/AG	- + -		-	-	+	-/A-	+	+	
E	A/AG ^{*1}	- + -	- + -	-	-	+	-/A ガス不明 ^{*2}	+		API 20E E.coli 86.2%
F	A/AG	- + +		-	-	+	-/AG	+	+	メラーリジン培地使用
<u>検体B O165 : HNM (Hg25) VT2</u>										
A	A/A-	- + -		-	-	+	-/A-	+	+	
B	A/A-	- + -		-	-	+	-/A-	+		酢酸ナトリウム培地試験
C	A/A-	- + -		-	-	+	-/A-	+		
D	A/A-	- + -		-	-	+	-/A-	+	+	
E	A/A-	- + -	- + -	-	-	+	-/A ガス不明 ^{*2}	+		API 20E E.coli 99.1%
F	A/A-	- + -		-	-	+	-/A-	+	+	メラーリジン培地使用
未実施										

*1 : DHL寒天培地由来コロニーではA/A-

*2 : ガスの産生性について未記載

た、後述のとおり、培養条件や接種方法によってもその表現型が異なることがある。

大腸菌の運動性は培地の種類や培養温度等によって変化することがある（国立感染症研究所ではクレイギー管を入れた半流動培地等で30℃、最大72時間まで培養し、運動性を判定している）。また、大腸菌の運動性はLIMやSIM培地の高層部分で判定するが、古い培地では運動性が観察されないことがある。

大腸菌のガス産生性はTSI・CLIGの高層部分で判定するが、①培地が古い、②接種した菌量が少ない、③高層部分の底まで白金線で刺して植えていないなどの原因でガス産生性が見づらい、観察できない場合がある。このため、これらの表現型の試験では、接種や培養条件に留意し、培養条件を記録しておくことが重要である。また、運動性やガス産生性を確認する性状試験培地（LIM, TSI, CLIG）はできる限り新しい培地を使用するのが望ましい。

菌培養時に、培地の性能、培養条件等を確認するため、陽性対照を置くことが望まれる。本調査では、各菌種の分離培養について陽性対照の記載

があったのは2～3機関であった。特にEHECではCT感受性株などで、菌の発育が認められなかった場合に培地性能を保証するため、陽性コントロールを置くことが望ましい。

検体Aで使用したEHEC O111は生菌による試し凝集が困難な菌株であった。上記の試し凝集が困難なEHECが疑われるコロニーの場合、PCR等によるベロ毒素遺伝子検出スクリーニングが、コロニーのEHEC同定で有効な手段となる。

精度管理調査は、正しく結果を出すことも重要であるが、検査の過程の判断根拠や記録など、ルーチン業務の中では気が付かない点を再認識する機会でもある。本調査では、培養温度が未記載の機関があったが、後日、使用したふ卵器や温度が確認できるよう記録は必要である。また今回の調査では、EHEC同定およびベロ毒素遺伝子検査を行った際の準拠となったSOPについてSOP No.等を記載していたのは3機関であった。3類感染症の診断に係る検査において、準拠となったSOPの記録、SOPと異なる手順を行った場合の記録および検査部門責任者への報告は検査ノートに記録しておくことは重要である。

表 4 サルモネラ属菌・赤痢菌検査

機関	培地	培養温度	培養時間	検体A			検体B		
				コロニーの色	サルモネラ属菌判定	赤痢菌判定	コロニーの色	サルモネラ属菌判定	赤痢菌判定
A	クロモアガーサルモネラ寒天培地	35℃	22.1時間	水色	陰性	陰性	水色	陰性	陰性
	DHL寒天培地			赤	陰性	陰性	赤	陰性	陰性
	SS寒天培地			ピンク	陰性	陰性	ピンク	陰性	陰性
B	クロモアガーサルモネラ寒天培地	36℃	19.8時間	青	陰性	陰性 ^{*1}	青	陰性	陰性 ^{*1}
	DHL寒天培地			ピンク	陰性	陰性	ピンク	陰性	陰性
	SSB寒天培地			ピンク	陰性	陰性	ピンク	陰性	陰性
	SS寒天培地			ピンク	陰性	陰性	ピンク	陰性	陰性
C	クロモアガーサルモネラ寒天培地	35℃	20.2時間	水色	陰性	陰性 ^{*1}	水色	陰性	陰性 ^{*1}
	DHL寒天培地			赤	陰性	陰性	赤	陰性	陰性
	SS寒天培地			赤	陰性	陰性	赤	陰性	陰性
D	クロモアガーサルモネラ寒天培地	35℃	24時間	青	陰性	陰性 ^{*1}	青	陰性	陰性 ^{*1}
	DHL寒天培地			ピンク	陰性	陰性	ピンク	陰性	陰性
	SS-SB寒天培地			ピンク	陰性	陰性	ピンク	陰性	陰性
	SS寒天培地			ピンク	陰性	陰性	ピンク	陰性	陰性
	マッコンキー寒天培地			ピンク	陰性	陰性	ピンク	陰性	陰性
E	クロモアガーサルモネラ寒天培地	不明	24時間	水色	陰性	陰性 ^{*1}	水色	陰性	陰性 ^{*1}
	DHL寒天培地			赤ピンク	陰性	陰性	赤	陰性	陰性
	SS-SB寒天培地			赤	陰性	陰性	赤	陰性	陰性
F	クロモアガーサルモネラ寒天培地	35℃	20.3時間	青	陰性	— ^{*2}	青	陰性	— ^{*2}
	DHL寒天培地			ピンク	陰性	陰性	ピンク	陰性	陰性
	SS寒天培地			ピンク	陰性	陰性	ピンク	陰性	陰性

＊¹ 供試したサルモネラ属菌・赤痢菌の各培地の結果を取りまとめて「サルモネラ属菌・赤痢菌 陰性」と記載

＊² 赤痢菌判定の対象ではないことを明記

表 5 カンピロバクター検査

機関	培地（培養温度）	検体A		検体B	
		コロニー	判定	コロニー	判定
A	mCCDA培地（42℃）	生育なし	陰性	生育なし	陰性
	スキロー寒天培地（42℃）	生育なし	陰性	生育なし	陰性
B	CCDA培地（42℃）	生育なし	陰性	生育なし	陰性
C	CCDA培地（42℃）	生育なし	陰性	生育なし	陰性
D	mCCDA培地（42℃）	生育なし	陰性	生育なし	陰性
E	BDキャンピロバクター血液寒天培地（不明）	白コロニー	陰性	白コロニー	陰性
	mCCDA培地（不明）	生育なし	陰性	生育なし	陰性
F	mCCDA培地（42℃）	生育なし	陰性	生育なし	陰性

富山県における令和5 年度感染症流行予測調査(2023 年度) (ジフテリア, 百日咳, 破傷風)

齋藤 和輝 前西 絵美 木全 恵子 金谷 潤一
池田 佳歩 磯部 順子 大石 和徳

National Epidemiological Surveillance of Vaccine-Preventable Diseases
in Toyama Prefecture in the Fiscal Year 2023 (Diphtheria, Pertussis, and Tetanus)

Kazuki SAITO, Emi MAENISHI, Keiko KIMATA, Jun-ichi KANATANI,
Kaho IKEDA, Junko ISOBE, and Kazunori OISHI

目的：感染症流行予測調査は、予防接種法に基づく定期接種対象疾病について集団免疫の現況把握（感受性調査）および病原体検索（感染源調査）などの調査を行い、各種の疫学資料と合わせて検討し、予防接種事業の効果的な運用を図り、さらに長期的視野に立ち総合的に疾病の流行を予測することを目的とする厚生労働省、国立感染症研究所および都道府県・都道府県衛生研究所等が協力して実施する調査である。富山県において、ジフテリア、破傷風および百日咳を対象とした感受性調査は5 年ごとに実施され、令和5 年度（2023 年度）は実施年であった。

ジフテリアはジフテリア菌によっておこる急性感染症、百日咳は百日咳菌によっておこる急性気道感染症、破傷風は破傷風菌の産生する神経毒による急性中毒疾患である。感染症法では、ジフテリアは二類感染症に、百日咳および破傷風は五類感染症にそれぞれ指定されている。

