

## 第3章 調査研究・報告

### 第1節 報 告



## 健康危機管理体制の強化 —キノコによる食中毒における遺伝子を用いた鑑別方法の確立—

安藤尚子・仲井菜都希・村上友規・米田正樹・岡山明子

Enhancement of Health Risk Management System  
Method for Identifying Species by Gene Analysis in Food Poisoning Caused by Mushroom

Naoko ANDO・Natsuki NAKAI・Yuki MURAKAMI・Masaki YONEDA and Akiko OKAYAMA

### 緒言

厚生労働省の平成 18 年から平成 27 年の 10 年間の食中毒統計調査によると、自然毒を原因とする食中毒は毎年 100 件程度と食中毒全体から見ると少ないが、10 年間の死者数は細菌やウイルスを原因とする食中毒よりも多い。また、発生件数・患者数が多いのはキノコによる食中毒で、死者数が多いのはフグによる食中毒であった。奈良県ではキノコによる食中毒は 2 件（患者：7 名，死者：0 名）発生した。

当センターでは健康危機管理体制を強化するため、自然毒による食中毒事件発生時に対応可能な検査項目の拡充を進めており、そのなかで、奈良県での自然毒による食中毒の発生状況からキノコによる食中毒に対応する方法を検討した。

キノコによる食中毒が発生した際に、キノコの種類や毒成分の解明が必要となるが、キノコは不明種も多く、毒成分の研究も十分に行われていないため原因究明は困難である。また、食中毒の際に持ち込まれる検体は凶鑑にあるような完全な形態でなく、調理済みであることも多いため、形態からの鑑別は難しい。さらに、入手可能な毒成分の標準品は少なく、化学分析で病因物質を同定できるキノコは限られる。

近年 DNA バーコーディング領域に関する国際共同研究でキノコを含む菌類の種の鑑別には、核ゲノム中のリボゾーム領域の ITS 領域が最も適している<sup>1)</sup>とされ、ライブラリーが国際的に構築されつつある。そこで、キノコの鑑別方法として、ITS 領域の塩基配列を解析することとし、実際の食中毒を想定した調理済みキノコや吐物からの鑑別についても検討した。

### 方法

#### 1. 試料

市販の食用キノコであるしいたけ、ぶなしめじ、ひらたけを鑑別方法の検討に用いた。その他市販の干しいたけ、奈良県内で採取したカエントケ、ベニナギ

ナタタケ、奈良県内で採取し関西菌類談話会の観察指導員等による簡易鑑別を受けたキノコ等も対象とした。

#### 2. 試薬等

TaKaRa Ex Taq<sup>®</sup> Hot Start Version (タカラバイオ (株) 製), Ampdirect<sup>®</sup> Plus ((株) 島津製作所製), アガロース (低電気浸透, 高ゲル強度) (ナカライテスク (株) 製), GelRed<sup>™</sup> Nucleic Acid Gel Stain, 10,000 × in Water (Biotium 社製), 100 bp DNA Ladder (東洋紡 (株) 製), FastGene Gel/PCR Extraction Kit (日本ジェネティクス (株) 製), BigDye<sup>®</sup> Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems 製), BigDye<sup>®</sup> XTerminator Purification Kit (Applied Biosystems 製) を用い, PCR プライマーは合成して用いた。試薬は特級を用いた。

抽出溶液は, ①水, ②50 mM 水酸化ナトリウム溶液, ③100 mM トリス塩酸 (pH9.5) に 1 M になるように塩化カリウム及び 10 mM になるように EDTA を加えた溶液<sup>2)</sup>を用いた。

ペプシンはブタ胃粘膜由来の 1 : 10000 (和光純薬工業 (株) 製) を用い, 人工胃液は, 0.1% ペプシン含有溶出試験第 1 液<sup>3)</sup>を用いた。

#### 3. 装置

ディスポーザブルホモジナイザーはバイオマッシャー<sup>®</sup> II と専用電動攪拌機パワーマッシャー II ((株) ニッピ製), 分光光度計は SmartSpec<sup>™</sup> Plus (BIO-RAD 製), サーマルサイクラーは iCycler (BIO-RAD 製), Veriti<sup>®</sup> (Applied Biosystems 製) 等, 電気泳動装置は Mupid<sup>®</sup>-ex ((株) アドバンス製), トランスイルミネーターは LED505-TR60W ((株) 美館イメージング製), シーケンサーは ABI PRISM<sup>®</sup> 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems 製) を用いた。

#### 4. 遺伝子解析

ITS 領域及び D1/D2 領域の遺伝子増幅を実施し, 得られた産物はアガロースゲル電気泳動で期待サイズを確認した。その後, ダイレクトシーケンスによる塩基

配列判読を行い、BLAST 解析により既知の登録配列と比較し、種の鑑別を行った。

## 5. 前処理方法の検討

検討結果の確認は、目的サイズの増幅の有無によって行った。

### 1) 組織の破碎方法と試料採取量

DNA を抽出するための組織の破碎方法には、液体窒素で凍結後破碎する方法、ローターステーター方式ホモジナイザーやビーズミル等の機器を用いて破碎する方法があるが、簡便な方法としてディスポーザブルホモジナイザーを用いた。

生のしいたけ、ぶなしめじ、ひらたけを 25, 50, 100, 200 mg, 干しいたけとカエンタケの乾燥品を 2.5, 5, 10, 15 mg 採取し、抽出溶液を加えてディスポーザブルホモジナイザーで 30 秒間ホモジナイズして検討に用いた。

### 2) 抽出溶液による抽出効率の比較

破碎した試料に抽出溶液①から③を加えてホモジナイズし、95°Cで10分間加熱する。加熱後 12,000 rpm, 4°Cで5分間遠心分離し、上清を採取し DNA 抽出液とした (図 1)。

試料を 1.5 mL チューブに採取
+ 抽出溶液 100 $\mu$ L
ホモジナイズ 30 秒間
+ 抽出溶液 100 $\mu$ L (攪拌棒を洗い込む)
(《抽出溶液が 50 mM 水酸化ナトリウムの場合》)
+ 抽出溶液 80 $\mu$ L (攪拌棒を洗い込む)
95°C, 10 分間
(《抽出溶液が 50 mM 水酸化ナトリウムの場合》)
+ 1M トリス塩酸 (pH 8.0) 20 $\mu$ L
12,000 rpm, 5 分間, 4°C
上清 約 200 $\mu$ L (DNA 抽出液)

図 1 DNA の抽出方法

## 3) PCR 条件

### (1) プライマー対の選択と DNA 量

プライマーは ITS 領域の 7 種類 (表 1, 図 2) の組み合わせ ITS 領域 6 対, ITS1 領域 3 対, ITS2 領域 2 対を検討した。

DNA 量は 12.5, 25, 50, 100, 200 ng を検討した。

### (2) アニーリング温度

熱変性は 98°C, 10 秒とし、伸長反応は 72°C, 40 秒とし、サイクル数は 30 サイクルとした。

アニーリング温度は 52°C から 2°C 刻みに 68°C まで変更して検討した。

表 1 ITS 領域の増幅用プライマー

プライマー	配列 (5' → 3')	F/R	Tm 値	文献
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	F	68.4	4)
ITS2	GCTGCGTTCCTTCATCGATGC	R	68.1	4)
ITS3	GCATCGATGAAGAACGCAGC	F	68.1	4)
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	R	61.5	4)
ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	F	58.3	4)
ITS1-F	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA	F	56.6	5)
ITS4BR	TCAACAGACTTGTACATGGTCC	R	61.4	6)

F/R: フォワード/リバース

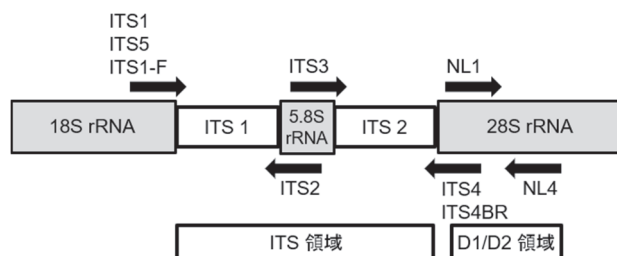


図 2 ITS 領域及び D1/D2 領域とプライマー

## 6. 調理及び人工胃液による影響

### 1) 調理による影響

生のしいたけ、ぶなしめじ、ひらたけを素揚げ、味噌汁、しょう油煮にしたものとぶなしめじをカレーの具材にしたものを用いて調理による DNA 増幅への影響を確認した。

さらにこれらを 18 日間, 4°C で保管し、同様に DNA 増幅への影響を確認した。

### 2) 人工胃液の影響

試料を細切りにし、37°C の人工胃液中で攪拌しながら消化実験を行った。0, 0.5, 1, 2, 3, 4 時間後に人工胃液から取り出し、同様に DNA 増幅への影響を確認した。

## 7. D1/D2 領域での種鑑別

生のしいたけ、ぶなしめじ、ひらたけと乾燥品のカエンタケを用い真菌の同定に用いられる核ゲノム中のリボゾーム遺伝子の D1/D2 領域<sup>7)</sup> (表 2, 図 2) を ITS 領域と同じ PCR 条件で増幅した。

表 2 D1/D2 領域の増幅用プライマー

プライマー	配列 (5' → 3')	F/R	Tm 値	文献
NL1	GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG	F	65.3	7)
NL4	GGTCCGTGTTTCAAGACGG	R	65.5	7)

F/R: フォワード/リバース

## 結果

### 1. 前処理方法の検討

#### 1) 試料採取量

全試料で ITS 領域 (ITS5 と ITS4) の増幅が確認できた。但し、破碎の容易さの点から試料採取量は生の試料 100 mg, 乾燥品 10 mg とした。

#### 2) 抽出溶液による抽出効率の比較

抽出溶液②と③を用いた場合、全試料で ITS 領域

(ITS5 と ITS4) の増幅が確認できた。抽出溶液①を用いた場合は、生のしいたけのみ少量の増幅が確認できた。

抽出溶液として、操作性の優れた③を用いることとした。

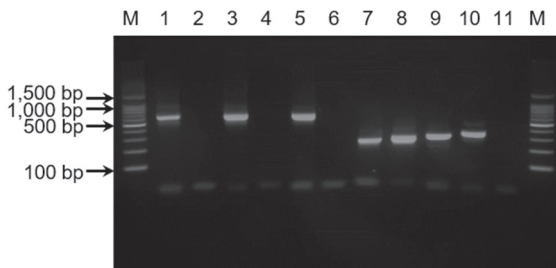
### 3) PCR 条件

#### (1) プライマー対の選択と DNA 量

ITS 領域では 6 対中 3 対 (ITS1 と ITS4, ITS5 と ITS4, ITS1-F と ITS4) で DNA の増幅が確認できた。

ITS1 領域では 3 対 (ITS1 と ITS2, ITS5 と ITS2, ITS1-F と ITS2) 全てで、ITS2 領域では 2 対中 1 対

(ITS3 と ITS4) で DNA の増幅が確認できた (図 3)。これと菌類の DNA バーコーディング領域を決定した文献<sup>1)</sup>から、ITS 領域は ITS5 と ITS4, ITS1 領域は ITS5 と ITS2, ITS2 領域は ITS3 と ITS4 のプライマー対を用いることとした。



ITS領域  
1 : ITS1とITS4, 2 : ITS1とITS4BR, 3 : ITS5とITS4,  
4 : ITS5とITS4BR, 5 : ITS1-FとITS4, 6 : ITS1-FとITS4BR,  
ITS1領域  
7 : ITS1とITS2, 8 : ITS5とITS2, 9 : ITS1-FとITS2,  
ITS2領域  
10 : ITS3とITS4, 11 : ITS3とITS4BR  
M : 100 bp DNA Ladder

図 3 プライマー対毎の DNA 増幅

DNA 量は 12.5 から 200 ng まで DNA の増幅が確認できた。一般的に DNA 量は 100 ng 未満が望ましいこと、DNA 抽出液に夾雑物が多いことから PCR における DNA 量は 50 ng とした。

#### (2) アニーリング温度

ITS 領域 (ITS5 と ITS4) 増幅は、アニーリング温度 52~64°C で確認できた。しかし、64°C での DNA の増幅量が少なかったことなどから、アニーリング温度は 60°C とした。

### 2. 鑑別方法

検討結果から以下の鑑別方法を決定した。

試料 100 mg (乾燥品 : 10 mg) を採取し、抽出溶液③100  $\mu$ L を添加後ディスポーザブルホモジナイザーで 30 秒間ホモジナイズする。さらに抽出溶液③100  $\mu$ L 加えて混合し、95°C で 10 分間加熱後、12,000 rpm, 4°C, 5 分間遠心し、上清約 200  $\mu$ L を採取し DNA 抽出液とする。

DNA 抽出液の A<sub>260</sub> の吸光度から DNA 濃度を算出し、滅菌水で 50 ng/ $\mu$ L に調整し鑄型とする。

ITS5 と ITS4 (ITS 領域), ITS5 と ITS2 (ITS1 領域), ITS3 と ITS4 (ITS2 領域) のプライマー対を用い、表 3 の反応組成液で表 4 の PCR 条件で増幅を行う。

表 3 PCR 反応組成液

TaKaRa Ex Taq HS (5 units/ $\mu$ L)	0.05 $\mu$ L
2× Ampdirect Plus (3 mM MgCl <sub>2</sub> , 各 400 $\mu$ M dNTPs)	5.00 $\mu$ L
F-プライマー* <sup>1</sup> (10 $\mu$ M)	0.50 $\mu$ L
R-プライマー* <sup>2</sup> (10 $\mu$ M)	0.50 $\mu$ L
DNA抽出液 (50 ng/ $\mu$ L)	1.00 $\mu$ L
滅菌水	2.95 $\mu$ L
全量	10.00 $\mu$ L

\*1 : ITS領域 ITS5, ITS1領域 ITS5, ITS2領域 ITS3

\*2 : ITS領域 ITS4, ITS1領域 ITS2, ITS2領域 ITS4

表 4 PCR 反応条件

98 °C	10 秒	} 30 サイクル
60 °C	30 秒	
72 °C	40 秒	

得られた増幅産物について塩基配列を解析し、BLAST にて相同性検索を行う。

### 3. 調理及び人工胃液による影響

#### 1) 調理による影響

全試料で ITS 領域, ITS1 領域及び ITS2 領域の増幅が確認できた。

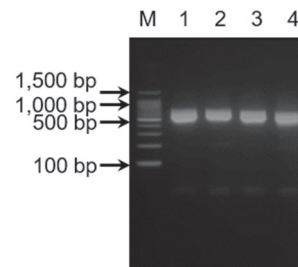
さらに同じ試料を 4°C で保管し、18 日後でも全試料で ITS 領域の増幅が確認できた。

#### 2) 人工胃液の影響

全試料で 0, 0.5 時間後のみ ITS 領域の増幅が確認できた。なお、4 時間後の試料でも形は残っていた。

### 4. D1/D2 領域での種鑑別

D1/D2 領域は、ITS 領域と同じ PCR 条件で DNA の増幅が確認できた (図 4)。



1 : しいたけ, 2 : ぶなしめじ,  
3 : ひらたけ, 4 : カエンタケ,  
M : 100 bp DNA Ladder

図 4 D1/D2 領域の DNA 増幅

さらに BLAST の相同性検索を行った結果、D1/D2 領域では、しいたけとひらたけで 1 種類にしばれず同じ属の 2 種類の種となった (表 5)。

表 5 ITS 領域と D1/D2 領域の鑑別

試料名	ITS領域		D1/D2領域	
	学名	相同性	学名	相同性
しいたけ	<i>Lentinula edodes</i>	99%	<i>Lentinula edodes</i>	100%
			<i>Lentinula lateritia</i>	100%
ぶなしめじ	<i>Hypsizygus marmoreus</i>	99%	<i>Hypsizygus marmoreus</i>	98%
ひらたけ*	<i>Pleurotus eryngii</i> var. <i>ferulae</i>	98%	<i>Pleurotus ostreatus</i>	98%
			<i>Pleurotus pulmonarius</i>	98%
カエントケ	<i>Trichoderma cornu-damae</i>	99%	<i>Trichoderma citrinum</i>	96%

\*ヒラタケ属 (*Pleurotus*属) のきのこの交配種

### 5. 奈良県内で採取したキノコの鑑別

奈良県内で採取したキノコ 19 種類についても同様に実施し、鑑別できた。また、形態による簡易鑑別の結果とほぼ同じであった (表 6)。

### 考 察

DNA が断片化し ITS 領域の DNA の増幅が認められない場合でも、ITS1 領域と ITS2 領域の分けることで DNA の増幅が確認できることもあることから、同時に 3 種類の領域を確認できるような PCR 条件とした。

調理済みや、2 週間程度冷蔵保管されていたキノコからの DNA 増幅も確認できたことから、食中毒事件の際に持ち込まれる可能性のある食材からも鑑別できることが示唆された。また、食中毒事件の際には吐物も検体となることがある。人工胃液の実験によって昌山ら<sup>8)</sup>の結果と同様に食後 30 分以内の吐物であれば鑑別できることも示唆された。実際の食中毒事件の際に持ち込まれると想定される検体からの鑑別方法を持つことでキノコ食中毒発生時の原因究明により寄与できるようになった。