三種混合ワクチン（DPT）はジフテリア（Diphtheria）、百日咳（Pertussis）および破傷風（Tetanus）の発症や重症化を予防することを目的としたワクチンである。第1 期として、生後3 ヶ月から3 ～8 週間隔で3 回接種し、その後12 ～18 ヶ月の間に4 回目を接種する。さらに第2 期として、11 歳以降に二種混合ワクチン（DT）を接種する。百日咳ワクチンの抗体価は小学校入学前に低下するため、就学前に三種混合ワクチンの追加接種が推奨されている（任意接種）。また、2012 年11 月より、DPT にポリオワクチン（IPV）が加わった四種混合ワクチン（DPT-IPV）が、2024 年4 月よりDPT-IPV にヘモフィルスインフルエンザ菌 b 型ワクチン（Hib）が加わった五種混合ワクチン（DPT-IPV-Hib）がそれぞれ定期接種対

象のワクチンになった。

富山県においては、令和5 年度（2023 年度）に本調査事業に参加し、ジフテリア、百日咳および破傷風を対象に感受性調査を行ったので、その結果を報告する。

材料と方法：

調査対象

2023 年7 月から9 月に、4 つの厚生センター（新川、中部、高岡、砺波）および富山市保健所管内の140 名（0 ～92 歳）について、採血と予防接種歴および罹患歴の調査を行った。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。

血清中の抗体価を測定した対象検体は、0 ～4 歳24 名、5 ～9 歳9 名、10 ～19 歳27 名、20 ～29 歳20 名、30 ～39 歳20 名、40 ～49 歳21 名及び50 歳以上19 名の計140 名であった。なお、これらの各病原体に対する抗体価の検査に用いた血清は同一である。

検査方法

「令和5 年度感染症流行予測調査実施要領」[1]に基づき、以下の通り実施した。

百日咳毒素（PT）および繊維状赤血球凝集素（FHA）に対する抗体価測定は、百日せき抗体EIA「生研」（デンカ）を用いて実施した。コントロール血清として、百日せき抗体コントロールPT「生研」および百日せき抗体コントロールFHA「生研」を用いた。PT とFHA 両方の抗体価が10 EU/mL 以上を抗体陽性（発症防御レベル）

とした。

ジフテリア毒素に対する抗体価測定は、Vero細胞を用いた抗毒素価測定法によって実施した。抗ジフテリア毒素抗体価を測定し、標準抗体に対する相対力価 (IU/mL) で表した。標準抗毒素に対する相対力価が0.1 IU/mL 以上を抗体陽性とした。

破傷風毒素に対する抗体価測定は、破傷風抗体EIA「生研」(デンカ)を用いたEIA法および破傷風抗体測定キット“化血研”(KMバイオロジクス)を用いたKMB法の2通りの手法を用いて実施した。いずれも、陽性対照に対する相対力価が破傷風発症防御の目安とされる0.01 IU/mL 以上を抗体陽性とした。

結果と考察：

1 百日咳

1.1. ワクチン接種歴と罹患歴

検査を実施した140例の集計結果を表1に示す。ワクチン接種歴について、0～19歳ではほ

とんどが3回以上のワクチン接種を行っていた。一方、20歳以上では、ほとんどが接種歴不明であった。百日咳に罹患歴がある検体は、140例中2件で、その他は罹患歴なし(78/140)または不明(60/140)であった。

1.2. PT およびFHA に対する年齢群別抗体価

抗PT抗体価(表2)および抗FHA抗体価(表3)測定結果をそれぞれ以下に示す。全年齢群における抗体陽性率について、抗PT抗体は55.0%、抗FHA抗体は73.6%であった。特に、0～4歳が最も高い陽性率(抗PT抗体：79.2%、抗FHA抗体：91.7%)を示した。抗PT抗体陽性率について、5～9歳で最も低く(33.3%)、10歳以上で上昇に転じた。一方、抗FHA抗体陽性率は、抗PT抗体と比較して高く推移した。

百日咳の定期接種は、11歳から13歳の間に行う2期接種の対象に含まれておらず、定期接種では乳児期の接種が最終となる。本結果において、5～9歳では100%の接種率であったが、

表 1. 百日咳のワクチン接種歴および罹患歴

年 齢 群	検 体 数	ワクチン接種歴							罹患歴			
		未接種	1回	2回	3回	4回以上	回数不明	接種歴不明	接種率（％）	あり	なし	不明
0-4	24				10	12		2	91.7		8	16
5-9	9					9			100.0		2	7
10-19	27	1				24		2	88.9		11	16
20-29	20					1		19	5.0	2	14	4
30-39	20					1		19	5.0		14	6
40-49	21						3	18	14.3		17	4
50-	19	2					1	16	5.3		12	7
計	140	3	0	0	10	47	4	76	43.6	2	78	60

表 2. 血清検体における抗 PT 抗体価

年齢群	検体数	抗百日咳毒素抗体価 (抗PT, EU/mL)										抗体陽性者 (>10 EU/mL)	
		<1	1~4	5~9	10~49	50~99	100~149	150~199	200~499	500~999	1,000~	人数	%
0-4	24				5	16	1	1			1	19	79.2
5-9	9				6	3						3	33.3
10-19	27				15	12						12	44.4
20-29	20				7	13						13	65.0
30-39	20				12	7	1					8	40.0
40-49	21				12	9						9	42.9
50-	19				6	12	1					13	68.4
合計	140		0	0	63	72	3	1	0	0	1	77	55.0

表 3. 血清検体における抗 FHA 抗体価

年齢群	検体数	抗百日咳繊維状赤血球凝集抗体価 (抗FHA, EU/mL)										抗体陽性者 (>10 EU/mL)	
		<1	1~4	5~9	10~49	50~99	100~149	150~199	200~499	500~999	1,000~	人数	%
0-4	24				2	15	4	1		2		22	91.7
5-9	9				1	6			2			8	88.9
10-19	27				7	17	2			1		20	74.1
20-29	20				4	15			1			16	80.0
30-39	20				7	10	3					13	65.0
40-49	21				5	15	1					16	76.2
50-	19				11	6	2					8	42.1
合計	140		0	0	37	84	12	1	3	3	0	103	73.6

抗 PT 抗体および抗 FHA 抗体の抗体陽性者率が低下した。特に、抗 PT 抗体陽性者の割合の低下が顕著であった。加齢による血中抗 PT 抗体の減衰が主な理由として考えられ、この年齢層では百日咳菌に対する集団免疫が減衰している可能性が示唆された。一方で、抗 PT 抗体価は10 歳以上で上昇に転じた。これについては、自然感染等のワクチン定期接種以外の要因が考えられた。

2 ジフテリア

2.1. ワクチン接種歴とジフテリア罹患歴

検査を実施した140 例の集計結果を表 4 に示す。ワクチン接種歴について、0～19 歳ではほとんどが3 回以上のワクチン接種を行っていた。一方、20 歳以上では、ほとんどが接種歴不明であった。ジフテリアに罹患歴がある検体はなく、罹患歴なし (83/140) または不明 (57/140) であった。

2.2. 年齢群別抗毒素抗体保有状況

解析結果を以下の表に示す (表 5)。140 名のうち抗体陽性者の割合は58.6%であった。特に0～4 歳の年齢層において最も高い100%であった。5～9 歳および10～19 歳では抗体陽性者の割合がおおよそ6 割程度まで低下したが、20～

29 歳において上昇に転じた。30～39 歳、40～49 歳および50 歳以上では抗体陽性者の割合は4 割程度まで低下した。

ジフテリアワクチンは、DPT-IPV として接種されている。その接種スケジュールは1 期および2 期に分けられるが、1 期は乳児期に最多で4 回の接種を行う。2 期は11 歳以降にDT の接種を1 回行う。本結果において、0～4 歳および5～9 歳ではワクチン接種率はそれぞれ91.7% および100%であった。一方、抗体陽性者の割合は、0～4 歳および5～9 歳でそれぞれ100% および55.6%であった。5～9 歳で抗体陽性率が低下しており、ジフテリア定期予防接種第2 期のワクチン接種を確実に行うことが、その後の抗体価維持に重要であることが考えられた。また、10～19 歳の年齢層において、DPT-IPV の2 期接種を受けたのは3 名のみであったため、2 期ワクチン接種による10～19 歳の年齢層における抗体陽性率への影響は不明であった。