今回、真菌の同定によく用いられる D1/D2 領域でも

表 6 奈良県内で採取したキノコの鑑別

遺伝子による鑑別				形態による簡易鑑別	採取場所等
学名	和名	ACCESSION	相同性		
<i>Boletus aestivalis</i>	ヤマドリタケモドキ	DQ131611	92%	ヤマドリタケモドキ	神社境内
<i>Amanita imazekii</i>	ミヤマタマゴタケ	AB509890	89%	シロタマゴテングタケ	神社境内
<i>Phylloporus</i> sp. <i>HKAS 74679</i>	イグチ科キヒダタケ属	JQ967271	86%	イグチの仲間	神社境内
<i>Amanita virgineoides</i>	シロオニタケ	AB015686	92%	シロオニタケ	神社境内
<i>Pulveroboletus ravenelii</i>	キイロイグチ	AB509565	98%	キイロイグチ	神社境内
<i>Amanita brunnescens</i>	テングタケ属 和名なし	KT006762	93%	コテングタケ	神社境内
<i>Ramariopsis helvola</i>	キノウメンタケ	KR673550	92%	キノウメンタケ	神社境内
<i>Amanita similis</i>	チャタマゴタケ	AB750727	96%	チャタマゴタケ	神社境内
<i>Armillaria mellea</i>	ナラタケ	EU784174	95%	ナラタケ	神社境内
<i>Hypocreaceae</i> sp. <i>2 UFMGCB 5867</i>	ボタンタケ科	KJ471526	87%	ボタンタケ科	神社境内
<i>Russula heterophylla</i>	ウグイスハツ	DQ422006	95%	ウグイスハツ	神社境内
<i>Boletales</i> sp. <i>EMF56</i>	イグチ目	JF273554	95%	イグチの仲間	神社境内
<i>Gyroporus castaneus</i>	クリイロイグチ	GQ166901	91%	クリイロイグチ	神社境内
<i>Chlorophyllum molybdites</i>	オオシロカラカサタケ	KP012712	96%	オオシロカラカサタケ	道路脇
<i>Amanita clarisquamosa</i>	シロウロコツルタケ	FJ375331	86%	フクロツルタケ	神社境内
<i>Polyporus tuberaster</i>	タマチョレイタケ	AB474086	96%	タマチョレイタケ	神社境内
<i>Clitocybe acromelalga</i>	ドクササコ	AB301606	94%	ドクササコ	食中毒検体
<i>Trichoderma cornu-damae</i>	カエントケ	KP004943	99%		
<i>Clavulinopsis miyabeana</i>	ベニナギナタタケ	AB509666	98%	カエントケ	公園

キノコを鑑別できた。しかし種同定には変異が少なすぎるとの報告<sup>1)</sup>もあり、実際しいたけで、しいたけと同属のきのこ 2 種類で相同性が 100%であった。また、市販のひらたけが交雑種であることが分かった。キノコには不明種が多いだけでなく、変種や交雑種も少なくなく種の鑑別は難しいが、食中毒の原因究明には属が判明するだけでも十分であることが多い。

今後は、時間短縮について検討する必要がある。

また、他の自然毒による食中毒の原因究明においても、遺伝子を用いた鑑別方法の導入を検討する。

### 文 献

- 1) Conrad L. Schoch, Keith A. Seifert, Sabine Huhndorf, *et al.* : *PNAS*, 109, 6241-6246 (2012)
- 2) D. Thomson, R. Henry : *Biotechniques*, 19, 394-397 (1995)
- 3) “第十七改正日本薬局方”, 328 (2016), 厚生労働省告示第 64 号
- 4) T. J. White, T. Bruns, S. Lee, *et al.* : PCR protocols: A guide to methods and applications, 315-322 (1990), *Academic Press*
- 5) M. Gardes, T. D. Bruns : *Mol. Ecol.*, 2, 113-118 (1993)
- 6) A. Vialle, N. Feau, M. Allaire, *et al.* : *Mol. Ecol. Res.*, 9 (s1), 99-113 (2009)
- 7) “衛生試験法・注解 2015” 公益社団法人日本薬学会編, 122-124 (2015), 金原出版 (株)
- 8) 昌山敦, 村上太郎, 佐久間大輔, 他 : 食衛誌, 53, 237-242 (2012)

# LC-MS/MSによるスチレンジビニルベンゼン SPE カートリッジカラムを使った 鶏肉からの8種類の抗ウイルス剤一斉分析法の開発

山本雄也・北岡洋平・米田正樹・西山隆之・山下浩一・岡山明子

Simultaneous determination of 8 antiviral drugs in chicken muscles using a styrene-divinyl benzene copolymer SPE cartridge column by LC-MS/MS

Yuya YAMAMOTO・Yohei KITAOKA・Masaki YONEDA・Takayuki NISHIYAMA・  
Hirokazu YAMASHITA and Akiko OKAYAMA

## 緒言

アマンタジンは過去に中国において養鶏の鳥インフルエンザウイルス感染防止に使用され、耐性ウイルスの発生が問題となった<sup>1)</sup>。

また、H7N9型鳥インフルエンザウイルスに感染したヒトの治療にオセルタミビルが使用されている<sup>2)</sup>ことから、不適切な抗ウイルス剤の使用による耐性ウイルスの発生は、治療の選択肢を狭める要因となり、公衆衛生上重要な問題の一つであると考えられる。

このような背景から厚生労働省は平成25年2月15日付け食安輸発0215第1号により検疫所に対し鶏肉中のアマンタジンのモニタリング検査を実施するよう通知している<sup>3)</sup>。また、鶏肉を含む抗ウイルス剤一斉分析法が種々報告され<sup>4,7)</sup>、前処理における精製には、陽イオン交換SPEカートリッジ<sup>5,7)</sup>や、陽イオン交換SPEカートリッジとフェニルボロン酸結合シリカSPEカートリッジの2つのカートリッジを使った方法<sup>4)</sup>、また分散固相<sup>6)</sup>を使用した方法なども報告されている。

イオン交換SPEカートリッジは、一般的に逆相保持のSPEカートリッジよりも取り扱いが難しく、分散固相は操作が簡便であるもののSPEカートリッジカラムよりも精製効果が劣るとされている。そこで将来奈良県内で流通する鶏肉の抗ウイルス剤汚染をモニタリングすることを目的とし、比較的扱いやすいスチレンジビニルベンゼンを充填した逆相モードのSPEカートリッジカラムと、分析カラムとしてODSカラムを用いた分析方法を検討した結果、アマンタジンを含む抗ウイルス剤一斉分析法を開発し良好な結果を得たので報告する。

## 方法

### 1. 試薬及び標準品

LC-MS/MS 移動相調製用のアセトニトリルと超純

水およびギ酸はLC/MS用を、その他試薬調製に使用したアセトニトリル、メタノールは残留農薬試験用を、いずれも和光純薬工業(株)社製を使用した。

標準品としてリマンタジン塩酸塩(純度>96%) (RM)、アマンタジン塩酸塩(純度>99%) (AM)、メマンチン塩酸塩(純度>98%) (MM)、ガンシクロビル(純度>98%) (GC)、アシクロビル(純度>98%) (AC) は和光純薬工業(株)製、リバビリン(純度>98%) (RV)、オセルタミビルリン酸塩(純度>98%) (OS)、ザナミビル(純度>98%) (ZA)、オセルタミビルカルボキシレート(純度>98%) (OC)、アルビドール塩酸塩(純度>98%) (AR)、ラニナミビル(純度>98%) (LA) はToronto Research Chemicals Inc.製、イミキモド(純度>98%) (IQ)、モロキシジン塩酸塩(純度>98%) (MO) は東京化成工業(株)製、ペラミビル三水和物(純度>98%) (PR) はCHEMSCENE, LLC製を用いた。

GC, AC, ZA, LAは水で1,000 µg/mL, IQは100 µg/mL, それ以外の化合物および化合物の塩は化合物として1,000 µg/mLとなるようメタノールで溶解し標準原液とした。各標準原液を適宜、混合、希釈して使用した。

### 2. 試料

対象の抗ウイルス剤が検出されないことを確認した市販の鶏肉を試料とし、添加回収等の検討に用いた。

### 3. 機器等

LC-MS/MS : LC部 Agilent 1200 series, MS部 Agilent 6430

0.20 µm PTFE メンブレンフィルターはアドバンテック社製のDISMIC 13HP020ANSPE, SPEカートリッジカラムはGLサイエンス社製のInertSep PLS-2 (265 mg/6 mL), ポリトロンホモジナイザーとしてキネマティカ社製のPT10-35GT, 桐山漏斗と桐山ろ紙No.4 (直径40 mm) は桐山製作所社製のものを使用した。

#### 4. LC-MS/MS 条件

HPLC カラムは InertSustain AQ-C18 (GLサイエンス社, 2.1 mm i.d.×150 mm, 3 μm) を使用した。カラム温度 40°C, 移動相 A は 50 mM ギ酸溶液および移動相 B は 50 mM ギ酸アセトニトリル溶液を使用。グラジエント条件は, B 液を 0 min 5%→0.5 min 20%→9 min 25%→15 min 95%→20min 95%とし, 流速 0.3 mL/min, 注入量は 5 μL とした。イオン化はエレクトロスプレーイオン化 (ESI) ポジティブモードで行い, ネブライザーガス温度 350°C, ガス流量 13 L/min, ガス圧 60 psi で分析を行った。また, 抗ウイルス剤の MRM 条件は標準溶液を用いて機器による自動最適化を行い, 表 1 に示した。

表 1 抗ウイルス剤の MRM 条件

化合物	定量			確認		
	MRM Transition (m/z)	FV (V)	CE (V)	MRM Transition (m/z)	FV (V)	CE (V)
MO	172 → 60	110	14	172 → 113	110	22
GC	256 → 152	80	10	256 → 135	80	36
AC	226 → 152	80	10	226 → 135	80	30
RV	245 → 113	80	10	245 → 96	80	32
ZA	333 → 60	110	18	333 → 121	110	30
LA	347 → 60	110	14	347 → 121	110	30
PR	329 → 270	140	18	329 → 100	140	32
AM	152 → 135	110	18	152 → 93	110	30
OC	285 → 197	80	4	285 → 138	80	18
IQ	241 → 185	140	26	241 → 114	144	64
RM	180 → 163	110	14	180 → 93	110	30
MM	180 → 163	80	14	180 → 107	80	26
OS	313 → 166	80	16	313 → 208	80	10
AR	477 → 432	140	18	477 → 279	110	36

FV:Fragmentor Voltage CE:Collision Energy

#### 5. 試験溶液調製

鶏肉は脂肪を除去した後, フードプロセッサで均一化し 5.0 g を 50 mL ポリプロピレン製遠沈管に正確に量り, メタノール 10 mL を加え, ポリトロンで 1 分間ホモジナイズした後, 16,000 rpm で, 5 分間遠心分離し, 上澄み液を 100 mL ビーカーへ移した。残留物に再度メタノール 10 mL を加え, 同条件でホモジナイズ, 遠心し, 上澄み液を先の 100 mL ビーカーにあわせた。得られた上澄み液を No.4 ろ紙で吸引ろ過し 200 mL 褐色ナスフラスコに受けた。ろ液は 40°C 以下で 0.5 mL 以下になるまで減圧濃縮を行った。減圧濃縮後の残渣を 0.1% ギ酸溶液 (v/v) 6 mL で溶解し, あらかじめメタノール 6 mL, 0.1% ギ酸溶液 6 mL でコンディショニングした SPE カートリッジに負荷した。通液終了後, 0.1% ギ酸溶液 6 mL, 0.1% ギ酸溶液/メタノール混液(95:5) 6 mL で順に洗浄した。その後メタノール 5 mL で溶出し, さらにメタノールで 10 mL に定容し, 0.20 μm PTFE メンブレンフィルターでろ過し試験溶液とした。

#### 6. 実験方法

##### 1) 化合物保持挙動の確認

抗ウイルス剤標準原液を適宜混合し, メタノールで 10,000 ng/mL とした混合標準液を用いて 100 ng/mL に調製した。移動相 A の割合が 50, 60, 70, 80, 90, および 95% における各化合物の保持時間を計測し, 保持係数 (k') を算出した。ホールドアップタイム (t<sub>0</sub>) の測定にはウラシルを使用した。

##### 2) 精製条件 (カートリッジ負荷液, 洗浄液の検討, 溶出液量) の検討

SPE カートリッジはあらかじめメタノール 6 mL, 水 6 mL (水系溶媒), もしくは 0.1% ギ酸溶液 6 mL (ギ酸系溶媒) でコンディショニングした。

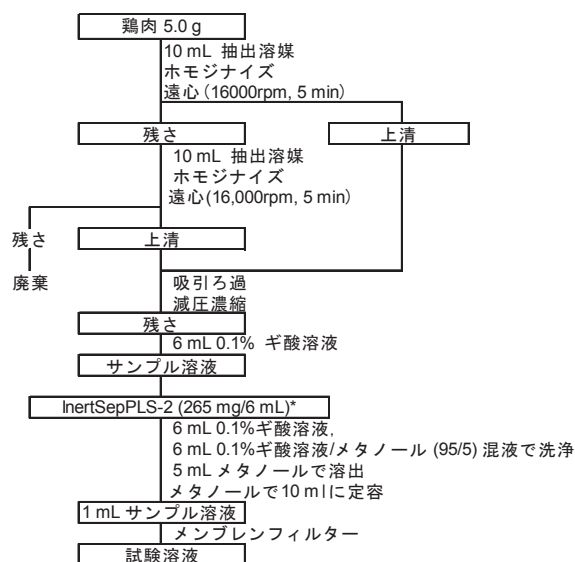
##### (1) 水系溶媒を用いた保持挙動

100 ng/mL に調製した RM, AM, MM, OS, OC, AR, IQ, PR (以下 8 種抗ウイルス剤) を混合した水溶液を 6 mL 負荷し, 通過液を回収, その後第一洗浄溶媒として水 6 mL を負荷し, 洗浄液を回収, 第二洗浄溶媒として, 水/メタノール混液 (比率 95:5, 90:10, 80:20 および 70:30) をいずれかの比率で 6 mL 負荷し, 溶出液を回収した。それぞれの分画を減圧濃縮し, メタノール 6 mL で溶解後の抗ウイルス剤の濃度を測定し, 抗ウイルス剤の溶出の有無を確認した。

##### (2) ギ酸系溶媒を用いた保持挙動

(1) 水系溶媒を用いた保持挙動の実験の水部分を 0.1% ギ酸溶液に置き換え同様に検討を行った。

##### 3) 抽出溶媒の検討



\*) 6 mL メタノール, 6 mL 0.1% ギ酸溶液でコンディショニング

図 1 抽出溶媒検討スキーム

試料に 10 ng/g となるよう 8 種抗ウイルス剤メタノール溶液を添加し, 抽出溶媒として, メタノール, 1%



ギ酸メタノール, アセトニトリル, 1%ギ酸アセトニトリルによる抽出を行い, 回収率を比較した. また, その際のスキームを図 1 示した.

#### 4) 妥当性評価

妥当性評価ガイドライン<sup>10)</sup>に基づいて, 試料に 10 ng/g となるよう, 鶏肉に 8 種抗ウイルス剤メタノール溶液 (以下標準溶液) を添加し, 実施者 3 名 1 日 1 回 (2 併行), 2 日間の妥当性評価を行い選択性, 真度 (回収率), 併行精度, 室内精度を評価した. また標準溶液から 1, 2.5, 5, 10 ng/mL の濃度で, 検量線を作成し, ピーク面積を用いた絶対検量線法で定量を行った.

### 結果と考察

#### 1. LC 条件の決定, 化合物保持挙動の確認

今回の検討では移動相に 50 mM ギ酸溶液と 50 mM ギ酸アセトニトリルを使用し, 化合物の保持挙動の確認を行った. 結果は, 表 2 の通りである.

表 2 抗ウイルス剤の保持係数 ( $k'$ )

化合物	移動相 A(%)					
	50	60	70	80	90	95
MX	—	—	—	—	—	—
GC	—	—	—	—	—	—
AC	—	—	—	—	—	—
RB	—	—	—	—	—	—
ZA	—	—	—	—	—	—
LA	—	—	—	—	—	—
PR	—	—	—	1.1	6.9	22.2
AM	—	—	—	1.6	7.2	18.3
OC	—	—	—	1.8	11.7	38.0
IQ	—	—	1.6	7.3	66.4	100<
RM	—	—	2.0	7.9	46.0	100<
MM	—	—	2.1	9.3	58.9	100<
OS	—	2.0	11.7	11.6	100<	100<
AR	2.4	8.5	46.8	100<	100<	100<

:  $k' < 1$

GC, AC, RV, MO, ZA, LA は, 移動相 A の割合を 95%にしても保持されなかった( $k' < 1$ ).

今回は, 移動相 A が 50~90%の間で保持の得られた 8 つの抗ウイルス剤を分析対象化合物とした.

また, RM と MM は定量イオンの MRM トランジションが同じであるため, 分離される LC 条件を検討した. アイソクラティック溶出では分析に時間がかかりすぎるためグラジエント溶出とし, 20 分間で全ての抗ウイルス剤が分離するグラジエント条件を設定した.

#### 2. 精製条件 (カートリッジ負荷液, 洗浄液の検討, 溶出液量) の検討

極性溶媒に溶解させた抗ウイルス剤を SPE カートリッジカラムに保持させ, 夾雑物を洗い流し, 有機溶媒で溶出させる方法を検討することとした.

試料負荷, 第一洗浄溶媒の時点での化合物の溶出率は, 水, 0.1%ギ酸溶液どちらにおいても化合物の 1%未満でありカートリッジに十分に保持されていることを確認した. また, 第二洗浄溶媒においては, 水系, ギ酸系共に 70:30, 80:20 の比率において, PR, OC, AM の溶出が確認されたが, 95:5, 90:10 の比率では水系, ギ酸系共に溶出率 1%未満でありカートリッジに十分に保持されていた. 今回の実験において, マトリックスによって化合物の保持が阻害されることを考慮して, 95:5 の比率を採用することとした. また, 第二洗浄溶媒で洗浄後のカートリッジからの抗ウイルス剤の溶出挙動を水系, ギ酸系それぞれで確認した. 水系では, 20 mL のメタノールを使用しても全ての化合物が溶出されなかったが, ギ酸系では 5 mL のメタノールで全ての化合物がほぼ全量溶出された.

以上の結果から, サンプル負荷溶液と第一洗浄液を 0.1%ギ酸溶液, 第二洗浄液を 0.1%ギ酸溶液/メタノール混液(95:5)それぞれの量を 6 mL とし, 化合物を溶出するメタノールの量を 5 mL とした.

#### 3. 抽出溶媒の検討

今回の実験では抽出溶媒としてメタノール, 1%ギ酸メタノール溶液, アセトニトリル, 1%ギ酸アセトニトリル溶液を用い, それぞれ図 2 に従って操作を行い, 回収率を比較した. 各抽出溶媒での回収率はメタノールで 74.4~89.6%, 1%ギ酸メタノール溶液で 33.1~70.5%, アセトニトリルで 30.8~76.6%, 1%ギ酸アセトニトリル溶液で 58.9~84.0%であった. (図 2)この結果からメタノールが全ての化合物で妥当性評価ガイドラインの基準 70~120%を満たす回収率であったため, 抽出溶媒には, メタノールを採用した.

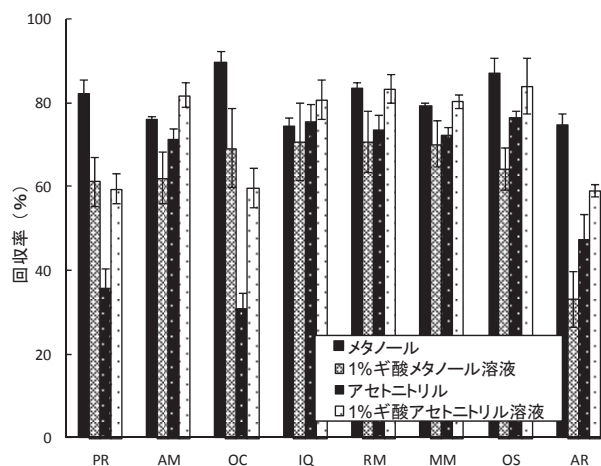


図 2 各種抽出溶媒における抗ウイルス剤の回収率 (添加量 10 ng/g, n=3, mean ± SD)

#### 4. 妥当性評価

添加濃度 10 ng/g において, 回収率 77.0~94.2%(基

準：70~120%），併行精度 4.1~7.0%（基準：<25%），室内精度 5.2~12.3%（基準：<30%）となり，全ての分析対象化合物において，妥当性評価ガイドラインの基準を満たすことが可能であった（表 3）。

また，定量を妨害するピークは確認されず，選択性に問題は無いことが示された。

表 3 抗ウイルス剤の妥当性評価結果

化合物	回収率(%)	併行精度(%)	室内精度(%)
PR	82.0	6.5	9.3
AM	77.0	4.4	6.2
OC	94.2	7.0	7.5
IQ	77.1	4.1	5.2
RM	82.3	4.5	6.1
MM	81.0	4.2	6.2
OS	85.6	5.0	6.7
AR	85.7	5.7	12.3

### まとめ

LC-MS/MS によるスチレンジビニルベンゼン SPE カートリッジカラムを使った鶏肉からの 8 種類の抗ウイルス剤精製方法を確立し LC-MS/MS による，抗ウイルス剤の検査体制を整えることが出来た。本分析法は安定同位体内部標準による回収率補正やマトリックス検量線ではなく，絶対検量線法により妥当性評価の基準に適合した。ただし，本分析方法は，減圧濃縮の際，突沸しやすく時間がかかることが課題である。

今後前処理方法の迅速化に向けて改良を行い，鶏肉加工食品中の抗ウイルス剤の残留分析検討を行う予定である。

### 文献

- 1) David C. : *Nature*, 435, 1009(2005)
- 2) Zhou X, Li H, Liu M, *et al.* : *Jpn. J. Infect. Dis.*, 66, 558-560 (2013)
- 3) 医薬食品局食品安全部監視安全課輸入食品安全対策室長通知「平成 24 年度輸入食品等モニタリング計画」の実施について，食安輸発 0215 第 1 号，（平成 25 年 2 月 15 日）
- 4) Berendsen BJ, Wegh RS, Essers ML, *et al.* : *Anal. Bioanal. Chem.*, 402, 1611-1623 (2012)
- 5) Liu Z, Yang F, Yao M, *et al.* : *J. Sep. Sci.*, 38, 1784-1793 (2015)
- 6) Mu P, Xu N, *et al.* : *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 1023-1024, 17-23 (2016)
- 7) 鶴岡由実, 中島崇行, 橋本常生, 他 : 食衛誌, 56, 83-87 (2015)

- 8) 医薬食品局食品安全部長通知「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインについて」，食安発第 1115001 号，（平成 19 年 11 月 15 日）

## 奈良県における細菌性食中毒原因検査について：2016年度

橋田みさを・辻本真弓・佐伯美由紀・田邊純子・堀 重俊

Investigation of Bacterial Food Poisoning Outbreaks in Nara Prefecture, 2016

Misao HASHIDA・Mayumi TSUJIMOTO・Miyuki SAEKI・Sumiko TANABE and Shigetoshi HORI

## 緒言

2016年の国内食中毒発生について厚生労働省の報告では、事件数1,139件、患者数20,252人で、2015年の事件数1,202件患者数、22,718人と比較すると共に減少した（厚生労働省：平成28年薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会食中毒部会資料、平成28年食中毒発生状況概要版、<http://www.mhlw.go.jp/file/05-Shingikai-11121000-Iyakushokuhinkyoku-So umuka/0000155505-1.pdf>）。細菌性の事件では、4月28日から5月8日まで全国5会場で開催された肉フェスのうち、東京と福岡の2会場において、鶏肉の寿司を原因とするカンピロバクターによる食中毒事件が発生した。また、8月には、千葉県と東京都の老人ホームにて、きゅうりのゆかり和えを原因とする腸管出血性大腸菌O157による食中毒事件<sup>1)</sup>も発生し、10月から11月にかけては、静岡県内の製造業者で製造された冷凍メンチカツを原因とした腸管出血性大腸菌O157による食中毒事件<sup>2)</sup>が12自治体で発生した。これらの対策として、厚生労働省から、「老人ホーム等における食中毒予防の徹底について」<sup>3)</sup>や、「カンピロバクター食中毒対策の推進について」<sup>4)</sup>等の通知やリーフレットの作成が行われている。

奈良県においても食の安全のため様々な啓発は行わ

れているが、カンピロバクターによる食中毒は例年発生している。更に、今年度は、黄色ブドウ球菌による食中毒が5年ぶりに2件発生した（奈良市を除く）。県内の細菌性食中毒発生状況を把握するため、2016年度の食中毒疑い事例の行政検査についてまとめたので報告する。

## 方法

## 1. 検体

食中毒疑い事例の行政検査依頼に基づき、その原因究明のために搬入された患者の便や吐物、従事者の便や手指の拭き取り、食品の残食や検食、原材料、施設の拭き取りなどの関連材料を対象として、細菌検査を実施した。

## 2. 検査方法

対象菌種に応じた増菌培地及び分離培地を使用して培養を行った（表1）。該当コロニーが出現した場合は、分離後それぞれの常法に従い、生化学的性状の確認及びPCR法またはリアルタイムPCR法による病原遺伝子や毒素遺伝子の確認を実施して同定した。また、必要に応じて、血清型別試験、コアグラージェ型別試験、薬剤感受性試験などを実施した。

表1 対象菌と使用培地

対象菌種	増菌培地	分離培地
ウエルシュ菌		CW卵黄寒天培地（カナマイシン含有）
黄色ブドウ球菌		X-SA
カンピロバクター	プレストン	CCDA
サルモネラ属菌	セレナイト・シスチン BPW（食品等）・TT（食品等）・RV（食品等）	SS-X、DHL MLCB（食品等）・クロモアガーサルモネラ（食品等）
赤痢菌		SS-X、DHL
セレウス菌		NGKG
腸炎ビブリオ		TCBS
腸管出血性大腸菌O157		CT-SMAC CT-クロモアガーSTEC（食品等）
病原性大腸菌	EC（食品等）	DHL X-MG（食品等）

表2 2016年度食中毒関連検査

事例 番号	依頼 番号	依頼日	保健所	検体数			項目数			検出菌 (株数)	
				ヒト由来	食品由来	合計	ヒト由来	食品由来	合計		
1	1	4月14日	郡山	1	0	1	10	0	10		
2	2	4月21日	郡山	1	0	1	10	0	10		
3	3	5月30日	中和	1	0	1	10	0	10		
	4	6月1日	中和	2	0	2	20	0	20		
4	5	6月30日	中和	1	0	1	9	0	9		
5	6	7月19日	中和	3	0	3	30	0	30	黄色ブドウ球菌 (1)	
	7	7月19日	中和	0	7	7	0	30	30	黄色ブドウ球菌 (1)	
6	8	8月22日	中和	5	0	5	50	0	50		
7	9	9月2日	中和	3	0	3	30	0	30	<i>S. Manhattan</i> (1), <i>C. jejuni</i> (2)	
	10	9月2日	中和	6	0	6	44	0	44	<i>C. jejuni</i> (2)	
7	11	9月3日	中和	2	0	2	20	0	20	<i>C. jejuni</i> (1)	
7	12	9月4日	中和	1	0	1	10	0	10	<i>S. Manhattan</i> (1), <i>C. jejuni</i> (1)	
7	13	9月5日	中和	1	0	1	6	0	6		
8	14	10月6日	中和	0	8	8	0	25	25	<i>C. jejuni</i> (1), 大腸菌 (1)	
	15	10月6日	中和	2	0	2	20	0	20	<i>C. jejuni</i> (2)	
	16	10月6日	中和	4	0	4	16	0	16		
	17	10月7日	中和	2	0	2	8	0	8	<i>C. jejuni</i> (1)	
	18	10月8日	中和	1	0	1	10	0	10		
	19	10月8日	中和	2	0	2	8	0	8		
9	20	10月13日	吉野	6	0	6	60	0	60	黄色ブドウ球菌 (3)	
	21	10月13日	吉野	0	13	13	0	30	30	黄色ブドウ球菌 (1), セレウス菌 (3)	
	22	10月14日	吉野	4	0	4	8	0	8		
	23	10月14日	吉野	4	0	4	40	0	40	ウエルシュ菌 (1)	
	24	10月13日	吉野	0	10	10	0	29	29	黄色ブドウ球菌 (5), セレウス菌 (4)	
	25	10月13日	吉野	0	5	5	0	10	10	黄色ブドウ球菌 (5)	
10	26	10月26日	郡山	1	0	1	10	0	10	<i>C. jejuni</i> (1)	
11	27	11月15日	中和	3	0	3	29	0	29		
11	28	11月15日	中和	1	0	1	10	0	10		
	30	11月16日	中和	3	0	3	9	0	9		
12	29	11月16日	中和	1	0	1	10	0	10	<i>C. jejuni</i> (1)	
13	31	12月2日	中和	8	0	8	79	0	79		
	32	12月2日	中和	3	0	3	9	0	9		
14	33	12月8日	中和	2	0	2	20	0	20	<i>C. jejuni</i> (2)	
	34	12月9日	中和	1	0	1	10	0	10		
15	35	12月15日	中和	5	0	5	16	0	16	<i>C. jejuni</i> (5)	
	36	12月16日	中和	4	0	4	4	0	4		
16	37	12月21日	中和	4	0	4	40	0	40		
17	38	12月30日	郡山	3	0	3	15	0	15		
18	39	1月19日	中和	3	0	3	11	0	11		
	40	1月19日	中和	4	0	4	40	0	40	<i>C. jejuni</i> (3)	
	41	1月19日	中和	1	0	1	10	0	10	<i>C. jejuni</i> (1)	
	42	1月20日	中和	1	0	1	10	0	10	<i>C. jejuni</i> (1)	
19	43	2月23日	中和	1	0	1	10	0	10		
20	44	3月10日	中和	0	5	5	0	5	5		
	45	3月11日	中和	4	0	4	38	0	38		
	46	3月11日	中和	3	0	3	3	0	3		
21	47	3月25日	中和	1	0	1	10	0	10		
22	48	3月25日	郡山	2	0	2	18	0	18		
合計				111	48	159	830	129	959	51	

\*食中毒と判断され厚生労働省に届け出された事例番号:5, 8, 9, 15, 18

## 結果

2016年度に食中毒等疑いの行政検査として依頼された検査は22事例48件であり、2015年度の28事例41件<sup>5)</sup>より件数はやや多かった(表2)。検体数については、患者便、吐物、従事者便などのヒト由来の111検体(69.8%)と、残食、検食及び施設の拭き取りなどの食品由来の48検体(30.2%)との合計159検体は2015年度の174検体よりやや減少した。しかしながら項目数はヒト由来検体の830項目(86.5%)と、食品由来の129項目(13.5%)との合計959項目は2015年度の887項目より増加していた。

22事例の内、県内事例は13事例37件で、他府県関連調査である県外事例は9事例11件であった。

検出・同定した細菌は9事例(40.9%)51株あり、ヒト由来は30株で、食品由来は21株であった。

菌種別では、カンピロバクターが7事例24株(47.1%)で半数近くを占め、すべて*Campylobacter jejuni*であった。このうちヒト由来が23株で、食品由来は鶏肉からの1株のみであった。

黄色ブドウ球菌は2事例16株(31.4%)検出し、ヒト由来は4株で、食品由来は、ケバブ用ナンや配食弁当のそうざい及び、拭き取りなどから12株であった。

サルモネラ属菌は1事例2株(3.9%)検出し、何れもヒト由来で*Salmonella* Manhattanであった。

その他にウエルシュ菌(*cpe* 保有)を1株(ヒト由来)、大腸菌を1株(食品由来)、セレウス菌を1事例7株(食品由来)検出した。

これら事例のうち、食中毒と判断され厚生労働省に届け出された事例は事例番号5, 8, 9, 15, 18の5件である。

事例番号5及び9は共に黄色ブドウ球菌を病因物質とする事例であったが、奈良県(奈良市除く)においては、平成21年以来の黄色ブドウ球菌による食中毒事件であった。事例5は花火大会の屋台で提供された食品を原因とする事例で、患者便3検体及び食品7検体の検査をしたところ、患者便1検体とケバブ用ナン1検体から、エンテロトキシンA遺伝子保有のコアグラゼIV型の黄色ブドウ球菌を検出した。

事例番号9は配食弁当を原因とする事例で、患者便及び従事者便14検体、食品15検体及び拭き取り13検体を検査したところ、患者便3検体、食品10検体、拭き取り1検体から、エンテロトキシンA遺伝子保有のコアグラゼVII型の黄色ブドウ球菌を検出した。更に、食品4検体及び拭き取り3検体からはセレウス菌(セレウリド合成遺伝子は検出せず)も検出した。

事例番号8, 15及び18は何れも飲食店で提供され

た鶏肉を原因食品と疑われたカンピロバクターを病因物質とする事例であった。事例8は、患者便及び従事者便11検体及び食品8検体の検査をした結果、患者便3検体とささみ1検体から*C. jejuni*を検出した。なお、ささみからは大腸菌も検出したが、病原遺伝子は認めなかった。事例15は、患者便及び従事者便9検体を検査した結果、患者便5検体から*C. jejuni*を検出し、事例18は、患者便及び従事者便9検体を検査した結果患者便5検体から*C. jejuni*を検出した。

## 考察及びまとめ

食中毒等疑いの依頼事例は22事例あり、検体数は159件、項目数は959項目であった。

検出菌は、カンピロバクターが最も多く、次いで黄色ブドウ球菌が多かった。その他ではサルモネラ属菌やウエルシュ菌(*cpe* 保有)も検出した。また食品からは多くのセレウス菌を検出し、引き続き食品の衛生管理に対する注意喚起が必要と考えられた。カンピロバクターについては、3月に発出された通知「カンピロバクター食中毒対策の推進について」<sup>4)</sup>の効果を期待するところであるが、今後も食中毒原因検査で原因菌を明らかにし、データを集積して解析することで、食品衛生の向上に寄与していきたいと考えている。

## 文 献

- 1) 久川祐稔, 片山丘, 今井良美, 他: 病原微生物検出情報, 38, 90-92 (2017)
- 2) 平井晋一郎, 横山栄二, 涌井拓, 他: 病原微生物検出情報, 38, 92-94 (2017)
- 3) 生活衛生・食品安全部監視安全課長通知「老人ホーム等における食中毒予防の徹底について」, 生食監発0916第1号(平成28年9月16日)
- 4) 生活衛生・食品安全部監視安全課長, 消費者庁食品表示企画課長通知「カンピロバクター食中毒対策の推進について」, 生食監発0331第3号, 消食表第193号(平成29年3月31日)
- 5) 奈良県保健研究センター年報, 50, 23-24 (2015)

## 奈良県におけるカルバペネム耐性腸内細菌科細菌 (CRE) の 薬剤耐性遺伝子検出状況

吉田孝子・河口友理・佐伯美由紀・田邊純子・橋田みさを・堀 重俊

Detection of the Antimicrobial-Resistant Gene Identified  
Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae* in Nara Prefecture

Takako YOSHIDA・Yuri KAWAGUCHI・Miyuki SAEKI・Sumiko TANABE・  
Misao HASHIDA and Shigetoshi HORI

### 緒言

カルバペネム耐性腸内細菌科細菌 (carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: CRE) はメロペネムなどのカルバペネム系薬剤及び広域β-ラクタム剤に対して耐性を示す腸内細菌科細菌の総称である。また、カルバペネム系薬剤は、グラム陰性菌による重篤な感染症の治療において、最も重要な抗菌薬である。

近年、世界規模での CRE の増加が懸念されており、日本でも、海外からの輸入事例の早期探知、国内での感染拡大防止を目的として、2014 年 9 月 19 日に感染症法に基づく五類全数把握対象疾患に追加された<sup>1)</sup>。

このような状況を踏まえ、当センターにおける CRE 検査体制の構築を目的に、県内 4 医療機関における臨床分離株について、薬剤感受性試験及び薬剤耐性遺伝子の保有状況の確認を行ったので結果を報告する。

### 方法

#### 1. 材料

2015 年 4 月から 2016 年 3 月までの間に、県内 4 医療機関において CRE と判定された 33 株 (保菌者分離株 24 株を含む) について、提供を受け試験に供した。

#### 2. 薬剤感受性試験

CLSI の抗菌薬ディスク感受性試験実施基準に準拠し、センシディスク (日本 BD) を用い、メロペネム (MEPM)、イミペネム (IPM) 及びセフメタゾール (CMZ) の計 3 薬剤について薬剤感受性試験を実施した。

#### 3. ディスク拡散法によるβ-ラクタマーゼ産生性確認試験

メタロ-β-ラクタマーゼ産生性確認試験として、ミューラーヒントン寒天培地上に、MEPM とセフトジジム (CAZ) のセンシディスクと、メタロ-β-ラクタマーゼ活性阻害剤であるメルカプト酢酸ナトリウム (SMA) ディスク (栄研化学) を配置し、ディスク拡

散法 (double disk synergy test (DDST)) により、阻止円径の拡張を確認した<sup>2,3)</sup>。

また、AmpC β-ラクタマーゼ産生性確認試験として、CAZ とセフミノクス (CMNX) のセンシディスクに AmpC β-ラクタマーゼ活性阻害剤である 3-アミノフェニルボロン酸 (APB) 500 μg を添加し、いずれかの薬剤ディスクにおいて、阻止円径の拡張が 5mm 以上あるかを確認した<sup>4)</sup>。

#### 4. 薬剤耐性遺伝子確認試験

PCR 法によりカルバペネマーゼ遺伝子 (NDM 型、KPC 型、IMP-1 型、IMP-2 型、VIM-2 型、OXA-48 型) の確認を行った<sup>5)</sup>。さらに、カルバペネマーゼ遺伝子を検出した菌株については、ダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定し、National Center for Biotechnology Information (NCBI) の BLAST 解析により薬剤耐性遺伝子を決定した。