50 歳以上の年齢群では抗ジフテリア毒素抗体を保有していない人の割合が高く、発症のリスクが高いと考えられる。感染リスクがある国や地域に渡航する場合等には、発症予防のためのワクチン接種が望まれる。

表 4. ジフテリアのワクチン接種歴および罹患歴

年齢群	検体数	ワクチン接種歴							罹患歴			
		未接種	1回	2回	3回	4回以上	回数不明	接種歴不明	接種率 (%)	あり	なし	不明
0-4	24				10	12		2	91.7		16	8
5-9	9					9			100.0		7	2
10-19	27					26		1	96.3		23	4
20-29	20					1		19	5.0		11	9
30-39	20					1		19	5.0		11	9
40-49	21							3	14.3		8	13
50-	19		1				1	18	5.3		7	12
計	140		1	0	0	10	49	4	77	45.0	83	57

表 5. 血清検体における抗ジフテリア抗体価

年齢群	検体数	抗毒素抗体価 (IU/mL)					抗体陽性者 (0.1 IU/mL以上)	
		<0.10	0.10-0.31	0.32-0.99	1.00-3.19	3.20-	人数	%
0-4	24			4	11	9	24	100.0
5-9	9		4		3	2	5	55.6
10-19	27		12	3	3	8	15	55.6
20-29	20		6	10	4		14	70.0
30-39	20		12	6	2		8	40.0
40-49	21		12	8	1		9	42.9
50-	19		12	4	3		7	36.8
合計	140		58	35	27	19	82	58.6

3 破傷風

3.1. ワクチン接種歴および罹患歴

検査を実施した140例の集計結果を表6に示す。ワクチン接種歴について、0～19歳ではほとんどが3回以上のワクチン接種を行っていた。一方、20歳以上では、ほとんどが接種歴不明であった。破傷風に罹患歴がある検体はなく、罹患歴なし（85/140）または不明（55/140）であった。

3.2. 年齢群別抗毒素抗体保有状況

以下にEIA法（表7）およびKMB法（表8）それぞれの結果を示す。EIA法の結果について、140名のうち抗破傷風毒素抗体の抗体陽性者の割合は93.6%であった。0歳から49歳まではおよそ9割以上の人が抗体を保有していた。一方で、50歳以上では78.9%であり、抗体保有率が低くなった。KMB法の結果について、140名

のうち抗破傷風毒素抗体の抗体陽性者の割合は85.7%であった。0～4歳および10～49歳では抗体陽性率がおよそ9割以上であったのに対し、5～9歳では77.8%、50歳以上では42.1%と低くなった。EIA法およびKMB法について、解析方法により抗体陽性率は異なったが、50歳以上で抗体陽性者の割合が下がった点については、同様の傾向であった。

1968年にDPTの集団接種が開始されており、1968年生まれの2023年で55歳である。ワクチンの接種歴調査ではそのほとんどが「不明」であったが、50歳以上において、他の年齢群と比較して抗体価が低いことと、集団接種によるワクチン接種の関係に矛盾はないものと考えられる。

50歳以上の年齢群では抗破傷風毒素抗体を保有していない人の割合が高く、破傷風発症のリスクが高いと考えられる。感染リスクがある

表6. 破傷風のワクチン接種歴および罹患歴

年齢群	検体数	ワクチン接種歴								罹患歴		
		未接種	1回	2回	3回	4回以上	回数不明	接種歴不明	接種率 (%)	あり	なし	不明
0-4	24				10	12		2	91.7		16	8
5-9	9					9			100.0		7	2
10-19	27					26		1	96.3		23	4
20-29	20					1		19	5.0		12	8
30-39	20					1		19	5.0		12	8
40-49	21						3	18	14.3		8	13
50+	19	1					1	18	5.3		7	12
計	140	1	0	0	10	49	4	77	45.0		85	55

表7. EIA法を用いた血清検体における抗破傷風抗体価の測定

年齢群	検体数	抗毒素抗体価 (IU/mL)						抗体陽性者 (0.01 IU/mL以上)	
		<0.010	0.010-0.031	0.032-0.099	0.100-0.319	0.320-0.999	1.000+	人数	%
0-4	24	1	1	2	3	10	7	23	95.8
5-9	9		1		2	4	2	9	100.0
10-19	27	3	3	2	3	7	9	24	88.9
20-29	20			1	9	8	2	20	100.0
30-39	20	1		1	5	10	3	19	95.0
40-49	21			1	6	11	3	21	100.0
50+	19	4	2	3	2	7	1	15	78.9
合計	140	9	7	10	30	57	27	131	93.6

表8. KMB法を用いた血清検体における抗破傷風抗体価の測定

年齢群	検体数	抗毒素抗体価 (IU/mL)						抗体陽性者 (0.01 IU/mL以上)	
		<0.010	0.010-0.031	0.032-0.099	0.100-0.319	0.320-0.999	1.000+	人数	%
0-4	24		24					24	100.0
5-9	9	2	7					7	77.8
10-19	27	3	24					24	88.9
20-29	20	1	11		3	3	2	19	95.0
30-39	20	1	9	1	3	4	2	19	95.0
40-49	21	2	10		3	4	2	19	90.5
50+	19	11	6	2				8	42.1
合計	140	20	91	3	9	11	6	120	85.7

国や地域に渡航する場合等には、発症予防のためのワクチン接種が望まれる。

今回の調査では、富山県民のジフテリア毒素、破傷風毒素、PT およびFHA に対する抗体保有状況を解析した。これらのデータは、今後、疾病の流行予測、感染予防および効果的な予防接種のために利用され、公衆衛生行政に役立つものと考えられる。

謝 辞

本調査を実施するにあたり、検体採取等にご協力頂いた関係機関各位に深謝致します。

参考文献

1. 厚生労働省 (2023). 令和 5 年度感染症流行予測調査実施要領, 26-28

スイセンおよびイヌサフラン調理品中の自然毒量

堀井 裕子

Natural Toxin Levels in Cooked Narcissus and Colchicum

Yuko HORII

目的：当所では、自然毒による食中毒発生に備えて検査体制の整備を行ってきた。これまでに、食中毒発生事例が多い植物の自然毒を対象として一斉分析法の検討を行い、調理食品においても分析可能であることを報告した [1]。今回は、この方法を用いて食中毒発生数が多いスイセンと死亡事例が発生しているイヌサフランを対象植物とし、これらの未調理品、加熱調理した調理品および調理品の人工胃液消化物を試料として分析を行い、調理等による自然毒成分の変化を調べた。

材料と方法：

- 植物：**スイセン、イヌサフランの葉および鱗茎。いずれも当研究所職員の自宅で栽培したものである。
- 測定対象とした自然毒成分：**自然毒成分として、スイセンはリコリン、ガラントミン、イヌサ

フランはコルヒチン、デメコルシンを測定した。

使用した標準品および標準溶液は前報 [1] のとおりである。

3. 試料の調製：スイセン、イヌサフランを葉と鱗茎に分け、それぞれを包丁で細切し、以下のとおり調理等を行ったものから試料を採取して試験溶液を調製した。

(1) 未調理品：細切した植物の葉と鱗茎それぞれから5 gを採取した。

(2) 調理品

・茹で物（葉のみ）：ビーカーに50 mLの水を入れ、沸騰後、細切植物5 gを入れて蓋をし、15分間茹でた。これを葉と茹で汁に分け、葉は全量を採取し、茹で汁は全量から5 gを採取した。

・煮物（葉、鱗茎）：ビーカーにだし醤油（市販の希釈用だし醤油を煮物用に4倍希釈したもの）10 mLと細切植物5 gを入れ、沸騰後弱火にし、蓋をして5分間煮た。葉の煮物は葉と煮汁に分けて葉は全量を採取し、煮汁は全量から5 gを採取した。鱗茎の煮物は、煮物全体を均一になるように混和し5 gを採取した。