### 結果

#### 1. 菌株の由来

供試した 33 株の由来は、性別では、男性 17 株、女性 16 株とほぼ同数であった。年齢は、20 歳未満からは検出せず、70~79 歳が最も多く、60 歳以上の高齢者が 85%を占めた (図 1)。

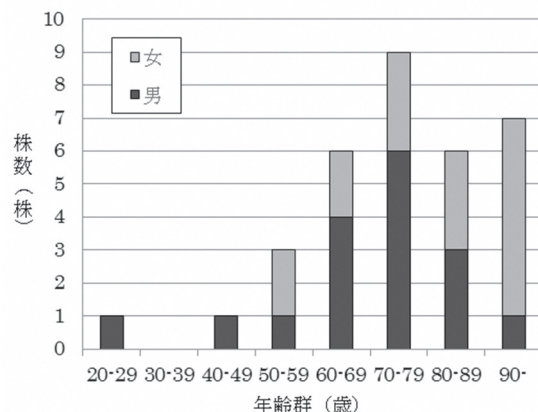


図 1 菌株の由来 (性別年齢分布)

検出部位は、尿が最も多く12株(36%)であった。次いで、喀痰10株(30%)で、その他血液、腹腔ドレーン、膣・子宮分泌物など計11株であった。

菌種は、*Enterobacter aerogenes*が10株(30%)、*Enterobacter cloacae*が8株(24%)、*Escherichia coli*が7株(21%)、*Klebsiella pneumoniae*が3株(9%)、*Citrobacter freundii*が2株(6%)、*Citrobacter braakii*、*Klebsiella oxytoca*、*Serratia marcescens*が各1株であり、*Enterobacter*属菌が全体の半数以上を占めた。

## 2. 薬剤感受性試験

MEPM, IPM 及び CMZ に対する薬剤感受性試験の結果を、CLSI M100-S21 に基づき、耐性 (R), 中間型 (I), 感性 (S) と判定し、感染症法での届出基準に基づく判定と併せて表1に示す。今回、届出基準を満たした株は23株で、MEPM では11株(48%)で、*E. coli*が最も多く6株あり、IPM 及び CMZ では17株(52%) (重複有り)で、*Enterobacter*属菌が多く、10株であった。

## 3. ディスク拡散法によるβ-ラクタマーゼ産生性確認試験

SMA ディスクによる DDST により、阻止円径の拡張が確認できたのは、7株(21%)で、そのうち6株が *E. coli*であった。

CAZ 若しくは CMNX において、APB による阻止円径の拡張が確認できたのは、23株(70%)で、*Enterobacter*属菌が多く18株あった。

どちらのβ-ラクタマーゼ阻害剤でも阻害の効果が認められなかった株が3株あった。

## 4. 薬剤耐性遺伝子確認試験

PCR 法の結果、全33株のうち、8株(24%)でIMP-1型遺伝子を検出した。25株(76%)はいずれの遺伝子も検出しなかった。IMP-1型遺伝子を検出した株の菌種は、*E. coli*が7株、*K. pneumoniae*が1株であった。

PCR 法でIMP-1型遺伝子を検出した8株について、塩基配列を決定し、BLAST による相同性解析を実施した。その結果、7株が *bla*<sub>IMP-6</sub> と一致した。

## 考 察

カルバペネム系薬剤耐性メカニズムは、2つに大別される。1つは、カルバペネム系抗菌薬分解酵素であ

表1 検査結果

No.	菌種	薬剤感受性試験			阻害剤による確認試験		PCR法による 検出遺伝子	シーケンス 結果
		MEPM	IPM	CMZ	SMA	APB		
1	<i>Escherichia coli</i>	R	I	R	+	-	IMP-1	<i>bla</i> <sub>IMP-6</sub>
2	<i>Citrobacter freundii</i>	S	I	R	-	+	-	
3	<i>Enterobacter aerogenes</i>	I	R	R	-	+	-	
4	<i>Enterobacter cloacae</i>	S	I	R	-	+	-	
5	<i>Citrobacter braakii</i>	S	I	R	-	+	-	
6	<i>Enterobacter cloacae</i>	S	I	R	-	+	-	
7	<i>Enterobacter aerogenes</i>	S	I	R	-	+	-	
8	<i>Citrobacter freundii</i>	S	I	R	-	+	-	
9	<i>Klebsiella oxytoca</i>	I	I	S	-	-	-	
10	<i>Serratia marcescens</i>	R	I	R	-	+	-	
11	<i>Enterobacter cloacae</i>	S	S	R	-	+	-	
12	<i>Enterobacter cloacae</i>	S	S	R	-	+	-	
13	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	S	I	R	-	+	-	
14	<i>Escherichia coli</i>	R	S	R	+	-	IMP-1	<i>bla</i> <sub>IMP-6</sub>
15	<i>Escherichia coli</i>	R	S	R	+	-	IMP-1	<i>bla</i> <sub>IMP-6</sub>
16	<i>Escherichia coli</i>	R	S	R	+	-	IMP-1	<i>bla</i> <sub>IMP-6</sub>
17	<i>Escherichia coli</i>	R	S	R	+	-	IMP-1	<i>bla</i> <sub>IMP-6</sub>
18	<i>Enterobacter aerogenes</i>	S	S	S	-	+	-	
19	<i>Enterobacter cloacae</i>	S	I	R	-	+	-	
20	<i>Escherichia coli</i>	S	S	S	-	-	IMP-1	<i>bla</i> <sub>IMP</sub>
21	<i>Enterobacter cloacae</i>	S	S	R	-	+	-	
22	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	I	R	+	-	IMP-1	<i>bla</i> <sub>IMP-6</sub>
23	<i>Escherichia coli</i>	R	S	R	+	-	IMP-1	<i>bla</i> <sub>IMP-6</sub>
24	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	S	S	S	-	-	-	
25	<i>Enterobacter aerogenes</i>	R	I	R	-	+	-	
26	<i>Enterobacter aerogenes</i>	S	S	R	-	+	-	
27	<i>Enterobacter aerogenes</i>	S	R	R	-	+	-	
28	<i>Enterobacter aerogenes</i>	S	S	I	-	+	-	
29	<i>Enterobacter aerogenes</i>	S	S	R	-	+	-	
30	<i>Enterobacter aerogenes</i>	S	S	R	-	+	-	
31	<i>Enterobacter aerogenes</i>	S	I	R	-	+	-	
32	<i>Enterobacter cloacae</i>	S	I	R	-	+	-	
33	<i>Enterobacter cloacae</i>	S	I	R	-	+	-	

■: 届出基準を満たす判定

るカルバペネマーゼを産生するカルバペネマーゼ産生菌 (carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* : CPE) であり、もう1つはカルバペネマーゼを産生せず、AmpC  $\beta$ -ラクタマーゼ (AmpC) 産生菌や、基質特異性拡張型  $\beta$ -ラクタマーゼ (ESBL) 産生菌の外膜蛋白ポーリンが欠損または欠失したことによる薬剤の膜透過性低下である。

CPE については、カルバペネマーゼを産生するカルバペネマーゼ遺伝子はプラスミド上に存在しており、プラスミドは菌種を超えて水平伝達され、耐性遺伝子が拡散する可能性がある。そのため、院内感染対策等、拡散防止のための感染制御が必要となる。さらに、CPE は、カルバペネム系薬剤のみならず、広域  $\beta$ -ラクタム剤を含む他系統の薬剤にも耐性になることが多く、临床上重要視されている。これらの理由で、CRE の中でも CPE については、特にその対策上、検出状況の把握が重要であるが、カルバペネマーゼ非産生菌との鑑別は、表現型だけでは難しく、遺伝子検査が必須となっている<sup>6)</sup>。

今回の調査により、県内医療機関より提供を受けた33株についても、大きく2つのグループが存在することがわかった。1つは、*E. coli* を中心とした、MEPM 耐性で SMA ディスクによる阻止円径の拡張が確認でき、PCR 法により IMP-1 型を検出した CPE である。もう1つは、*Enterobacter* 属菌を中心とした、IPM 耐性若しくは中間型且つ CMZ 耐性で、APB による阻止円径の拡張より AmpC 産生菌と判定できるカルバペネマーゼ非産生菌である。しかし、*Enterobacter* 属菌における、CPE による院内感染事例<sup>7)</sup>も報告されており、菌種によるカルバペネマーゼ産生性の有無の鑑別は難しく、遺伝子検査に依るところは大きい。実際、今回の遺伝子検査の結果、医療機関で CRE と判定された株に、高頻度にカルバペネマーゼ非産生菌が含まれていることが判明した。

シーケンスによる薬剤耐性遺伝子の型別結果によると、IMP-1 型遺伝子保有8株から、*bla*<sub>IMP-6</sub> を7株検出した。*bla*<sub>IMP-6</sub> は、日本で多く検出されているカルバペネマーゼ遺伝子の1つであるが、薬剤感受性試験に IPM を用いた場合、感受性若しくは中間型になり、耐性を示さないことがあるため<sup>8)</sup>、初期のスクリーニングで見逃される恐れがあることが、大きな問題として指摘されている。今回の検査結果においても、IPM については7株中2株が中間型、5株は感受性の結果を示した。しかし、MEPM では7株全て耐性であり、MEPM での薬剤感受性試験の重要性が明らかになった。

さらに、IMP-1 型遺伝子保有のうちの1株 (表1-No.20) は、MEPM、IPM 及び CMZ の3剤に感受性であり、SMA ディスクによる影響がみられず、表現型と遺伝子型が一致しなかった。この株は、シーケンスによる塩基配列の判読の結果、*bla*<sub>IMP</sub> の ORF の上流部に挿入配列 (IS) が確認できた。そのため、IMP 型遺伝子の一部が存在し、IMP-1 型遺伝子を検出したが、カルバペネマーゼは産生せず、表現型と遺伝子型の不一致が起こったものと推察された。

また、今回検査を実施した中には、届出基準を満たさない菌株が存在した。これは、医療機関で実施した薬剤感受性試験結果では、届出基準の基準値付近であったためと考えられた。

CRE の増加は、临床上、さらに院内感染対策上、重大な問題であり、カルバペネマーゼ産生性の有無、カルバペネマーゼ遺伝子の型別を行う上で、地方衛生研究所の果たす役割は大きいと考えられる。

今後も継続して調査を実施し、医療機関等への情報還元を行っていく必要がある。

## 謝 辞

今回の調査を実施するにあたり、菌株と情報を提供して頂きました県内各医療機関の皆様、薬剤耐性遺伝子の型別にご指導、ご助言頂きました国立感染症研究所細菌第二部第一室の皆様には深く御礼申し上げます。

## 文 献

- 1) 健康局長通知「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律施行規則の一部を改正する省令の施行等について (施行通知)」、健発 0909 第1号、(平成26年9月9日)
- 2) N. Shibata, Y. Doi, K. Yamane *et al.* : *J. Clinical Microbiology*, 41, 5407-5413 (2003)
- 3) 国立感染症研究所細菌第二部第一室「薬剤耐性菌研修会資料」(2014年9月)
- 4) F. Javier Pérez-Pérez, Nancy D. Hanson : *J. Clinical Microbiology*, 40, 2153-2162 (2002)
- 5) 国立感染症研究所「病原体検出マニュアル 薬剤耐性菌」(2016年12月)
- 6) 荒川宜親 : 日本化学療法学会誌, 63, 187-197 (2015)
- 7) 安部知子, 永田由美, 青木知信, 他 : 病原微生物検出情報, 35, 289-290 (2014)
- 8) H. Yano, M. Ogawa, S. Endo, *et al.* : *A. Agents and Chemotherapy*, 56, 4554-4555 (2002)



## 奈良県におけるノロウイルス胃腸炎集団発生について -2015/2016 シーズン-

藤谷美沙子・杉本大地・千葉翔子・稲田真知・中野 守・榮井 毅

### Outbreaks of Gastroenteritis Caused by Norovirus in Nara Prefecture -2015/2016 Season -

Misako FUJITANI・Daichi SUGIMOTO・Shoko CHIBA・Machi INADA・Mamoru NAKANO  
and Takeshi SAKAI

#### 緒言

ノロウイルス (Norovirus, 以下 NV) は、冬季に発生が多くみられるウイルス性急性胃腸炎の主な原因ウイルスである。当センターにおいても冬季に行政依頼検査が集中し、保育所、小学校、老人福祉施設等で原因病原体として NV を検出してきた。

NV は、経口感染や飛沫感染によりヒトの小腸で増幅し、吐物や糞便とともに排泄される。患者から排泄された NV が、手指やドアノブ等を介してヒトからヒトへと感染する。また、NV は加熱不十分な二枚貝やウイルスに汚染された食品の喫食により引き起こされる食中毒の原因ウイルスとしても知られている。NV は遺伝子学的多様性に富むことから、その感染予防には幅広い疫学的知見の蓄積が不可欠である。

当センターでは奈良県 (奈良市を除く.) における NV の流行状況を詳細に把握するため、散發事例、食中毒および集団感染事例を対象とし、NV の遺伝子学的、疫学的解析を継続的に実施している<sup>1)</sup>。今回、2015/2016 シーズンに発生した事例について解析を実施したので報告する。

#### 方法

##### 1. 調査対象事例

2015年9月から2016年8月の間に当センターにお

いて県外自治体からの調査依頼事例を除く食中毒 (有症苦情を含む) 事例および集団感染事例 (疑い事例を含む) で検査を実施した 13 事例のうち NV を検出した 9 事例を調査対象事例とした。

##### 2. ウイルス RNA 抽出および NV 遺伝子解析

QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) を用い、添付のプロトコールに従って 10%糞便懸濁上清 140 μL からウイルス RNA を抽出した。プライマー COG1F/G1-SKR および COG2F/G2-SKR を用いた RT-PCR 法<sup>2)</sup> により NV キャプシド領域の増幅を行い、得られた遺伝子増幅産物について、BigDye Terminator Ver1.1 Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用い、添付のプロトコールに従ってダイレクトシーケンスを実施した。塩基配列を決定した後、Norovirus genotyping tool を用いて遺伝子型を判定した。G II.4 と判定された株については、近隣結合 (NJ) 法により参照株を用いた系統樹解析を実施した。G II.17 と判定された株については、プライマー Yuri22F<sup>3)</sup> /G2-SKR を用いて、キャプシド領域と同様の手順により、RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ (RdRp) 領域の遺伝子型を判定した。また、G II.4 と同様に系統樹解析を行った。

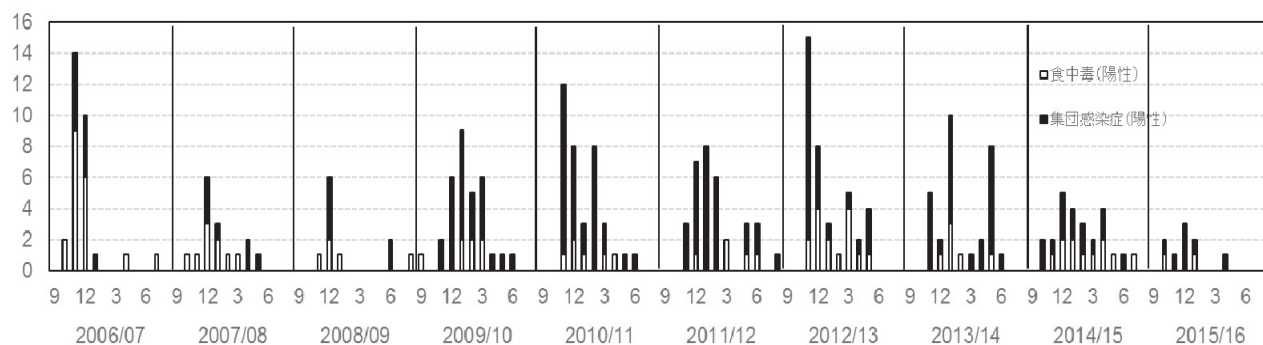


図1 ノロウイルスによる食中毒・集団感染事例数 (当センター検出事例数)

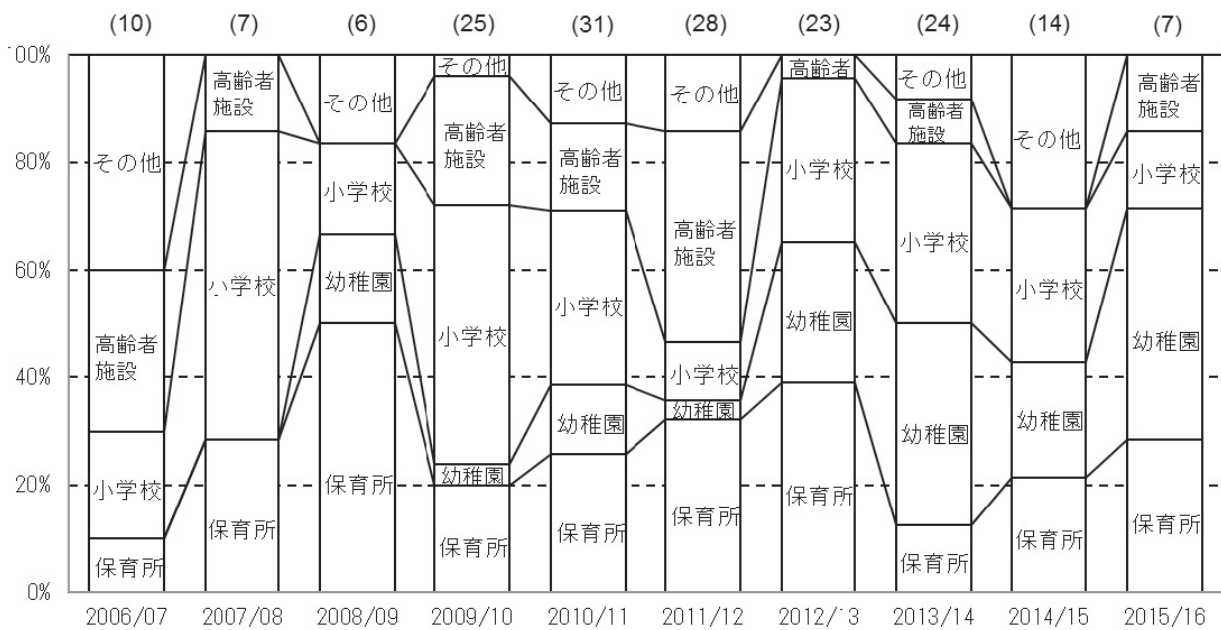


図2 ノロウイルスによる集団感染症事例の発生施設別内訳  
 図上段( )内の数字は事例数を示す

## 結果

### 1. NVによる食中毒・集団感染事例の発生状況

食中毒・集団感染事例の検体採取月別発生状況は、2015年10月2事例、11月1事例、12月3事例、1月2事例、2016年4月1事例であった(図1)。食中毒事例数は、2事例のみの発生であり、過去10シーズンの中で最も少なかった。また、集団感染事例についても7事例と少なく、2014/2015シーズンより半減した。

発生施設別に区分すると、保育所2事例(29%)、幼稚園3事例(43%)、小学校1事例(14%)、高齢者施設1事例(14%)であった(図2)。

### 2. 遺伝子型解析結果

2015/2016シーズンに検出したNVの遺伝子型を表1に示した。9事例の内訳は、GI単独によるものが3事例(33%)、GII単独によるものが6事例(67%)であり、これまでの状況と同様にGIIによる事例が多かった。

ダイレクトシーケンスを行った結果、9例のうちG

II.4によるものが4事例(45%)で最も検出数が多かった。この4事例の株について系統樹解析を行った結果、4事例すべてが2012年に流行したSydney/NSW 0514/2012/AUに近い株であった(図3)。

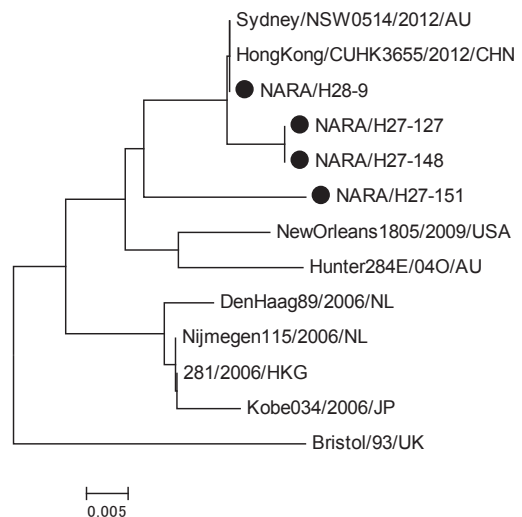


図3 GII.4株のキャプシド領域の塩基配列を用いた系統樹

表1 ノロウイルスによる食中毒・集団感染事例数(当センター検出事例数)

	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	遺伝子型別合計
GI.2		1	1										2
GI.3		1											1
GII.4				3				1					4
GII.17					2								2
事例数合計		2	1	3	2			1					9

また、2014/2015 シーズンに引き続き GII.17 が 2 株検出された。この 2 株の RdRp 領域の遺伝子型は、GII.P17 であった。系統樹解析の結果、2 株ともに Kawasaki308/2015/JP の近縁株であった (図 4)。

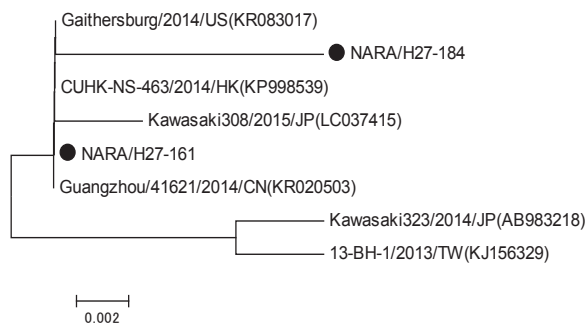


図 4 GII.P17 株の RdRp 一部領域の塩基配列を用いた系統樹

### 考 察

2015/2016 シーズンの奈良県内における NV による食中毒・集団感染症事例について調査した。今シーズンは事例数が非常に少なく、大規模事例もなかった。今シーズン発生事例が減少したことは、GII.17 が大流行することが懸念され、注意喚起が十分になされていたことが影響していると考えられる。

主流遺伝子型である GII.4 は、4 事例から検出された。いずれも 2012 年に大流行をもたらした Sydney/NSW0514/2012/AU に近い株であり、昨シーズンに検出のあった 2006 年流行株の Nijmegen115/2006/NL の近縁株の検出はなかった。

2014/2015 シーズンに引き続き GII.17 が 2 事例から検出された。1 事例は食中毒事例からの検出であり、無症状の成人からも GII.17 を検出した。もう 1 事例は、幼稚園における発生であり、教諭だけでなく園児からも GII.17 を検出した。GII.17 は、小児の感染性胃腸炎事例からの検出が少ないことが指摘されている<sup>4)</sup>。奈良県もこれまで集団発生における GII.17 の検出では、成人での発生が中心であり、子どもでの発生はなく、この事例が初めてであった。今後は、成人だけでなく、子どもでの集団発生も増加する可能性があると考えられる。また、系統樹解析の結果から 2 株ともに Kawasaki308 の近縁株であることがわかった。GII.17 は Kawasaki323 から Kawasaki308 へと進化した流行を維持していると考えられている<sup>5)</sup>。今後 GII.17 は、どのように流行を拡大させていくのか、動向に注視する必要がある。

本報告が示すように長期にわたって調査を継続し

様々な疫学情報を蓄積することは、NV の長期的な発生動向を把握するために必要であると考えている。

### 文 献

- 1) 藤谷美沙子, 杉本大地, 米田正樹, 他: 奈良県保健研究センター年報, 50, 59-61 (2015)
- 2) 医薬食品安全部監視安全課長通知「ノロウイルスの検出法について」, 食安監発第 1105001 号(平成 15 年 11 月 5 日)
- 3) Saito H, Saito S, Kamada K, *et al*: *Microbiol Immunol*, 42, 439-446 (1998)
- 4) 楠原一, 赤地重宏, 小林隆司, 他: 病原微生物検出情報, 36, 91-92 (2015)
- 5) 宗村佳子, 木本佳那, 小田真悠子, 他: 病原微生物検出情報, 38, 5-6 (2017)

## 感染症発生動向調査による患者発生状況：平成 28 年（2016 年）

稲田眞知・藤谷美沙子・杉本大地・千葉翔子・中野 守・榮井 毅

Status of Infection Diseases in Nara Prefecture, 2016

Machi INADA・Misako FUJITANI・Daichi SUGIMOTO・Shoko CHIBA・Mamoru NAKANO  
and Takeshi SAKAI

### 緒 言

感染症発生動向調査は、平成 11 年 4 月から施行された「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律」（感染症法）の大きな柱に位置づけられている。感染症患者発生の情報について、正確に把握・分析し、その結果を国民や医療関係者への提供・公開することにより、感染症発生の予防や蔓延を防止することを目的に、医師等の医療関係者の協力をうけ、全国的に実施されている。奈良県でも、感染症発生動向調査の結果を迅速かつ的確に活用し、事前対応型の感染症予防対策とするため、奈良県感染症発生動向調査事業実施要綱、同要領に基づき調査を実施している。

今回、本県の平成 28 年の患者発生状況についてとりまとめたので報告する。

### 方 法

全数把握対象疾患は、診断した全ての医師が保健所に届出を行い、発生状況を把握している。また、定点把握対象疾患は、知事が指定した定点医療機関（のべ 115 医療機関。平成 28 年 5 月～）を受診した患者数を把握することで流行状況を調査している。平成 28 年には以下のような改正が実施された。全数把握対象疾患では、平成 28 年 2 月にジカウイルス感染症 4 類感染症に追加された。病型でジカウイルス病と先天性ジカウイルス感染症に分けられている。また、平成 28 年 4 月施行の法改正によりインフルエンザ指定提供医療機関制度が開始された事に伴い、定点数の見直しを実施された。

平成 28 年に届出された全数把握対象疾患及び報告された定点把握対象疾患について、感染症サーベイランスシステム（NESID）より情報を収集・解析した。

### 結 果

#### 1. 全数把握対象疾患の発生状況

平成 28 年の全数把握対象疾患の患者届出は延べ

443 件であった（表 1）。なお、現時点（平成 29 年 6 月時点）では速報値であり、後日変更されることがある。

表 1 平成 28 年 全数把握対象疾患 届出数

類別	疾患名	届出数
二類	結核	266
三類	細菌性赤痢	2
	腸管出血性大腸菌感染症	23
四類	E 型肝炎	2
	A 型肝炎	3
	デング熱	5
	ポツリヌス症	1
	レジオネラ症	10
五類	アメーバ赤痢	11
	ウイルス性肝炎	1
	カルバペネム耐性腸内細菌感染症	22
	急性脳炎	4
	クロイツフェルト・ヤコブ病	3
	劇症型溶血性レンサ球菌感染症	5
	後天性免疫不全症候群	3
	ジアルジア症	1
	侵襲性インフルエンザ菌感染症	6
	侵襲性髄膜炎菌感染症	1
	侵襲性肺炎球菌感染症	23
	水痘（入院例）	3
	梅毒	36
	播種性クリプトコックス症	1
	破傷風	3
	バンコマイシン耐性腸球菌感染症	5
	麻しん	3

診断日による集計

#### 1) 一類感染症

届出はなかった。

#### 2) 二類感染症

結核が 266 例の届出があった。昨年の 306 例から減少した。類型は、患者 193 例、疑似症患者 7 例、無症状病原体保有者 66 例であった。患者の病型は、肺結核が 148 例、その他の結核（結核性胸膜炎、結核性髄膜炎、脊椎結核、リンパ節結核、粟粒結核等）が 31 例、肺結核及びその他の結核が 14 例であった。全届出例の年齢階層は、0 歳 3 例、1～10 歳未満 3 例、10

代3例, 20代11例, 30代14例, 40代22例, 50代22例, 60代38例, 70代51例, 80代70例, 90代28例, 100代1例で, 80代が最も多く, 70歳以上で全体の56%を占めていた。

### 3) 三類感染症

細菌性赤痢2例, 腸管出血性大腸菌感染症23例の届出があった。

細菌性赤痢は1月と8月に届出があった。1月の事例は61歳女性で, 菌種は *S. sonnei* (D群), 発病当日に喫食したパイナップルが原因と推定されている。8月の事例は42歳男性で, 菌種は *S. sonnei* (D群), 発病5日前の台湾, 発病1~4日前のインドネシアが推定感染地域とされている。

腸管出血性大腸菌感染症は, 昨年とほぼ同数の届出であった。類型は, 患者13例, 無症状病原体保有者が10例で, その年齢階層は, 10歳未満が5例, 10代が6例, 20代3例, 30代2例, 40代1例, 50代2例, 60代3例, 70代1例であった。10歳女児1例がHUSを呈していた。血清型・検出病原体は, O157が19例 (VT1&VT2が15例, VT2が4例), O26が2例 (VT1が2例), O126が1例 (VT1が1例) であった。HUSの事例は不明である。感染経路としては, 推定ではあるが経口感染が13例, 接触感染が1例, 不明が9例であった。経口感染が推定されているものには肉類の喫食歴の記載があるものが7例, HUSの事例は, 生レバー喫食の記載があった。

### 4) 四類感染症

E型肝炎2例, A型肝炎3例, デング熱5例, ボツリヌス症1例, レジオネラ症10例の届出があった。

E型肝炎は8月と12月に届出があった。8月に届出があったのは, 50代男性で, 感染経路等は不明, 12月に届出があったのは, 30代男性で, 中国での刺身の喫食が推定感染経路とされている。

A型肝炎は, 30代女性2例, 50代男性1例の届出があった。女性はともに感染経路は不明, 男性は台湾での貝類, 生野菜喫食が推定感染経路とされている。

デング熱は2月2例, 3・4・5月に1例ずつ計5例の届出があった。全て海外感染事例である。患者の病型は全てデング熱型で, 症状のうち2日以上続く発熱, 頭痛は全ての事例に共通していた。他には, 発疹のみ1例, 筋肉痛のみ1例あり, 血小板減少・白血球減少の症状の記載があった者は2例であった。感染地域は, インドネシアバリ島が3例, インドネシアジャカルタが1例, シンガポールが1例で, うち3例でウイルス遺伝子検査が実施され, バリ島の患者から1型と2型, ジャカルタの患者から1型が検出されている。

ボツリヌス症は, 2006年以降としては初めての届出であった。10月に届出があったのは62歳の男性で, 病型は食餌性(食中毒)とされている。弛緩性麻痺, 眼瞼下垂, 嚥下困難, 口渇, 便秘, 筋力低下, 呼吸困難を呈していた。国立感染症研究所の検査により, 血清からボツリヌス毒素が検出されている。推定感染地域は不明であった。なお, 届出医より症例報告された<sup>2)</sup>。

レジオネラ症10例の病型は全て肺炎型で, 男性が8例 (50代3例, 60代2例, 70代3例), 女性が2例 (80代1例, 90代1例) となっている。推定感染経路は水系感染が2例, 塵埃感染が1例, 不明が7例となっている。なお, 水系感染と推定されている50代男性が, 発病3日後に死亡している。

### 5) 五類感染症

アメーバ赤痢11例, ウイルス性肝炎1例, カルバペネム耐性腸内細菌感染症22例, 急性脳炎4例, クロイツフェルト・ヤコブ病3例, 劇症型溶血性レンサ球菌感染症5例, 後天性免疫不全症候群3例, ジアルジア1例, 侵襲性インフルエンザ菌感染症6例, 侵襲性髄膜炎菌感染症1例, 侵襲性肺炎球菌感染症23例, 水痘(入院例)3例, 梅毒36例, 播種性クリプトコックス症1例, 破傷風3例, バンコマイシン耐性腸球菌感染症5例, 麻しん3例の届出があった。

アメーバ赤痢の病型は, 腸管アメーバ症9例, 腸管外アメーバ症1例, 腸管及び腸管外アメーバ症1例であった。患者は男性9例 (40代3例, 50代3例, 60代2例, 80代1例), 女性2例 (30代1例, 40代1例) で, 推定感染経路は性的接触4例, 経口感染1例, 不明6例で, 推定感染地域は, 奈良県5例, 県外(都道府県不明含む)5例, 国外(中華人民共和国)であった。

ウイルス性肝炎1例は50代男性で, 遺伝子型不明で推定感染経路は性的接触であった。

カルバペネム耐性腸内細菌科細菌感染症は, 男性12例 (50代1例, 60代3例, 70代4例, 80代4例), 女性10例 (40代1例, 70代3例, 80代2例, 90代4例) で, 全国の状況と同様に60歳以上が多く全体の91%を占めた。病原体検出部位・菌種としては, 血液3例 (*Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter aerogenes*), 血液・胸水・喀痰1例 (*Serratia marcescens*), 血液・尿2例 (MBL産生大腸菌, *Enterobacter aerogenes*), 尿12例 (大腸菌1例, *Citrobacter freundii* 2例, *E. coli* 3例, *Serratia marcescens* 2例, *Enterobacter cloacae* 1例), 喀痰3例 (*Enterobacter cloacae*, 大腸菌, *Klebsiella pneumoniae*), 胆汁2例 (*E. coli*, *Citrobacter freundii*), 便

1例（大腸菌）で、推定感染経路は以前からの保菌が12例、尿路カテーテルからが6例、院内感染1例、職場（介護施設）での感染1例、外傷1例、不明が1例であった。

急性脳炎は、1月に10歳男児、2月に5歳男児、3月に2歳男児、6月に21歳女性の届出があった。原因病原体は、1~2月の男児はインフルエンザA、3月の男児はインフルエンザB、6月の女性は不明とされている。2月の5歳男児には、異常行動、言動が記載されている。

クロイツフェルト・ヤコブ病は、4月に60代及び70代男性1例ずつ、7月に70代女性の届出があった。3例とも病型は、古典型クロイツフェルト・ヤコブ病(CJD)であった。

劇症型溶血性レンサ球菌感染症は、2006年以降としては最多（5例）の届出があった。全国的にも2015年より増加している。3月届出の70代女性の血清群はA群、6月届出の60代男性はB群、9月届出の50代男性はB群で発病2日後に死亡、10月に届出があった80代女性はA群で病原体は*S. dysgalactiae*との記載があった。12月に届出があったのは、80代男性で血清型はC群及びG群で、発症翌日に死亡している。全例がショックとDICを呈していた。推定感染経路は50代男性が経口感染、60代男性が皮膚感染、80代女性が足白癬、その他は不明等と記載があった。

一方、後天性免疫不全症候群の届出は、2006年以降では最少の3例であった。全て男性で、2月に届出があった2例はともに27歳、病型はAIDSであった。AIDSと診断した指標疾患は、ニューモシスティス肺炎1例と、カンジダ症及びサイトメガロウイルス感染症1例であった。8月に届出（6月診断）があった35歳男性の病型は無症状病原体保有者であった。感染経路は27歳男性2名は性行為感染（同性間性的接触）、35歳男性は性行為感染（異性間性的接触）であった。

ジアルジア症1例は、40代男性で、便検体から鏡検にてランブル鞭毛虫シストが検出されていた。推定感染経路には、5年前の大韓民国への渡航歴の記載があった。

侵襲性インフルエンザ菌感染症は、3月に80代女性、4月に60代女性、6月70代及び90代男性1例ずつ、7月80代男性、12月80代女性の計6例の届出があった。このうち80代男性は死亡している。血清型については、80代女性のみ記載がありb型とされている。また80代男性の検出病原体として*Haemophilus influenzae* +  $\beta$ ラクタマーゼとの記載があった。推定感染経路は、飛沫・飛沫核感染が2例、咽頭常在菌と

されているもの1例、その他は不明であった。

侵襲性髄膜炎菌感染症1例は、1月に届出のあった70代女性で感染死亡者とされている。意識障害・心肺停止状態で緊急搬送され、その次の日に死亡している。保健所による調査では、搬送される前々日までは特に変わりなく、前日に体調不良が発現していたとのことで、髄膜炎菌感染症特有の突発的な発症であったことがわかる。血清型については、保健研究センターを通じて国立感染症研究所で検査が実施され、Y型と決定された。

侵襲性肺炎球菌感染症は、昨年と横ばいの届出数であった。男性11例、女性12例で、40代1例、50代2例、60代4例、70代5例、80代10例、90代1例であった。90代女性は、発病5日後に死亡している。ワクチン接種歴があったのは2例であった。

水痘（入院例に限る）3例の病型は全て臨床診断例であった。40代及び50代男性、20代女性であった。50代男性は、蜂窩織炎及び横紋筋融解症、20代女性は妊婦水痘を呈していた。推定感染経路は飛沫・飛沫核感染1例、飛沫・飛沫核感染及び接触感染が1例、不明1例であった。