・炒め物（葉、鱗茎）：アルミ皿に細切植物5 g、植物油1 gを入れ、210℃のホットプレートで3分間加熱し、全量を採取した。

(3) 消化物：調理品の炒め物にペプシン含有人工胃液100 mLを加え、37℃の水浴中で振とうしながら加温し、30分、1時間、3時間後に固形分の全量を採取した。

ペプシン含有人工胃液は日本薬局方溶出試験法の溶出試験第1液 [2]（塩化ナトリウム2.0 gを塩酸7.0 mL及び水に溶かして1,000 mLとしたもの）にペプシン（1:10,000）（ブタ胃粘膜由来：富士フイルム和光純薬(株)製）を0.1%濃度で加えたものを用いた。

4. 試験溶液調製（図1）：試験溶液の調製法は図1のとおりである。使用した試薬および調製法の詳細は既報で示した [3]。

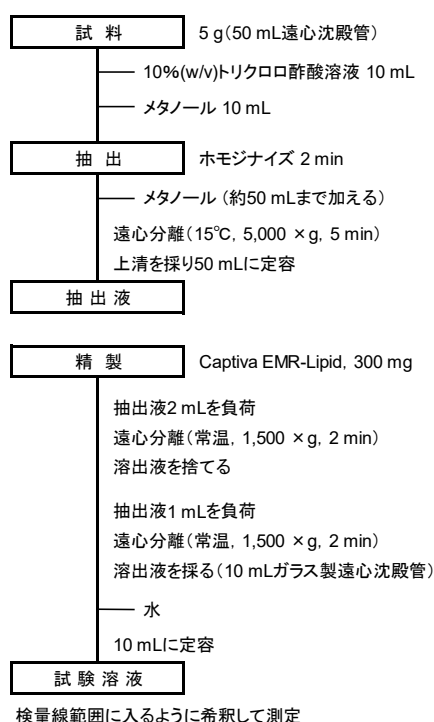


図1. 試験溶液調製法

表 1. 分析装置及び測定条件

HPLC条件	
装置	: Waters ACQUITY UPLC H-Class
分析カラム	: ACQUITY UPLC HSS T3 (2.1 mmI.D.×100 mm, 1.8 µm)
移動相A	: 5 mMギ酸アンモニウム水溶液
移動相B	: メタノール
流速	: 0.3 mL/min
グラジエント条件	: A液99% (0分)→40% (3分)→35% (5分)→1% (5.5分, 4.5分間保持)→99% (10分, 5分間保持)
カラム温度	: 40℃
注入量	: 5 µL
MS/MS条件	
装置	: Waters Xevo TQ-S micro
イオン化法	: ESI(+)
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℃
コーンガス流量	: 50 L/hr
ソース温度	: 150℃
測定イオン	: リコリン m/z 288.2 > 147.0, m/z 288.2 > 119.0
	: ガランタミン m/z 288.2 > 213.1, m/z 288.2 > 198.1
	: コルヒチン m/z 400.3 > 326.1, m/z 400.3 > 310.1
	: デメコルシン m/z 372.3 > 310.1, m/z 372.3 > 340.2

5. 装置及び測定条件：装置及び測定条件は表 1 に示した。

結果及び考察：

1. 料理食品の測定結果：表 2 にスイセン調理品中のリコリンおよびガランタミンの測定結果を示す。表中の値は調理に使用した植物量（5 g）中

の各成分の含有量で示した。葉の茹で物と煮物については固形分（葉）と汁を分けてそれぞれについて測定したところ、葉と汁の両方からリコリン、ガランタミンが検出され、両成分が汁に移行していることが確認された。そこで茹で物と煮物については葉と汁に含まれるリコリンまたはガランタミン含有量を各々合計し、合計値を茹で物、煮物の含有量として未調理品と比較したところ、両成分ともに調理により減少していなかった。また、炒め物についても自然毒成分含有量は未調理品と差はなかった。鱗茎では、煮物に粘りがあり固形分と汁の分離が困難だったため全体から試料を採取して測定した。その結果、未調理品と煮物および炒め物でリコリン、ガランタミンの含有量に差はなかった。次に、イヌサフランについて未調理品と調理品に含まれるコルヒチン、デメコルシン含有量を比較したところ（表 3）、スイセンと同様に茹で物、煮物では両自然毒成分は汁に移行するものの、調理品全体では調理前後で含有量の減少はみられなかった。以上のことから、スイセン、イヌサフランの自然毒は調理品においても検出が可能で、全体の量としては調理後も変化しないことが確認された。また、全ての自然毒成分は水中に移行し、茹で物や煮物では汁のみでも検出され

表 2. スイセン調理品中のリコリン、ガランタミン含有量

試 料	N	リコリン		ガランタミン	
		含有量平均 (µg) *	CV (%)	含有量平均 (µg) *	CV (%)
葉	未調理	3 321.5	1.9	66.9	6.4
	茹で物	3 360.6 (葉 64.2 汁 296.4)	4.9	67.7 (葉 11.8 汁 55.9)	2.5
	煮物	3 353.8 (葉 161.4 汁 192.4)	0.9	67.3 (葉 29.7 汁 37.5)	4.3
	炒め物	3 324.1	2.5	61.9	2.8
鱗茎	未調理	3 560.8	12.9	7.5	11.0
	煮物	3 556.0	14.1	7.6	12.5
	炒め物	3 514.4	12.8	6.7	17.3

* 調理に使用した試料5 g中の含有量

表 3. イヌサフラン調理品中のコルヒチン、デメコルシン含有量

試 料	N	コルヒチン		デメコルシン	
		含有量平均 (µg) *	CV (%)	含有量平均 (µg) *	CV (%)
葉	未調理	3 179.5	5.2	589.8	3.6
	茹で物	3 210.1 (葉 20.3 汁 189.8)	3.4	604.6 (葉 71.3 汁 533.3)	5.8
	煮物	3 205.3 (葉 69.0 汁 136.3)	6.2	635.6 (葉 172.0 汁 463.6)	6.4
	炒め物	3 199.5	1.5	563.8	2.8
鱗茎	未調理	2 1532.5	17.3	1024.7	16.6
	煮物	2 1412.5	6.5	1055.8	12.7
	炒め物	2 1650.0	10.6	950.4	2.9

* 調理に使用した試料5 g中の含有量

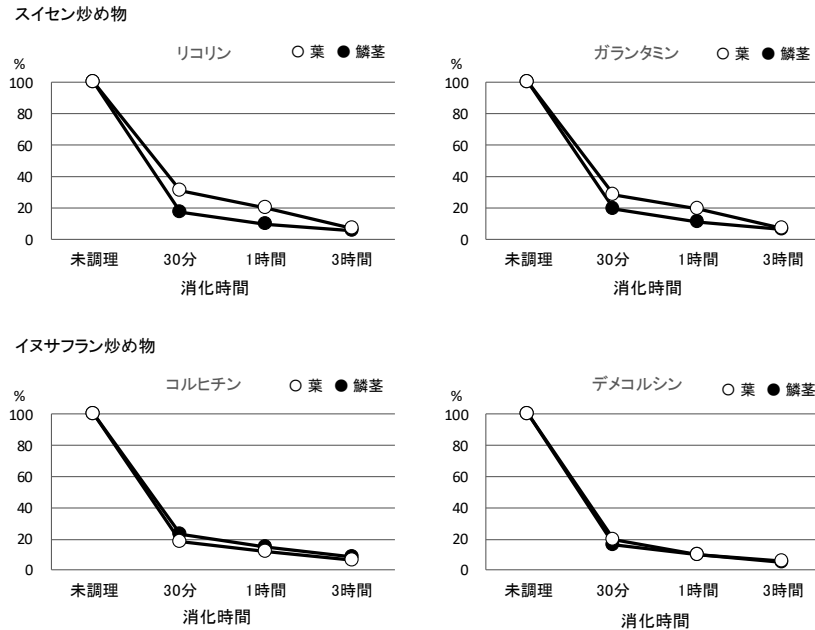


図2. スイセン, イヌサフラン調理食品を人工胃液で消化後の自然毒濃度

たことから、スイセンやイヌサフランの食中毒であれば、発生時の調理残品に原因植物が残っていても、自然毒を検出できる可能性があると考えられた。

2. 消化物の測定結果：スイセンおよびイヌサフランの炒め物を人工胃液で消化し、その固形分（葉および鱗茎の消化物）について自然毒成分を測定し、未調理品に対する残存率を図2に示した。スイセン中のリコリン、ガランタミンおよびイヌサフラン中のコルヒチン、デメコルシンの全ての成分が消化物から検出可能であったが、その残存率は消化時間30分で約20%まで低下し、消化時間が長いほど低値であった。また、1時間消化した固形分のみを採取し、4℃で24時間保存後に自然毒成分を測定したところ、残存率は1時間消化後直ちに測定した試料と差はみられず、試料の冷蔵保存が可能だと思われた。