梅毒は36例届出があった。平成26年より急増しており、さらに昨年より倍増している（H26:16, H27:19）。平成26年から全国的に梅毒の届出が増加しており、当初は特に男性同性愛者の中でHIV感染症および梅毒の流行がみられていたが、徐々に女性も拡大している。本県でも、男性24例、女性12例と男性が多いが、ともに昨年より増加した。年齢層は、男性は20代7例、30代8例、40代3例、50代1例、60代3例、70代2例で、女性が10代1例、20代6例、30代3例、40代1例、90代1例で、男女ともに20代の増加が著しい。患者の病型は、早期顕症梅毒28例（Ⅰ期：男性15例、女性2例、Ⅱ期：男性6例、女性5例）、晚期顕症梅毒1例（男性）、無症候（無症状病原体保有者）6例（男性2例、女性4例）であった。感染経路は性的接触が29例（同性間5例、異性間20例、不明4例）、不明7例であった。同性間は男性のみである。推定感染地は、奈良県16例、奈良県以外（都道府県不明を含む。）19例、国外（中華人民共和国・マカオ）1例であった。なお、早期顕症梅毒（Ⅱ期）の22歳の女性には、妊娠32週との記載があった。

播種性クリプトコックス症は、平成26年9月から全数把握対象疾患となったが、平成28年に初めて届出があった。届出は71歳の男性で、免疫不全が感染原因とされているが、頭痛等の典型的な脳髄膜炎症状の記載は無い。

破傷風 3 例は、80 代男性 2 名と 60 代女性 1 名であった。すべて臨床決定（症状及び受傷歴等）であった。3 例とも開口障害があり、嚥下・発語障害や瘻笑を呈していた。

バンコマイシン耐性腸球菌感染症は、昨年引き続き届出があったが、5 例の届出はこれまででは最多である。男性が 60 代と 70 代の 1 例ずつ、女性が 60 代 2 例と 80 代 1 例であった。病原体検出部位・菌種としては、尿（カテーテル尿含む）4 例（*Enterococcus Faecium*, *Enterococcus faecalis*）、腹水 1 例（病原体検索未実施）であった。なお、耐性遺伝子の検索は全例実施されていない。

麻しんは、昨年引き続き届出があった。平成 28 年の夏には、関西空港利用者の麻しん集団感染が発生し、本県でも患者発生が見られた。またこれとは別に、ほぼ同時期に輸入事例に関連する集団発生も見られた。関空関連の事例は、30 代の女性で関空の利用歴があった。発症から届出まで経過していたため、抗体検査（ペア血清での抗体価の有意上昇）で診断されている。病型は修飾麻しんで、ワクチン接種歴は 1 回有りと確認されている。別の輸入事例関連では、2 名（40 代男性、30 代女性）の発生があった。この 2 名は発症前日の麻しん患者（他自治体より届出）と室内での接触があった。2 名ともワクチン接種歴は不明とされている。30 代女性は本人の記憶で 2 回接種歴有りとこの事ではあったが、母子手帳等で確認できなかった。病型はこの 30 代女性は修飾麻しん、40 代男性は麻しんであった。また別に 1 名が他自治体から届出されている。この事例については、拡大防止のため報道発表による情報提供により周知が図られ、この後の発生はみられなかった。この事例は保健研究センターによる検査で、麻しんウイルス D8 型が検出されている。これら麻しんの集団感染については、接触者の健康監視等調査が実施されるが、情報センターには情報は入ってこない。県庁保健予防課対応となっている。

## 2. 定点把握対象疾患の流行状況

法改正に伴い定点数の見直しが実施され、平成 28 年 18 週より定点数が変更された（表 2）。

### 1) 週単位報告対象疾患（週報）

週報告対象の 19 疾患について、週別患者報告数を表 3 に示す。突発性発しんの定点当たり報告数及び県の出生率（人口千対：2015 年）を基に小児科定点把握対象疾患に限り定点当たり報告数を修正し比較すると、全国レベルより多かったもの、少なかったもの、全国並みであったものに分けられた。全国より多かった疾

患が、伝染性紅斑、流行性耳下腺炎、全国並みであったものが RS ウイルス感染症、百日咳、全国より少なかったものが咽頭結膜熱、A 群溶連菌咽頭炎、感染性胃腸炎、水痘、手足口病、ヘルパンギーナであった。平成 28 年の年間定点当たり報告数で、上位 5 疾患の①感染性胃腸炎、②インフルエンザ、③A 群溶血性レンサ球菌咽頭炎、④流行性耳下腺炎、⑤RS ウイルス感染症について、以下に発生状況を述べる。

表 2 患者定点医療機関数

定点名称	保健所	～17 週	18 週～
インフルエンザ (内科)	奈良市	4 (1)	5 (1)
	郡山	6	5
	中和 (東)	4 (2)	4 (1)
	中和 (西)	4	4
	内吉野	1	1
	吉野	1	1
	小計	20 (3)	20 (2)
小児科 (兼インフルエ ンザ定点)	奈良市	7 (4)	9 (4)
	郡山	10 (2)	9 (1)
	中和 (東)	7 (3)	7 (2)
	中和 (西)	7 (3)	6 (3)
	内吉野	1 (1)	1
	吉野	2 (2)	2 (1)
	小計	34 (15)	34 (11)
眼科	奈良市	1	3
	郡山	3	3
	中和 (東)	2 (1)	2 (1)
	中和 (西)	2	2
	内吉野	0	0
	吉野	1	0
	小計	9 (1)	10 (1)
性感染症 (STD)	奈良市	3	3
	郡山	2	3
	中和 (東)	2	2
	中和 (西)	2	3
	内吉野	0	0
	吉野	0	0
	小計	9	11
基幹	奈良市	1 (1)	1 (1)
	郡山	2 (2)	2 (1)
	中和 (東)	1 (1)	1 (1)
	中和 (西)	1 (1)	1 (1)
	内吉野	1 (1)	0
	吉野	0	1 (1)
	小計	6 (6)	6 (6)
合計		112 (25)	115 (20)

( )内は、病原体定点数





### (1) 感染性胃腸炎

平成 28 年の秋には、ノロウイルス GII.2 による感染性胃腸炎の流行があり、第 46 週には警報開始基準値 (20) を超え、平成 18 年以來の警報発令となった。警報は第 46 週から第 50 週まで継続した (図 1)。

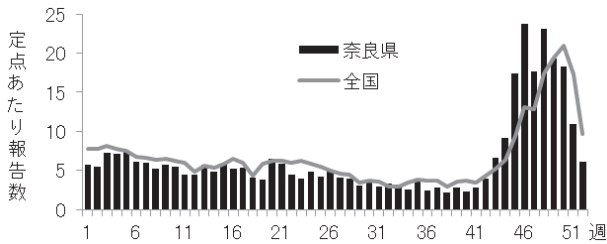


図 1 感染性胃腸炎

### (2) インフルエンザ

平成 28 年のインフルエンザは、第 1 週に流行の目安となる 1 を超え、第 4 週に注意報開始基準値の 10 を、第 6 週に警報開始基準値の 30 を超えて警報発令となった。その後第 12 週まで警報は継続した。また年末の第 46 週に 1 を超えたが、感染性胃腸炎の流行と重なったこともあり、注意報発令には至らなかった (図 2)。

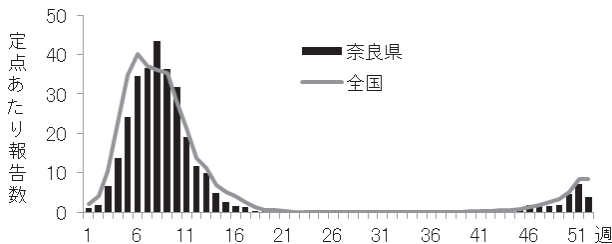


図 2 インフルエンザ

### (3) A 群溶血性レンサ球菌咽頭炎

概ね、全国と同様の推移であったが、定点あたり報告数は、年間をとおして全国より低かった (図 3)。

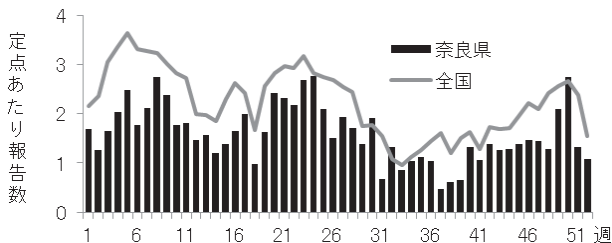


図 3 A群溶血性レンサ球菌咽頭炎

### (4) 流行性耳下腺炎

平成 27 年秋より流行が始まったが、平成 28 年になっても終息することなく次年に続いている。流行性耳下腺炎の流行に伴い、無菌性髄膜炎患者からのムンプスウイルス分離も多かった。1 年を通じて全国より高いレベルで推移した (図 4)。

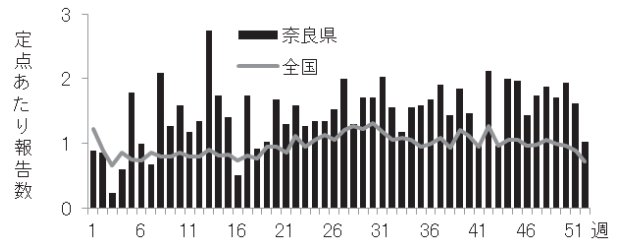


図 4 流行性耳下腺炎

### (5) RS ウイルス感染症

第 30 週頃より増加が始まり、第 41 週をピークとして減少し、全国とほぼ同様の流行状況であった。平成 27 年には全国より高いレベルであったが、平成 28 年は全国並と考える。患者は 2 歳未満で 67% を占めた。 (図 5)。

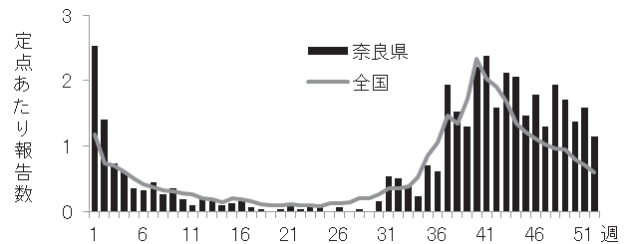


図 5 RS ウイルス感染症

## 2) 月単位報告対象疾患 (月報)

月報対象の性感染症 4 疾患及び薬剤耐性菌感染症 3 疾患について月別の報告数を表 4 に示す。性感染症では、4 疾患とも昨年からはほぼ横ばいであった。性器ヘルペスウイルス感染症では、10~14 歳からの届出があった。薬剤耐性菌感染症 3 疾患とも 70 歳以上が最も多かった。

## 考 察

平成 28 年に流行した疾患としては、ロタウイルスによる小児の感染性胃腸炎の流行があった。例年より流行開始が早く、地域によっては前年年末より流行が開始し、また好発年齢よりも年長児の学童などでも流行が見られた。定点医療機関等へ使用するワクチン (1 価 or 5 価) や流行状況を照会し、流行状況の把握に努めた。また、夏の麻しんの流行以降、全国的に、患者が発生すると患者の行動履歴や公共交通機関の使用履歴などが広く情報提供されるようになった。この麻しん発生の情報については、医師会のメーリングリストなどを通じて、感染症情報センターから直接医療機関へ情報提供することとした。また、2 月に WHO が緊急事態宣言 (PHEIC) を発表したジカ熱は、本県では患者発生はなかったが、流行するブラジルでオリンピック等開催されることもあり、注意喚起を繰り返し実施

表4 平成28年 月単位報告対象疾患 報告数

		1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	総数	
性 感 染 症	性器クラミジア感染症	男	4	1	7	3	3	6	8	7	8	9	2	3	61
		女	4	2	3	2	10	11	10	6	4	3	9	6	70
	性器ヘルペスウイルス感染症	男			2	2	1	1				2	2	1	11
		女	2	2	2	2	7	4	10	3	5	2	3	3	45
	尖圭コンジローマ	男	5		3	3		1	3	3	4	2	1	1	26
		女	2		1	2	4	3	2	2	4	4	1	4	29
淋菌感染症	男	3	1	1	2		5	3	4	4	6	2	2	33	
	女			1	1	4				1			2	9	
薬 剤 耐 性 菌	メチシリン耐性黄色ブドウ球菌感染症	男	25	54	12	16	27	20	18	27	22	19	27	26	293
		女	11	20	13	11	16	12	12	6	18	16	13	11	159
	ペニシリン耐性肺炎球菌感染症	男	8	11		5	9	6	5	4	5	4	6	9	72
		女	1	3		2	3	1	4	2	3	2		5	26
	薬剤耐性緑膿菌感染症	男													
		女						1			1				2

した。年末頃からは、高病原性鳥インフルエンザ（H5N6 亜型）が各地で発生し、本県では発生はなかったが、発生状況等情報提供に努めた。一方、前年に絶えず発生していた MERS に関連する健康監視事例は1例のみと激減した。感染症情報センターや本庁等から、長期休暇の前には情報提供等周知された効果があったと思われる。

今後も感染症に関する情報収集と迅速な情報提供を心がけ、感染症対策の一助となるよう努めたい。

#### 謝 辞

奈良県感染症発生動向調査事業にご協力いただきました奈良県医師会、各医療機関方々及び関係機関の方々に深謝いたします。

#### 参考資料

- 1) 厚生労働省，国立感染症研究所：感染症週報
- 2) 殿村修一，佐藤公俊，山本圭一，他：病原微生物検出情報，38，147-148 (2017)

## 第3章 調査研究・報告

### 第2節 資 料



## 食品中に混入した抗凝固剤系殺鼠剤の分析法の検討

米田正樹・山本雄也・山下浩一・岡山明子

## Examination of Analysis of Anticoagulant Rodenticides in Foods

Masaki YONEDA・Yuya YAMAMOTO・Hirokazu YAMASHITA and Akiko OKAYAMA

## 緒言

血液抗凝固作用をもつ殺鼠剤はワルファリンなどのクマリン系と、ダイファシノンなどのインダンジオン系がある。中でもワルファリンやクマテトラリルなどを成分とする殺鼠剤はホームセンター等で一般住民が入手可能な薬剤であり、保管状況によっては故意、過失を問わず食品への混入は常に発生し得る危険性を有している。また国内販売の殺鼠剤に限らず、平成26年7月には輸入冷凍食品にダイファシノンが混入された加工食品が市中に出回る事案が発生しており(<http://www.mhlw.go.jp/stf/houdou/0000051918.htm>1), 殺鼠剤による健康危機事象の発生が危惧される。

健康危機事象発生時は、混入物質の早期特定が原因究明に重要であるが、抗凝固剤系殺鼠剤の分析法の多くは臨床検体を対象としたものである<sup>2)</sup>。今回、食品を対象とした抗凝固剤系殺鼠剤一斉分析方法を検討したので報告する。

## 実験方法

## 1. 試料

市販のししゃも、冷凍ぎょうざ、レトルトカレー、冷凍エビピラフ、冷凍からあげを対象とした。

## 2. 試薬等

## 1) 標準品

残留農薬試験用プロマジオロン(和光純薬工業製)、残留農薬試験用ダイファシノン(和光純薬工業製)、残留農薬試験用ワルファリン(和光純薬工業製)、残留農薬試験用クマテトラリル(和光純薬工業製)、農薬分析用高純度クロロファシノン(アルドリッチ製)、残留農薬試験用プロディファコウム(関東化学製)、ピンドン標準品(和光純薬工業製)、残留農薬試験用ジフェチアロン標準液(関東化学製)を使用した。

## 2) 標準溶液

ジフェチアロン以外の標準品は10 mgを精密に量り、それぞれアセトニトリルで正確に10 mLとし、標準原液とした(1000 ppm)。ジフェチアロンを含めこれらの溶液は、適宜、メタノールで希釈して使用した。

## 3) 精製用ミニカラム

エチレンジアミン-N-プロピルシリル化シリカゲルミニカラムはSUPELCO PSA SILICA 500 mgを使用した。

## 3. 装置

アジレントテクノロジー社製Agilent6430を使用し、ネガティブモードで測定した。

## 4. 試験溶液の調製

試料を粉砕し1 gを採り、アセトニトリル9 mLを加えて、超音波発生装置で約5分間抽出した。抽出後アセトニトリル相1 mLを予めアセトニトリル10 mLでコンディショニングしたSUPELCO PSA SILICA 500 mgに負荷し、アセトニトリル-ギ酸混液(50:1)40 mLで溶出後、エバポレーターでアセトニトリルを除去した。残留物をメタノールで1 mLに定容し、0.45 μmメンブランフィルターでろ過、試験溶液とした。

## 5. 測定条件

LC条件を表1に、MS/MS条件を表2に示す。

表1 LC条件

カラム	Imtakt Cadenza CD-C18 3 μm, 2 mm×150 mm
カラム温度	40°C
移動相	A:10 mM 酢酸アンモニウム溶液 B:10 mM 酢酸アンモニウムメタノール溶液
流速	0.2 mL/min
グラジエント	B%濃度: 20%→95%(15 min) →95%(25 min)→100%(25.1 min) →100%(35 min)→20%(35.1 min)
データ取込	5~25 min
注入量	5 μL

なお、LCのグラジエント条件では、夾雑物を溶出させるためPostRunを10 min設けた。イオンソースの条件は、Gas Temp 350°C, Gas Flow 10 L/min, Nebulizer 60 psi, Capillary Voltage 3500 V, Delta

EMV 600 Vとした。また、四重極分解能はMS1 Res およびMS2 Res それぞれWide, Dwell time はすべて28 msecとした。

表2 MS/MS 条件

	Prec Ion	Prod Ion	Frag (V)	CE (V)
ワルファリン (T)	307	250	115	14
ワルファリン (Q)	307	161	115	10
クマテトラリル(T)	291	143	140	40
クマテトラリル(Q)	291	141	140	20
ブロマジオロン(T)	525	250	100	34
ブロマジオロン(Q)	525	79	100	62
ダイファシノン(T)	339	167	70	18
ダイファシノン(Q)	339	88	70	70
プロディファコウム(T)	521	79	70	52
プロディファコウム(Q)	521	135	70	40
クロロファシノン(T)	373	201	70	16
クロロファシノン(Q)	373	145	70	16
ピンドン(T)	229	116	70	36
ピンドン(Q)	229	88	70	52
ジフェチアロン(T)	537	79	265	52
ジフェチアロン(Q)	537	109	265	60

結果

1. 検量線

いずれの標準溶液でも 1 ppb から 15 ppb の範囲で良好な直線性 (R<sup>2</sup>≥0.999) が得られた。

2. クロマトグラム

各標準品の 10 ppb 溶液のクロマトグラムを図1に、しししゃも抽出液中で最終検液濃度が 10 ppb になるように添加した時のMRM クロマトグラムを図2に、各食品抽出液のTIC クロマトグラムを図3に示す。