吐物の模擬試料における自然毒成分検出について、廣田らはツキヨタケ入りのおでんを試料として人工胃液による消化物を調製し、固形分と人工胃液の上澄の両方からツキヨタケの自然毒成分イルジンSが検出されたことを報告している[4]。今回は人工胃液の上澄は測定していないが、スイセン、イヌサフランの調理品では汁のみからも自然毒成分が検出されており、消化物の上澄からも

検出される可能性があると考えられる。

まとめ：植物性自然毒による食中毒発生を想定し、スイセン、イヌサフランの調理品および炒め物の人工胃液消化物を模擬試料として、自然毒成分のリコリン、ガランタミン、コルヒチン、デメコルシンを測定した。その結果、これらの4成分は加熱調理品、消化物のいずれからも検出可能であり、さらに調理品では固形分が含まれない汁からも検出された。以上のことから、自然毒食中毒発生時には原因と推測される植物の残存が不明な食品残品等の試料も含め、幅広く検査試料として利用することが原因究明のために重要だと考えられる。

文 献

- 堀井裕子 (2023). 富山衛研年報, 46, 131-135
- 厚生労働省告示第220号：第十八改正日本薬局方 (2021). 366
- 堀井裕子, 中山恵理子 (2022). 富山衛研年報, 45, 104-106
- 廣田梓, 末永稜典, 菊本弘樹, 他 (2022). 大分県衛生環境研究センター年報, 50, 89-92

令和5年度富山県水道水質検査精度管理事業 (理化学検査項目)について(2023年度)

遊道 梓 健名 智子 安川 和志

Quality Control Survey of Chemical Analysis of Drinking Water in Toyama Prefecture in the Fiscal Year 2023

Azusa YUDO, Tomoko KEMMEI, and Kazuyuki YASUKAWA

目的：富山県では、1996年度より、水質検査機関における試験分析技術及び検査精度の向上を図るため、県内で水道水等の水質検査を実施している検査機関を対象に、「富山県水道水質検査精度管理実施要領」に基づく精度管理事業を実施している。この事業において、当所は配布検体の作製、参加機関から報告されたデータの集計及び解析並びに技術研修を担当している。今回、2023年度に実施した蒸発残留物、塩化物イオンの精度管理事業の調査結果について報告する。

材料と方法：

(1) 検査項目：蒸発残留物、塩化物イオン
(2) 検体の配布年月日：2023年11月7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19機関
(4) 配布検体：蒸発残留物測定用検体は、検体配布前日に同一ロットの市販ミネラルウォーター48L(1.5L容量、32本)を混合し、1L角型ポリビンに分注した。あらかじめ分注した順に3検体を等間隔に抜き出し、蒸発残留物濃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、検体配布の7日後(2023年11月14日)、14日後(2023年11月21日)においても蒸発残留物濃度に変化はなく、配布検体間の濃度のばらつきや測定日の違いによる測定値の差は無視できる範囲であると考えられた。配布に際し、蒸発残留物の濃度範囲は50～500 mg/Lであると明示した。

塩化物イオン測定用検体は、検体配布前日に精製水に、1 mol/L 塩化ナトリウム溶液(容量分析用、富士フイルム和光純薬株式会社製)を2 mL/L(塩化物イオン：70.9 mg/L)添加し15 L調製し、500 mL角型ポリビンに分注した。あらかじめ

め分注した順に3検体を等間隔に抜き出し、塩化物イオン濃度を測定したところ、そのビン間変動係数は0.2%であった。また、検体配布の7日後(2023年11月14日)、14日後(2023年11月21日)においても塩化物イオン濃度に変化はなく、配布検体間の濃度のばらつきや測定日の違いによる測定値の差は無視できる範囲であると考えられた。配布に際し、塩化物イオンの濃度範囲は20～200 mg/Lであると明示した。

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

(6) 集計項目

X ：各機関の測定値、 X_1 ：全機関の中央値、

X_2 ：全機関の平均値、 σ ：全機関の標準偏差

変動係数(CV%) = 各機関の標準偏差 / $X \times 100$

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

範囲(R) = | 最大値 - 最小値 |

Zスコア(Z) = $(X - X_2) / \sigma$

CL：中心線、UCL：上方管理限界線

結果と考察：

(1) 蒸発残留物

蒸発残留物の精度管理には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。解析の結果、誤差率が中央値 $\pm 10\%$ の範囲から外れる機関はなかった。16機関の測定値の平均値 $\pm$ 標準偏差は349.3 $\pm$ 4.1 mg/Lであった。各機関内での併行測定における室内変動係数は0.2～2.1%、16機関間の室内変動係数は1.2%であった。

Xbar-R管理図を図2に示す。A、P機関以外の測定値は平均値 ± 2 標準偏差の範囲(341.1～357.5 mg/L)内に収まった。また、C、O機関の

範囲 R は上方管理限界値 (14.4 mg/L) を超えた。

Z スコアの順位を図 3 に示す。Z スコアの算出には、16 機関の測定値の平均値と標準偏差を用いた。Z スコアの評価基準は、 $|Z| \leq 2$ の場合を「満足」、 $2 < |Z| < 3$ の場合を「疑わしい」、 $3 \leq |Z|$ の場合を「不満足」とした。その結果、A、P 機関が「疑わしい」となった。

参加したすべての機関が測定方法として重量法を用いていた。水質基準に関する省令の規定に基づき厚生労働大臣が定める方法 (告示法) [1] において、蒸発残留物は、試料採取後 2 週間以内に試験することとされている。今回、試料配布日～4 日目までに試験を開始した機関が 12 機関、5～8 日目が 2 機関、9～11 日目が 2 機関だった。

告示法では試料の採取量は 100～500 mL とされており、採取量が 100 mL の機関が 7 機関、200 mL の機関が 7 機関、250 mL の機関が 1 機関、500 mL の機関が 1 機関だった。

蒸発乾固前の蒸発皿は告示法で、105～110℃ で乾燥させると規定されており、すべての機関が告示法どおりの温度で乾燥させていた。また、乾燥時間は 30～180 分だった。蒸発乾固後の蒸発皿については、告示法に 105～110℃ で 2～3 時間乾燥させると規定されており、すべての機関が告示法どおりの乾燥時間・乾燥温度で乾燥させていた。

蒸発乾固については、告示法に水浴上で行うこととされており、すべての機関が水浴を使用していた。水浴に使用した水として精製水を用いた機関が 9 機関、水道水を用いた機関が 7 機関あった。水浴に精製水を用いた場合と水道水を用いた場合の測定値について有意水準 5% で t 検定を行った結果、有意差は認められなかった。本調査では有意差は認められなかったが、水浴に水道水を使用する際は、蒸発皿の外側に水道水由来の蒸発残留物が付着する可能性があるため、水浴から出した後はよく水分をふき取る等の注意が必要である。