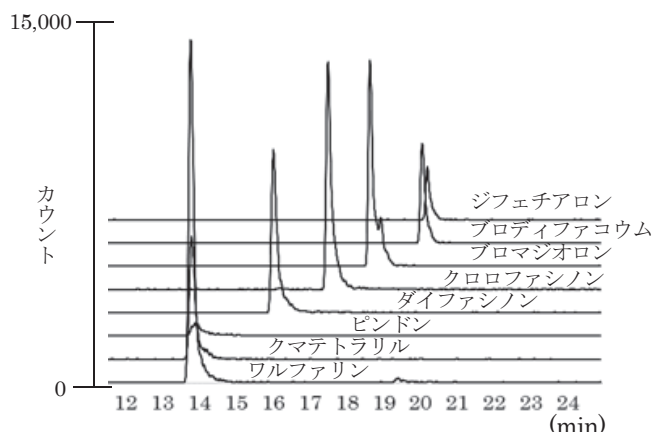


図1 10 ppb 標準溶液のMRM

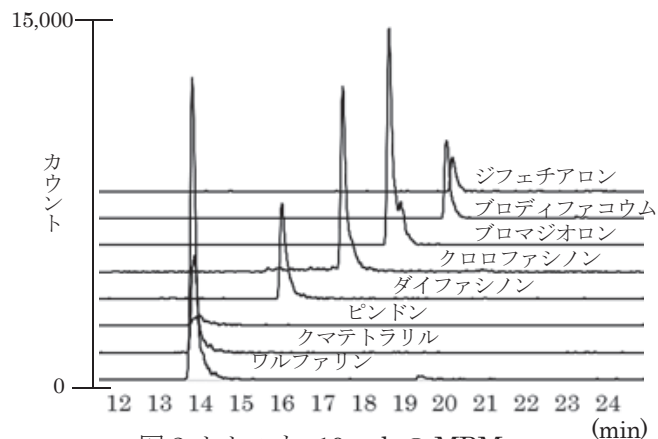


図2 しししゃも+10 ppb のMRM

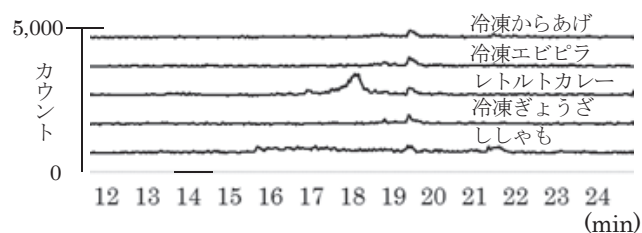


図3 各食品抽出液のTIC

3. 添加回収試験

本試験法により、絶対検量線法での添加回収試験 (0.1 mg/kg)の結果は表3のとおりである (n=1)。

表3 添加回収試験結果

	しししゃも	冷凍ぎょうざ	レトルトカレー	冷凍エビピラ	冷凍からあげ
ワルファリン	71.6	71.0	67.7	59.2	51.7
クマテトラリル	74.7	70.3	70.8	57.8	50.1
ブロマジオロン	86.4	61.0	54.3	56.8	40.2
ダイファシノン	50.1	68.9	57.4	57.4	48.5
プロディファコウム	70.7	66.6	54.9	61.2	42.8
クロロファシノン	66.8	71.6	57.5	63.6	49.2
ピンドン	76.3	64.2	74.3	57.3	53.9
ジフェチアロン	61.4	64.2	55.2	63.7	51.8

単位 (%)

考察

今回検討した方法では、添加回収試験の結果、50%を下回る場合もあった。健康危機事象発生時には高濃度での汚染が想定されるため、一定の対応は可能と考えるが、今後、さらに迅速かつ安価で精度のよい分析法に改良する予定である。

文献

1) Schaff, J.E., Montgomery, M.A. :*J. Anal. Toxicol.*,37, 321-325 (2013)

## 奈良県における腸管出血性大腸菌検出状況：2016年度

田邊純子・久野翔平・辻本真弓・橋田みさを・堀 重俊

Prevalence of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Detected in Nara Prefecture, 2016

Sumiko TANABE・Syohei HISANO・Mayumi TSUJIMOTO・Misao HASHIDA and Shigetoshi HORI

### 緒言

腸管出血性大腸菌 (enterohemorrhagic *Escherichia coli*: EHEC) 感染症は、感染症法で三類感染症に指定され、診断した医師の全数届出が義務付けられている。感染者から分離された菌株は、保健所等の協力で当センターに搬入され、性状、血清型及び毒素型等の確認後、厚生労働省通知に基づき国立感染症研究所(以下、感染研)へ送付する。感染研では全国からの菌株について DNA 型別解析を実施し、全国的状況を把握すると共に、結果を地方衛生研究所へ還元する。当センターではその結果を保健所等へ報告している。

本報では、2016年4月から2017年3月の間に奈良県で届出された EHEC 感染症と当センターへ搬入された EHEC 菌株について、患者情報や細菌検査の結果等をまとめたので報告する。

### 材料と方法

#### 1. 材料

2016年4月から2017年3月の間に奈良県で報告された EHEC 感染者は18例あり、そのうち EHEC が分離されなかった1例(溶血性尿毒症症候群(HUS)発症例)を除く17例から分離された EHEC 菌株17株(保健所等から搬入15株、当センターで検出2株)を対象として検査を実施した。患者情報は、保健所の調査結果に基づく。

#### 2. 血清型別及びベロ毒素(VT)型別

血清型別は、病原大腸菌免疫血清「生研」(デンカ生研)を使用した。VT型別は、Cebulaら<sup>1)</sup>のプライマーによるPCRで遺伝子を確認し、またWangら<sup>2)</sup>のプライマーによるPCRで変異型VT2遺伝子(*stx2c*, *stx2d*, *stx2e*及び*stx2f*)の保有状況を調査した。

#### 3. 薬剤感受性試験

アンピシリン(ABPC)、セフトキシム(CTX)、セフポドキシム(CPDX)、ゲンタマイシン(GM)、カナマイシン(KM)、ストレプトマイシン(SM)、テトラサイクリン(TC)、シプロフロキサシン(CPFX)、ナリジクス酸(NA)、ST合剤(ST)、クロラムフェニ

コール(CP)及びホスホマイシン(FOM)の12薬剤について、センチ・ディスク(日本BD)を用いた感受性試験をCLSI法に準拠して実施した。

#### 4. 分子疫学解析

O157株はIS-printing system(東洋紡、以下IS)法による遺伝子型別を実施した。また感染研に送付した菌株のうちO157、O26及びO111株は反復配列多型解析(MLVA)法が実施されMLVA type及びMLVA complexが、他のO血清株はパルスフィールド・ゲル電気泳動(PFGE)解析の結果が情報提供された。

### 結果

#### 1. 腸管出血性大腸菌の検出状況

月別検出数は8月に5株(29.4%)、6月に4株(23.5%)と多く、7月の発生はなかったものの例年同様、夏期に多かった(図1)。

年齢は9歳から79歳までと幅広く、性別で見ると男性7人、女性10人であった(図2)。

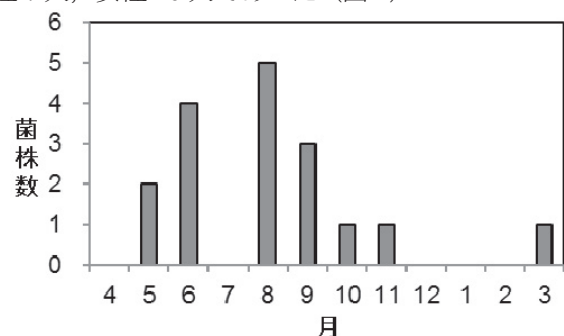


図1 月別検出状況

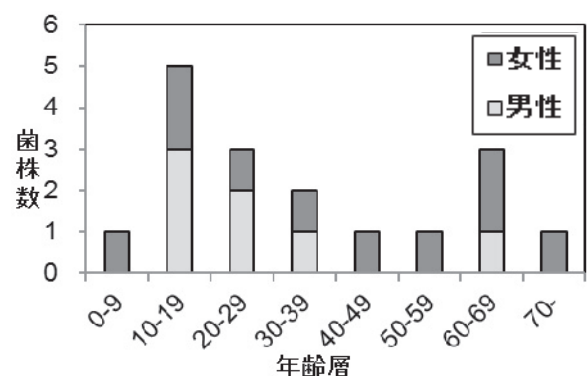


図2 年齢別・性別検出状況

## 2. 臨床症状

対象とした EHEC 菌株 17 株における感染者の臨床症状を見ると、O157 感染 13 例中 9 例が有症で、腹痛（8 例）と血便（7 例）が多く、他は下痢（5 例）、嘔吐（4 例）及び発熱（2 例）であった。O26 感染 2 例と O111 感染 1 例はいずれも有症で血便が見られた。O126 感染 1 例は無症状病原体保有者であった。EHEC 分離症例に HUS 発症例はなかった。

## 3. 血清型・毒素型

O 血清群は 4 種類あり（表 1）、O157 が 13 株（76.5%）と最も多く、全て O157:H7 であった。O26 は 2 株（11.8%）あり全て O26:H11 だったが、1 株はリジンデカルボキシラーゼ陰性を示した。他に O111:H- と O126:H20 が各 1 株あった。O126:H20 は典型的な大腸菌の生化学的性状を示し、セフィキシム・亜テルル酸カリウム（CT）含有平板培地では発育しなかった。毒素型は、O157 は VT1&VT2 が 9 株、VT2 単独が 4 株であった。VT1&VT2 の 1 株は、届出時情報では VT1 単独だったが当センターで PCR の結果、VT1 & VT2 と判明した。O26 と O111 及び O126 は全ての株が VT1 単独であった（表 1）。変異型 VT2 遺伝子は、*stx2c* 遺伝子を O157:H7:VT2 の 2 株から検出した。

表 1 血清型と毒素型

	VT1	VT2 ( <i>stx2c</i> )	VT1&VT2	合計
O157 : H7	0	4 (2)	9	13
O26 : H11	2	0	0	2
O111 : H-	1	0	0	1
O126 : H20	1	0	0	1
合計	4	4 (2)	9	17

表 2 薬剤感受性試験

O血清群	耐性	耐性薬剤名	菌株数
O157	1剤	ABPC	1
		CP	1
	なし	—	11
O26	なし	—	2
O111	なし	—	1
O126	2剤	SM, TC	1

## 4. 薬剤感受性試験

1 剤以上に耐性を示した菌株は O157 に 2 株（それぞれ 1 剤に耐性）、O126 に 1 株（2 剤に耐性）で計 3 株あり、他は全て 12 薬剤に感受性を示した（表 2）。

## 5. 分子疫学解析

O157 菌株 13 株について IS 法を実施し、データを近畿 IS データベースに準じてセット毎に十進数の数値に変換した（IS コード）。その結果、13 株は 11 タ

イプに分類され、2 株以上で一致した IS コードは 2 タイプあった。この 2 タイプはそれぞれ疫学的関連性のある菌株（発症者と祖母、発症者と夫）で構成されており、感染研による MLVA type も同じであった。

## 考 察

全国における 2016 年 1 月から 12 月までの EHEC 感染症報告数は全国で 3,645 例であり、前年の 3,568 例より少し増加していた<sup>3)</sup>。奈良県においては 2016 年 4 月から 2017 年 3 月の間に 18 例の報告があり、前年の 33 例より減少した。

EHEC 菌株は 18 例中 17 例から 17 株が分離され、そのうち 2 株はそれぞれ患者発生に伴う接触者検便により当センターで検出した。この 2 事例では IS 法と感染研による MLVA 法の結果がそれぞれ同じタイプを示し、同一感染源と考えられた。両事例とも患者と無症状病原体保有者は同居家族だったが、家庭で焼肉や自家製ハンバーグといった肉料理の喫食があり、二次感染による家族内感染かどうかは不明であった。

保健所による患者調査情報を見ると、有症者 12 名のうち 11 名が発症前 1 週間ほどの間に焼肉等肉料理を喫食していた。中には生焼けだったとの記憶もあり、食肉は適切に加熱して喫食する必要があることを引き続き注意喚起することが、EHEC 感染者減少のためには重要であると考えられる。

2016 年度は、リジンデカルボキシラーゼ陰性 O26 や、県内分離例として初の O126 のような稀な性状や血清型の菌株を扱う機会があった。これらの性状等情報は収集・蓄積していき、様々な検査に対応できるように努めていきたい。今後も EHEC 感染症事例における分離株について、各種試験の実施やデータ蓄積を継続して、科学的側面から県内感染症の予防と拡大防止に寄与していきたいと考えている。

菌株収集にご協力を頂いた県内医療機関等と保健所関係者の皆様、そして DNA 型別解析結果を還元して頂いた国立感染症研究所の皆様に、深謝いたします。

本報告内容の一部は、厚生労働科学研究費補助金新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業の支援を受けて実施した。

## 文 献

- 1) Cebula TA, Payne WL, Feng P, *et al.* : *J. Clin. Microbiol.*, 33, 248-250 (1995)
- 2) Wang G, Clark CG, Rodgers FG, *et al.* : *J. Clin. Microbiol.*, 40, 3613-3619 (2002)
- 3) 病原微生物検出情報, 38, 87-90 (2017)



## 奈良県における結核菌の分子疫学調査（2016年度）

辻本真弓・田邊純子・橋田みさを・堀 重俊

Molecular epidemiological research of *Mycobacterium tuberculosis* in Nara Prefecture (2016)

Mayumi TSUJIMOTO・Sumiko TANABE・Misao HASHIDA and Shigetoshi HORI

## 緒言

結核の国内患者数および罹患率（人口10万人に対する新登録結核患者数）は減少傾向にあるが、2015年の新登録結核患者数は未だ1万8千人以上報告されており（厚生労働省：平成27年結核登録者情報調査年報集計結果、<http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000132952.html>）、我が国の主要な感染症である。奈良県における2015年の新登録結核患者数は230人で、罹患率は16.8と全国値（14.4）より高く、全国で5番目に高い罹患率であった。

平成28年11月25日付け厚生労働省健康局長通知により「結核に関する特定感染症予防指針」が一部改正され、結核菌が分離された全ての患者の菌株を確保し、その検査結果を積極的疫学調査等に活用するよう努めることと明記された。遺伝子型別手法であるVariable numbers of tandem repeats (VNTR) 型別による解析が地方衛生研究所において進められており、奈良県においても、2013年度に「奈良県結核菌分子疫学調査事業」を開始し、県内保健所から搬入された結核菌のVNTR型別を当センターで実施している。また、国内で分離される結核菌の7～8割を、高病原性が指摘されている北京型株が占めるとされていることから、県内における北京型株の検出状況についても調査を行っている。

今回は、2016年度に搬入された結核菌について、VNTR型別をはじめとした分子疫学調査の結果をまとめたので報告する。

## 材料と方法

## 1. 材料

医療機関等で結核菌と同定され、2016年4月から2017年3月までに当センターへ搬入された36株を用いて試験を実施した。患者情報は届出内容及び保健所調査情報に基づいた。クラスター解析には、2013年4月から2017年3月に当センターへ搬入されVNTR型別結果が得られた結核菌158株の結果を用いた。

## 2. 方法

## 1) 結核菌からのDNA抽出

結核菌をTE緩衝液に懸濁し、95℃で15分間加熱した後、凍結融解させ遠心分離した上清を抽出DNA液とした。

## 2) VNTR型別

国内標準法として提唱されているVNTR領域12箇所を対象としたJapan Anti-Tuberculosis Association (JATA) (12)-VNTR法<sup>2)</sup>を実施した。PCR条件は95℃で5分間加熱後、95℃30秒、60℃30秒、72℃90秒のサイクルを40回実施し、72℃で7分間加熱する方法とした。得られたPCR産物は、マイクロチップ電気泳動装置MultiNA (MCE-202; 島津製作所) とアガロースゲルによる電気泳動を実施し、測定値から各領域の反復数を算出した。全12領域の反復数が完全に一致した菌株群は、同一クラスターと判定した。

## 3) 北京型・非北京型の分類

Warrenら<sup>3)</sup>のプライマーを使用したPCRを実施して、北京型および非北京型を分類した。

## 結果

## 1. 検体

搬入された結核菌36株の患者年齢別及び性別菌株数を表1に、保健所別搬入菌株数を表2に示す。年齢を見ると、17株(47.2%)が70歳以上で、高齢者由来の菌株が多かった。搬入された菌株について、患者間の接触情報は無かった。

表1 患者年齢別及び性別菌株数

年齢階級	男	女	総数
0～9	0	0	0
10～19	0	0	0
20～29	2	1	3
30～39	1	1	2
40～49	4	2	6
50～59	0	1	1
60～69	5	2	7
70～79	4	0	4
80～	5	8	13
計	21	15	36

表2 保健所別搬入菌株数

保健所名	菌株数
奈良市	12
郡山	10
中和	12
吉野	2
内吉野	0
計	36

## 2. VNTR 型別

搬入された36株についてJATA(12)-VNTR法を実施し、各領域の反復数の算出を行った(表3)。2016年度までに搬入された菌株のクラスター形成率は39.9%で、形成したクラスター数は63株20組であった。