蒸発乾固前の蒸発皿の放冷時間と測定値の散布図を図 4、蒸発乾固後の蒸発皿の放冷時間と測定値の散布図を図 5 に示す。蒸発乾固前の蒸発皿の放冷時間は 60～1,080 分、蒸発乾固後の蒸発皿の放冷時間は 60～1,080 分であった。測定値が平均値 ± 2 標準偏差の範囲から外れた A、P 機関は蒸発乾固前の蒸発皿の放冷時間が 990 分、1,080 分、P 機関は蒸発乾固後の蒸発皿の放冷時間が 1,080 分と長い傾向にあった。すべての機関が乾燥剤としてシリカゲルが入ったデシケーター内で蒸発皿

を放冷していたが、デシケーター内の湿度が高い場合、放冷時間が長くなると湿気により蒸発皿の質量が上昇し、測定値に影響を与える可能性がある。本調査では判断は難しいが、デシケーター内の湿度が平均値 ± 2 標準偏差の範囲から外れた要因の一つである可能性も考えられる。検査の際は、シリカゲルの色やデシケーター内の湿度計を確かめ、低湿度に保たれているか確認する必要がある。また、乾燥機からデシケーターへの移動やデシケーターから秤量までのわずかな時間でも吸湿が起こるので、これらの操作は速やかに行うよう注意が必要である。

使用した天秤について、定期的な校正を実施していない機関が 1 機関あった。天秤は測定値に大きく影響を及ぼすため、定期的な校正を行うことが望ましい。また、秤量の際に静電気除去を実施している機関は 6 機関であった。空気が乾燥する時期は静電気が秤量値に影響を及ぼす可能性があるため、静電気除去を実施することは有用である。

(2) 塩化物イオン

塩化物イオンの精度管理には 19 機関が参加した。各機関の測定値を大きさの順に並べて表 2 に、またその度数分布を図 6 に示す。解析の結果、誤差率が中央値 $\pm 10\%$ の範囲から外れる機関はなかった。19 機関の測定値の平均値 $\pm$ 標準偏差は 69.98 ± 1.78 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 0.0～1.6%、19 機関間の室間変動係数は 2.5% であった。

Xbar-R 管理図を図 7 に示す。a、b 機関以外の機関の測定値は平均値 ± 2 標準偏差の範囲 (66.42～73.54 mg/L) 内に収まった。また、g、s 機関の範囲 R は上方管理限界値 (1.39 mg/L) を超えた。

Z スコアの順位を図 8 に示す。Z スコアの算出には、19 機関の測定値の平均値と標準偏差を用いた。a、b 機関が「疑わしい」となった。

参加したすべての機関が測定方法としてイオンクロマトグラフ法を用いており、検出器として電気伝導度検出器を使用していた。4 機関がグラジエント分析をしており、いずれも溶離液ジェネレーターシステムを使用していた。

告示法において、塩化物イオンは、試料採取後 2 週間以内に試験することとされている。今回、試料配布日～4 日目までに試験を開始した機関が 17 機関、5～8 日目が 1 機関、9～11 日目が 1 機関だった。

標準原液として、市販標準原液を使用していた

機関は17 機関，市販混合標準原液を使用していた機関は2 機関だった。

前処理について，1 機関が試料のろ過を実施していなかった。告示法では，イオンクロマトグラフ法の前処理では，ろ過を実施することとなり，当該操作が必要である。本精度管理試料の塩化物イオン濃度は，すべての機関で検量線の最高濃度点よりも高い値であったが，すべての機関が2.5～10 倍の希釈操作を実施し，検量線の範囲内で定量を行っていた。

検量線の作成について，厚生労働省から通知されている水道水質検査方法の妥当性評価ガイドラ

イン（妥当性評価ガイドライン）[2] では，各濃度点の公比が原則 4 以内になるように設定するように記載されているが，公比が4 を超えている機関が 2 機関あった。

文 献

1. 厚生労働省（2003），平成 15 年 7 月 22 日厚生労働省告示第 261 号
2. 厚生労働省（2017），平成 29 年 10 月 18 日付薬生水第 1018 第 1 号

表 1. 蒸発残留物 結果

検査機関	測定値 X (mg/L)	変動係数 CV% (%)	誤差率 E% (%)	範囲 R (mg/L)
A	340.0	0.6	-2.5	5
B	346.6	0.7	-0.6	5
C	346.8	1.7	-0.6	15
D	347.2	0.3	-0.5	3
E	347.8	0.4	-0.3	3
F	348.0	0.4	-0.2	3
G	348.2	0.8	-0.2	7
H	348.8	・・・X ₁ 348.8	0.8	6
I	348.8		0.5	4
J	348.8		1.4	12
K	350.4	0.4	0.5	3
L	350.8	0.2	0.6	2
M	351.2	1.1	0.7	9
N	352.4	0.6	1.0	5
O	353.6	2.1	1.4	20
P	359.4	0.7	3.0	7
機関数	16			
平均値 (mg/L)	349.3 ・・・X ₂			6.8 ・・・CL
標準偏差 σ (mg/L)	4.1			
変動係数 (%)	1.2			

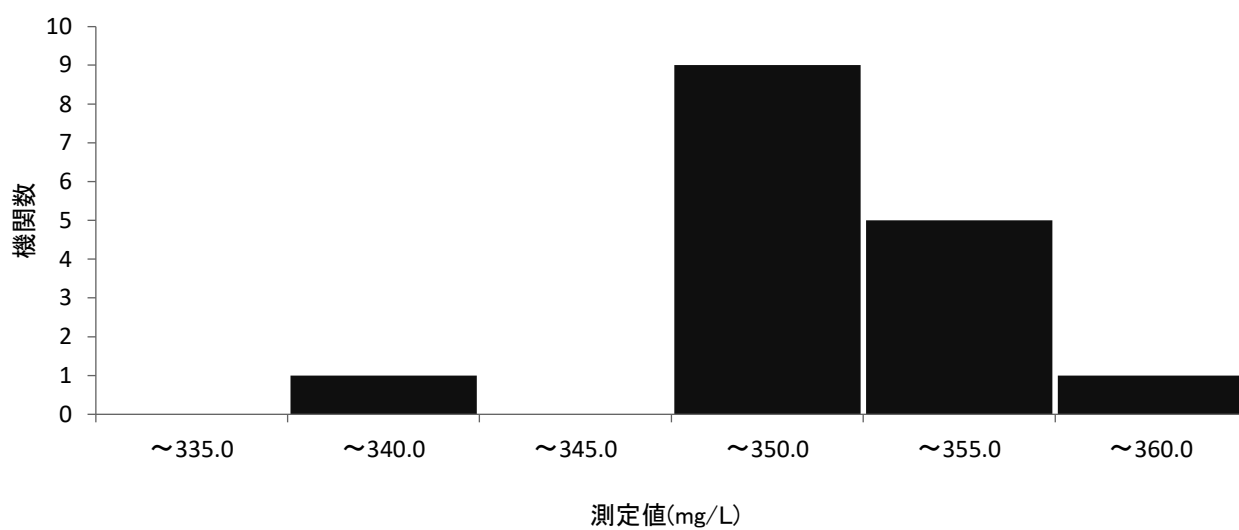


図 1. 蒸発残留物 ヒストグラム

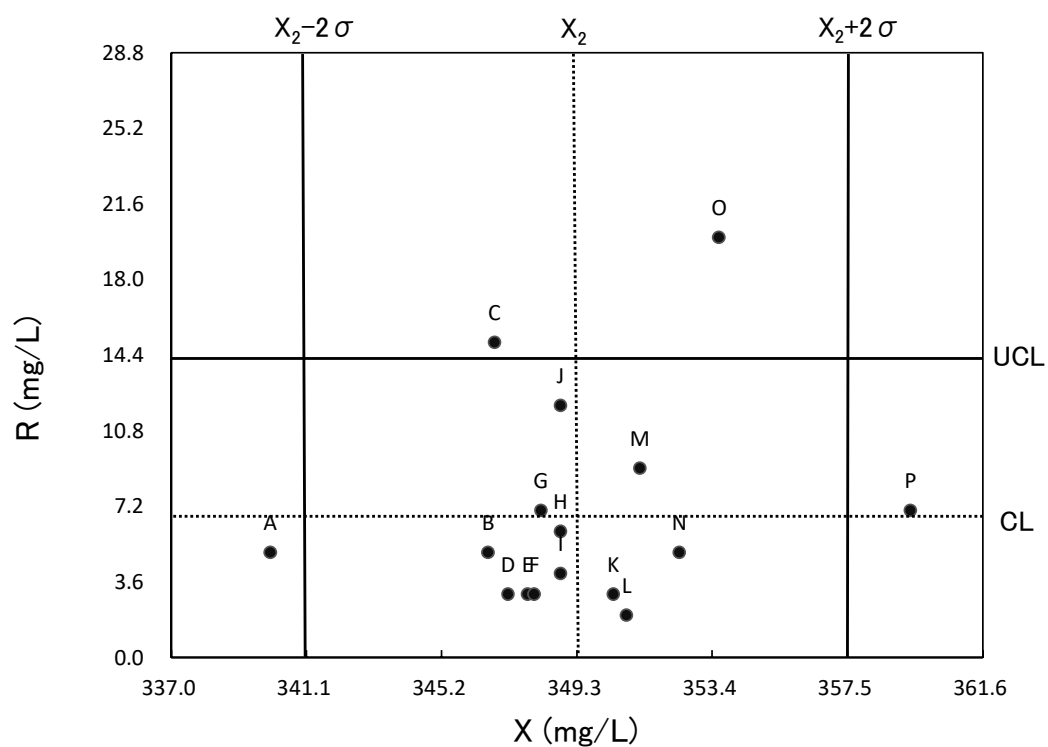


図2. 蒸発残留物 Xbar-R 管理図

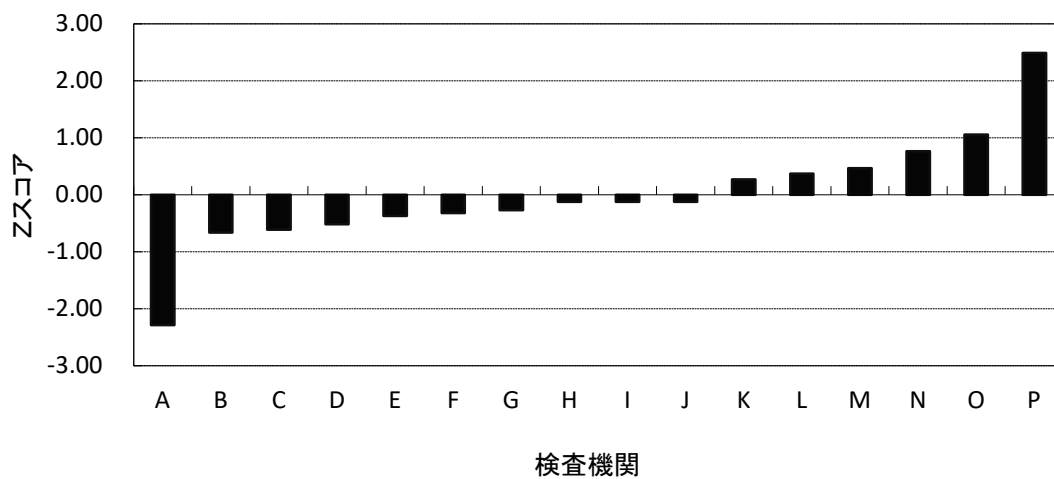


図3. 蒸発残留物 Zスコアの順位

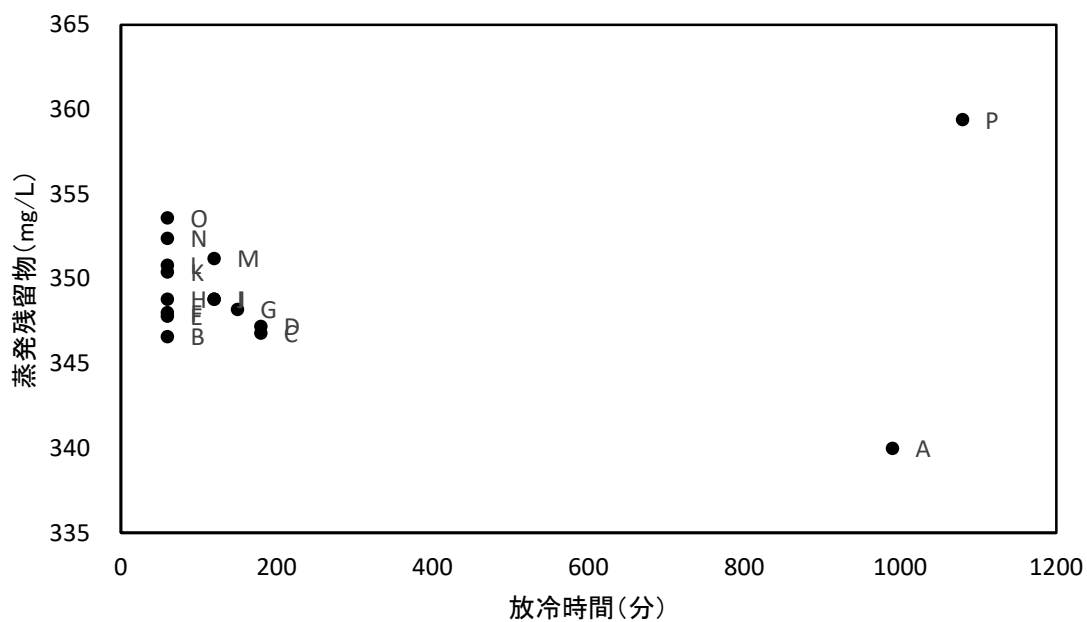


図4. 蒸発乾固前の蒸発皿の放冷時間と測定値の散布図

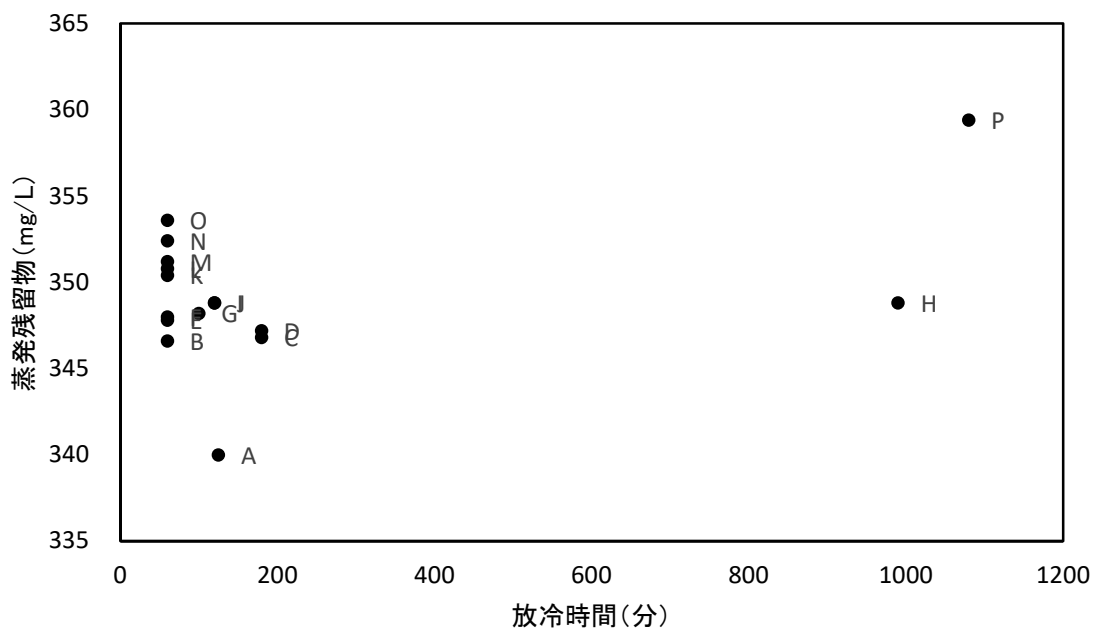


図5. 蒸発乾固後の蒸発皿の放冷時間と測定値の散布図

表2. 塩化物イオン 結果

検査機関	測定値 X (mg/L)	変動係数 CV% (%)	誤差率 E% (%)	範囲 R (mg/L)
a	64.94	0.2	-7.6	0.3
b	66.30	0.2	-5.7	0.3
c	69.14	0.4	-1.7	0.6
d	69.38	0.1	-1.3	0.1
e	69.40	0.0	-1.3	0.0
f	69.92	0.3	-0.5	0.5
g	70.12	1.6	-0.3	2.8
h	70.18	0.3	-0.2	0.5
i	70.24	0.1	-0.1	0.1
j	70.30 ...X ₁	0.3	0.0	0.5
k	70.34	0.7	0.1	1.3
l	70.50	0.1	0.3	0.2
m	70.54	0.2	0.3	0.3
n	70.56	0.5	0.4	0.8
o	70.72	0.3	0.6	0.6
p	70.84	0.2	0.8	0.3
q	71.40	0.6	1.6	0.9
r	72.16	0.4	2.6	0.7
s	72.70	0.9	3.4	1.7
機関数	19			
平均値 (mg/L)	69.98 ...X ₂			0.66 ...CL
標準偏差 σ (mg/L)	1.78			
変動係数 (%)	2.5			

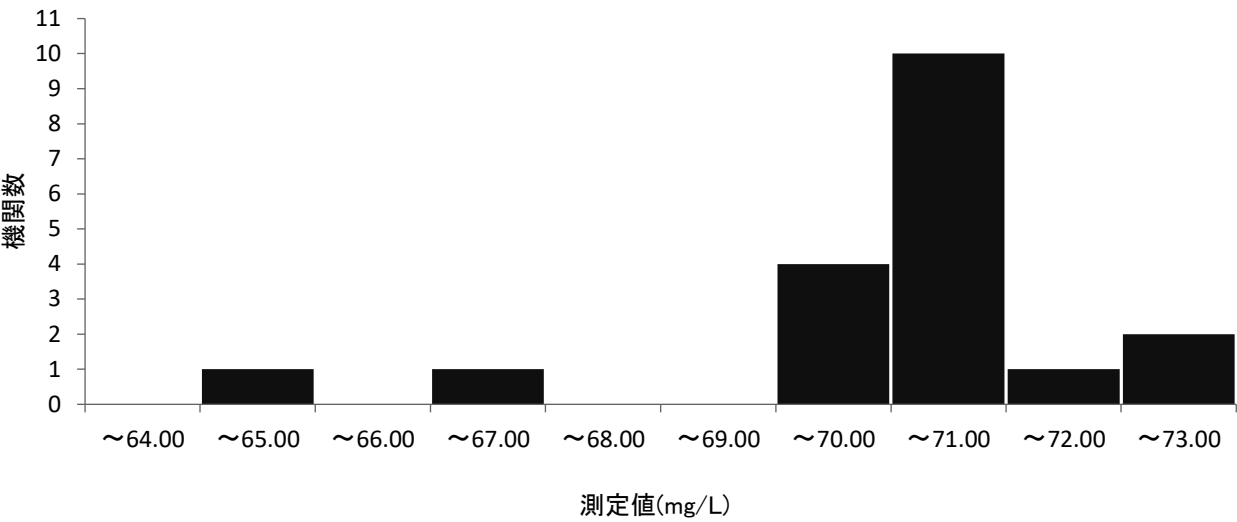


図6. 塩化物イオン ヒストグラム

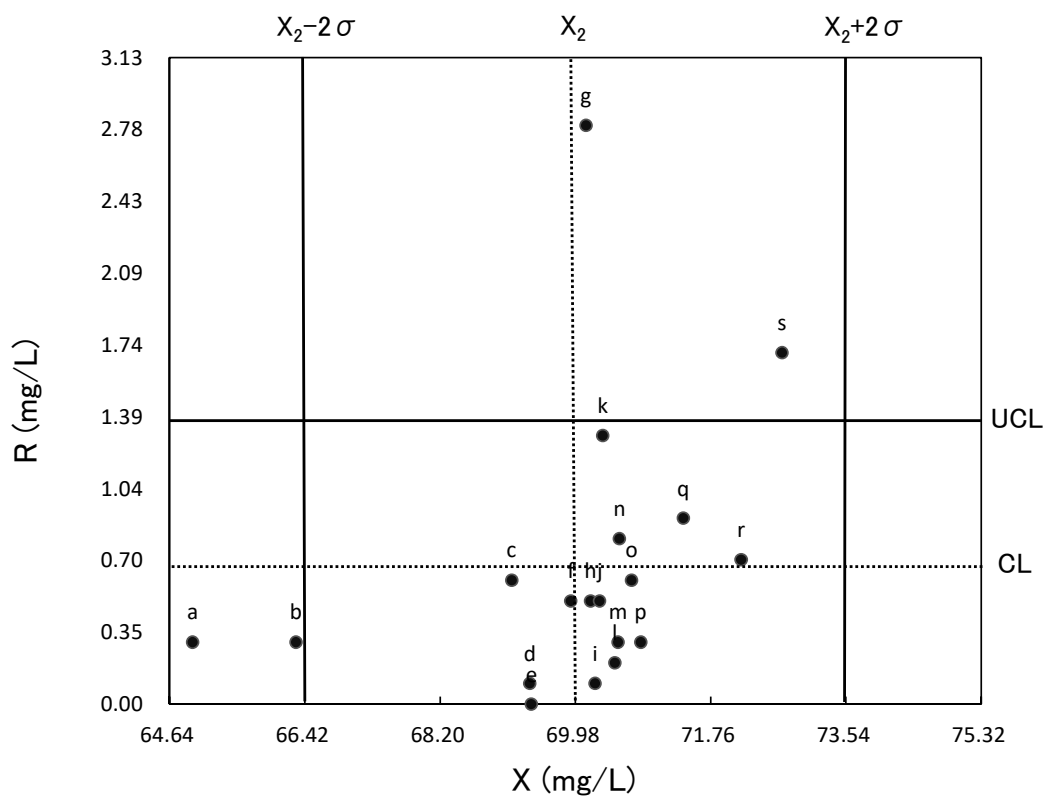


図7. 塩化物イオン $\bar{X}$ -R 管理図

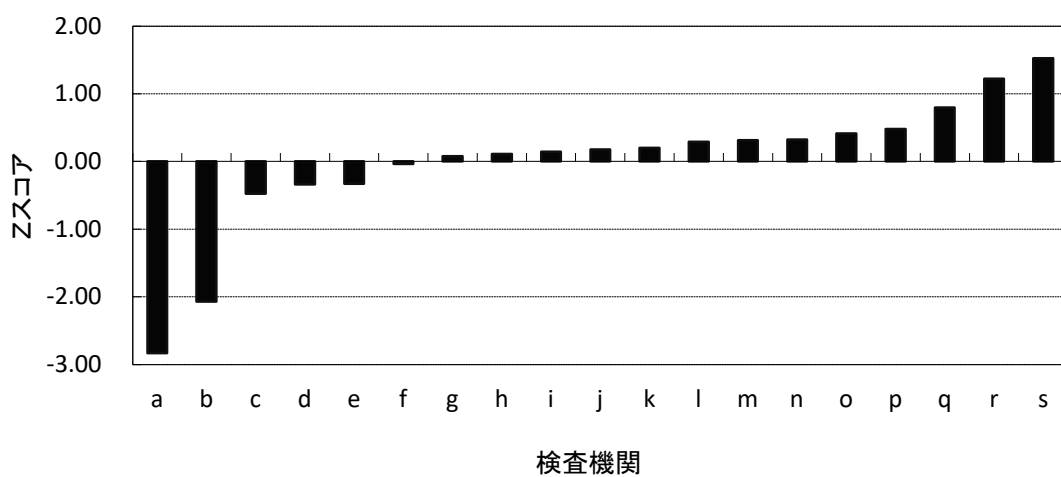


図8. 塩化物イオン Zスコアの順位