表3 JATA(12)-VNTR 分析結果

菌株番号	JATA(12)-VNTR											
	J01	J02	J03	J04	J05	J06	J07	J08	J09	J10	J11	J12
tb16001	4	3	4	3	5	3	7	4	5	7	8	3
tb16002	4	3	4	3	6	3	7	4	5	7	8	3
tb16003	4	3	4	3	5	1	7	4	4	7	8	3
tb16004	3	4	2	3	2	3	5	4	2	9	6	3
tb16005	4	3	3	3	3	2	7	3	5	7	8	4
tb16006	4	3	4	3	5	4	6	4	5	10	8	3
tb16007	2	3	1	3	4	2	5	4	4	12	4	3
tb16008	3	5	2	1	2	3	1	2	3	13	4	4
tb16009	5	3	3	3	6	3	8	4	5	7	8	5
tb16010	4	1	3	3	6	1	6	4	4	7	8	6
tb16011	2	2	2	4	3	2	4	4	3	5	5	3
tb16012	2	8	5	3	2	2	6	3	4	8	6	3
tb16013	4	3	8	3	3	3	7	4	5	7	7	4
tb16014	4	2	4	3	6	1	7	4	5	7	8	3
tb16015	4	3	4	3	5	3	7	4	5	7	8	3
tb16016	4	3	3	3	3	3	6	4	2	4	9	4
tb16017	2	3	4	3	6	3	7	4	5	7	8	3
tb16018	4	3	3	2	7	3	7	4	5	7	10	5
tb16019	4	3	4	3	6	3	7	4	5	7	4	3
tb16020	2	3	1	4	4	2	5	4	4	12	4	3
tb16021	4	3	4	4	6	3	6	5	5	6	9	3
tb16022	1	4	3	3	7	1	2	3	4	7	7	2
tb16023	4	3	3	3	3	3	7	4	5	7	10	4
tb16024	4	3	3	3	3	3	5	4	3	7	7	4
tb16025	2	3	1	3	4	2	5	4	3	11	5	3
tb16026	4	5	2	3	4	5	4	4	3	10	7	3
tb16027	2	3	1	3	4	2	5	4	3	11	5	3
tb16028	2	3	1	3	3	2	4	4	3	10	5	3
tb16029	4	1	3	2	7	4	2	4	5	7	8	5
tb16030	3	3	1	3	3	2	4	4	3	12	5	3
tb16031	2	5	2	1	2	3	1	2	3	12	8	2
tb16032	4	3	4	3	5	3	7	4	5	7	8	3
tb16033	4	1	3	2	7	4	7	4	5	7	8	5
tb16034	3	3	3	4	7	3	7	5	5	7	2	5
tb16035	4	1	3	2	6	4	7	4	5	7	8	5
tb16036	4	3	3	3	3	3	6	4	2	4	8	4

..... クラスター形成株

## 3. 北京型・非北京型の分類

搬入された36株について北京型別を実施した。北京型は23株(63.9%)、非北京型は13株(36.1%)であった。

## 考 察

奈良県では2013年度から「結核菌分子疫学調査事業」を開始し、4年間で県内患者由来結核菌158株のJATA(12)-VNTR型別結果を得た。2016年度までのクラスター形成率は39.9%(63株/158株)で、2015年度までのクラスター形成率41.8%(51株/122株)より減少した。一般に、高齢者は過去の感染による再燃が多く、クラスターを形成しにくいということが知られている。70歳以上の高齢者由来株が占める割合を見ると、2015年度までは18.0%であるのに対し、2016年度を含めると24.7%と高くなっており、このことがクラスター形成率の減少に影響したと考えられた。

今回の結果を、2015年度までの51株19組のクラスター形成と比較すると、接触情報のないクラスターが新たに1組確認され、クラスター構成株数は12株増加した。新たに増えたクラスター構成株について、患者間の接触情報は無かった。疫学的関連性の低い菌株間の解析に有効とされる追加領域の分析について、今後解析を行う必要があると考えている。

北京型・非北京型の分類では、北京型株が63.9%で、全国より若干少ない傾向であった。県内北京型株の傾向を把握するため、継続して解析を進めていきたい。

今後も結核蔓延防止対策として感染源調査の科学的根拠となる分子疫学解析情報を提供するために、県内の結核菌VNTR型別データベースをさらに充実させ、奈良県の結核対策に寄与していきたい。

## 謝 辞

本報告にあたり、奈良県並びに奈良市結核菌分子疫学調査事業に関して、菌株の分離提供と収集及び疫学情報の提供にご尽力を頂いている関係医療機関と検査機関、そして県内保健所感染症担当者の皆様に深謝いたします。

## 文 献

- 1) 岩本朋忠：結核，84，755-759(2009)
- 2) 前田伸司，村瀬良朗，御手洗聡，他：結核，83，673-678(2008)
- 3) R.M.Warren, T.C.Victor, E.M.Streicher, et al.: *Am.J.Respir.Crit.Care.Med.*, 169, 610-614(2004)

## 奈良県におけるライノウイルスの検出状況：2015～2016

千葉翔子・藤谷美沙子・杉本大地・稲田真知・中野 守・榮井 毅

An epidemic of Human rhinovirus in Nara Prefecture:2015 to 2016

Shoko CHIBA・Misako FUJITANI・Daichi SUGIMOTO・Machi INADA・Mamoru NAKANO  
and Takesi SAKAI

### 緒言

ライノウイルス(Human rhinovirus, 以下 HRV)は、ピコルナウイルス科エンテロウイルス属に分類され、現在 100 種類以上の血清型が存在する。これらは HRV-A, HRV-B 及び HRV-C の3つの種に分類される。

HRV は、普通感冒(風邪)の主要な原因ウイルスであり、急性上気道炎を引き起こすが、一般的には軽症であると言われている。一方、乳幼児・小児では、喘鳴や喘息増悪の6割から7割に HRV が関与するとされており、看過できないウイルスである<sup>1)</sup>。

今回、2015年にエンテロウイルス検出プライマーを、VP1 領域から、VP4/VP2 領域を増幅するプライマー<sup>2,3)</sup>に変更したことにより、同時に検出可能となった HRV について、2015年および2016年の検出状況を報告する。

### 材料と方法

#### 1. 調査対象

2015年1月から2016年12月の間に奈良県感染症発生動向調査事業により病原体定点医療機関から提供された検体のうち、診断名からエンテロウイルス感染症が疑われる検体(374例494検体(便276, 咽頭122, 髄液48, 血清28, 尿20)), および診断名に関わらずエンテロウイルス検査未実施かつ陰性と判定した咽頭拭い液の検体(102例102検体)の計476例596検体(2015年201例262検体, 2016年275例334検体)を調査の対象とした。患者情報は病原体検査票の記載内容から収集した。

#### 2. 検査方法

QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) を用い添付のプロトコルに従ってウイルス RNA を抽出し、VP4/VP2 領域を標的とした semi nested RT-PCR<sup>2,3)</sup> を実施した。アガロースゲル電気泳動後、目的サイズのバンド(エンテロウイルス:約650bp, エンテロウイルス D68:約610bp, HRV:約530bp)を切り出

して精製し、ダイレクトシーケンスを実施した。得られた塩基配列は、BLASTによる相同性解析を実施し、種を決定した。

### 結果

#### 1. HRV 検出状況

調査対象検体 476 例 596 検体中 104 例 112 検体(2015年42検体, 2016年70検体)から HRV を検出した。

採取月別検出状況を図1に示した。2015年は12月が13検体と最多で、次いで11月が9検体、6月が8検体であった。2016年は、5月が13検体と最多で、次いで4月が9検体、12月が8検体であった。

患者年齢別検出状況を図2に示した。1歳児からの検出が39検体で最多であり、次いで0歳児からは33検体、2歳児からは21検体の検出があった。15歳以上の検出も2検体みられた。

HRV を検出した112検体のうち15検体からは、以下のウイルスも検出された。エコーウイルス9型が1株、18型が1株、コクサッキーウイルス(以下、CV) A群4型が2株、6型が2株、9型が1株、10型が1株、16型が1株、CVB群4型が1株、5型が1株、パラインフルエンザ1型が2株、アデノウイルス2型が1株、パルボウイルス B19 が1株検出された。

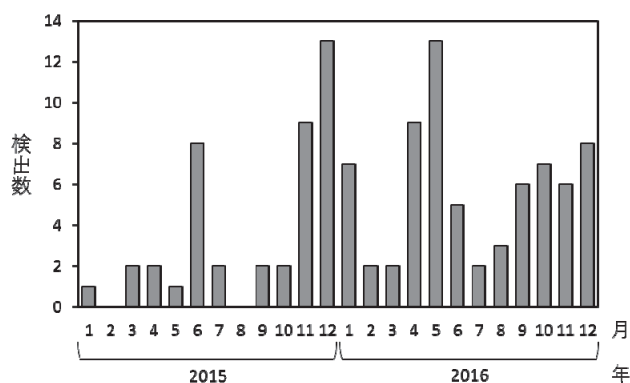


図1 採取月別検出状況

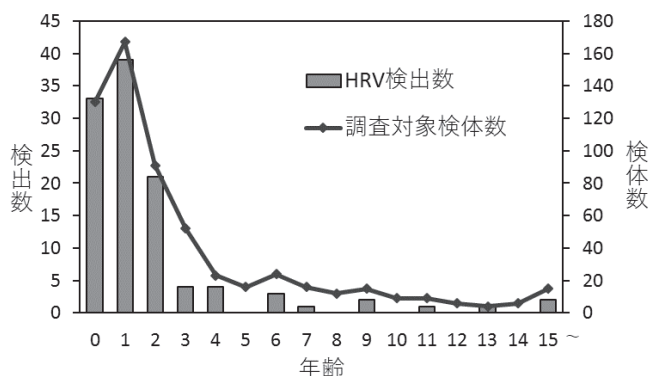


図2 年齢別検出状況

## 2. 患者情報

HRVを検出した患者の主な症状は、上気道炎、肺炎を含む下気道炎、発疹症および胃腸炎であり、中には喘鳴・喘息の症状もあった。上気道炎は34例、下気道炎や喘鳴・喘息は40例みられた。また、脳神経症状（髄膜炎、脳炎・脳症）といった重症例からの検出は6例みられた（表1）。患者の7割以上に発熱がみられ、40℃以上の患者も11例あった。

表1 脳神経症状患者からの検出状況

	検出ウイルス	検体	性別	発病年月	年齢	症状
1	HRV-B	咽頭	男	2015.5	6歳	発疹症、髄膜炎
2	HRV-A	咽頭	男	2016.5	0歳 2ヶ月	無菌性髄膜炎
	HRV-A	髄液				
3	HRV-A CVA4	咽頭	女	2016.7	2歳	急性脳症
	HRV-A CVA4	便				
4	HRV-C	吸引痰	男	2016.9	1歳	無菌性髄膜炎、脳症
	ヒトパレ コ3型	便				
5	HRV-A	咽頭	女	2016.11	1歳	脳炎、脳症
	HRV-A	便				
	HRV-C	血清				
6	HRV-B	咽頭	男	2016.9	13歳	無菌性髄膜炎

## 3. 遺伝子解析

BLASTによる解析から、HRVの種を決定し、結果を表2に示した。

なお、HRVとウイルス学的性状が類似し、呼吸器疾患を引き起こす<sup>4)</sup>と言われるエンテロウイルスD68は、2016年10月に1株のみ検出しただけであった。

表2 HRV検出状況

	HRV-A	HRV-B	HRV-C
2015年	26	4	12
2016年	39	5	26
計	65	9	38

## 考察

今回の調査で、HRVは通年で検出がみられるが、初夏と初冬にピークがみられることがわかった。この結果は、全国の検出状況とほぼ同程度であった（IASR グラフ ウイルスその他 2016, <http://www.niid.go.jp/niid/images/iasr/arc/ot/2016/data2016.97j.pdf>）。

検出数はHRV-Aが最も多く、HRV-Bが最も少なかったが、種別における季節的な検出状況や、臨床症状等の疫学的な明らかな違いは認められなかった。

2歳児以下での検出が多く、40℃以上の発熱の9割は2歳以下であった。乳幼児においては、単なる上気道炎ではなく、下気道炎や喘鳴・喘息まで進行していることがわかった。

他のウイルスとの重複感染については、ほとんどが手足口病等の発疹症の臨床診断名であり、他に検出したウイルスによるものと思われた。また、重複感染による症状の増悪等の関連性は明らかにできなかった。

今回、脳神経症状患者の髄液や血清からもHRVの検出がみられた。検出したHRVが脳神経症状を引き起こした直接的な原因であるかは明らかにはできなかったが、重症例からの検出もあるため、今後も引き続き注意深い監視が必要であると考えられる。

## 謝辞

検体提供にご協力いただいた奈良県感染症発生動向調査定点医療機関の先生方に深謝いたします。

## 文献

- 1) 国立感染症研究所: ライノウイルス検査マニュアル (2009)
- 2) H. Ishiko, Y. Shimada, M. Yonaha, *et al.*: *J. Infect. Dis.*, **185**, 744-754 (2002)
- 3) H. A. Rotbart: *J. Clin. Microbiol.*, **28**, 438-442 (1990)
- 4) M. S. Oberste, K. Maher, D. Schnurr, *et al.*: *J. Gen. Virol.*, **85**, 2577-2584 (2004)

## A 群ロタウイルスの流行状況（2015/16 シーズン）

稲田眞知・杉本大地・藤谷美沙子・千葉翔子・中野 守・榮井 毅

Clinical and virological surveillance of Group A Rotavirus in Nara prefecture. : 2015/16

Machi INADA・Daichi SUGIMOTO・Misako FUJITANI・Shoko CHIBA・Mamoru NAKANO  
and Takeshi SAKAI

### 緒言

A 群ロタウイルスは (RVA), 11 分節からなる 2 本鎖 RNA ウイルスで, なかでも中和抗原を有するとされる外殻蛋白の VP7 領域 (外殻糖蛋白, G 型), VP4 領域 (スパイク蛋白, P 型) の遺伝子型で分類されることが多い. 主要な型は, 5 つ (G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8], G9P[8]) とされる. 主に乳幼児が罹患する感染性胃腸炎の原因ウイルスであり, ほとんどのヒトが概ね 5 歳までに一度は感染するとされる. 一度の感染では防御免疫が不十分なため, 複数回感染・発症し, 2 回目以降は重症度が低下するなど, 感染を繰り返すたびに軽症化する傾向がある (病原体検出マニュアル「感染性胃腸炎」ロタウイルスの概説 <http://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/Rota2014.pdf>). 2011 年 11 月に 1 価 (G1P[8]) ワクチンが, 2012 年 7 月に 5 価 (G1, G2, G3, G4, P[8]) ワクチンが販売開始され, 流行する遺伝子型分布への影響を監視するためには, より詳細な分子疫学調査が必要とされている.

奈良県では, 1999 年から継続して, RVA の G 型 P 型について調査している<sup>2,3)</sup>. 今回は, 2015/16 シーズンに流行した遺伝子型 G2P[4]について, 医療機関から聞き取った流行状況・臨床像について報告する.

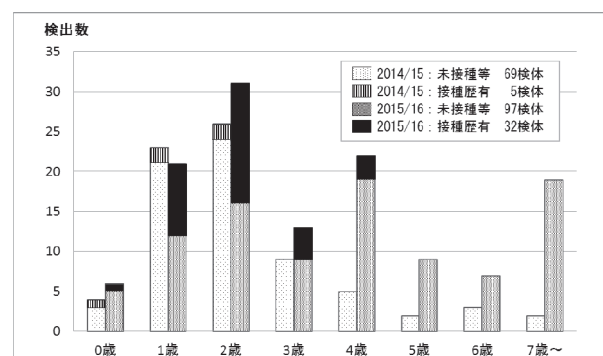
### 調査方法

奈良県感染症発生行動調査において, 2015/16 シーズン (2015 年 9 月~2016 年 8 月) に RVA を検出した 129 例について, 国立感染症研究所病原体検出マニュアル及び Gentsch らの報告に準じて, マルチプレックス RT-PCR 法により, G 型別及び P 型別を実施した. 一部の検体については, パーシャルシーケンスにより遺伝子型を決定した. また, 患者の年齢, 症状, ワクチン接種歴, 流行状況などについては, 病原体検査票からの収集及び医療機関から聞き取りを行った.

### 結果

検出した RVA の型別は, G2P[4]が 123 例 (95%), G9P[8]が 3 例 (2%), G1P[8], G3P[8]及び G3P[9]が 1 例ずつ (1%ずつ) であった. これまでの主流株である G1P[8], G3P[8]は 1 例ずつで, G2P[4]が 1999 年の調査開始以降初めて主流株となった. また, 検出時期は 11 月から 6 月で, 通常の見出時期 (2 月~5 月) よりも早い時期から検出された. ただし, 全県的に検出が始まったのは 1 月末からで, それまでは県中部に限定した検出であった.

検出した患者の年齢は, 0 歳 6 例, 1 歳 21 例, 2 歳 31 例, 3 歳 13 例, 4 歳 22 例, 5 歳 10 例, 6 歳 7 例, 7 歳 7 例, 8 歳 5 例, 9 歳以上 7 例で, 患者年齢の平均は 3.6 歳, 中央値は 3 歳であった. なお G1 は 4 歳, G3 は 6 歳, 7 歳, G9 は 1 歳, 4 歳, 5 歳, から検出している. 検出した者のうちワクチン接種歴 (4 歳以下) があつたのは 32 例 (1 価 30 例, 5 価 1 例, 不明 1 例) で, 全て G2P[4]を検出した (図).



患者の症状は, 特に下痢・嘔吐からみると, 下痢・嘔吐がないもの 4 名 (ワクチン接種有り 1 名, 接種無し 3 名), 下痢・嘔吐 1 回若しくは回数記載無し 69 名 (接種有り 22 名, 接種無し 47 名), 下痢・嘔吐 2 回以上 56 名 (接種有り 9 名, 接種無し 47 名) であった.

また、定点医療機関に流行状況及び使用ワクチンについて2月初めに聞き取り調査したところ、中部の一部で流行が先行しており、流行が先行している医療機関では1価ワクチンを使用していた。

また、ある定点医療機関の情報では、患者の症状は、ワクチン接種児では80%以上が軽症、点滴加療を要する重症例は無く、家族内に感染が広がった事例が29例あったが、このうちワクチン接種児から広がったと考えられるのは2例(7%)と、ワクチン非接種児からと比べると少ないとのことであった。

### 考 察

2011年のワクチン販売開始以降、2013/14シーズンには搬入される検体がほとんど無く患者数が激減していたが、2014/15シーズンにはDS-1類似G1P[8]の流行があり<sup>2)</sup>、2015/16シーズンにはG2P[4]が流行した。RVAは、11分節の各遺伝子型により、Wa遺伝子群、DS-1遺伝子群、AU-1遺伝子群に分類される。Wa遺伝子群はG1P[8]、G3P[8]、G4P[8]、G9P[8]、G1P[8]、DS-1遺伝子群はG2P[4]、AU-1遺伝子群は、G3P[9]、G12P[9]が分類されている。これまでの奈良県での流行は、ほとんどがWa遺伝子群によるものであったが、2014/15シーズン以降DS-1遺伝子群による流行となっている事がわかった。また、2015/16シーズンは、G2P[4]による流行であったため、既報<sup>5)</sup>のように、3歳以上の患者割合の増加がみられた。

患者の症状では、複数回以上の下痢・嘔吐を呈した者のうち、ワクチン接種歴のある者の割合は低く、家族内感染も少ないことから、ワクチンには入院に至るような重症化予防等の一定の効果はみられたと考える。

海外でも、ワクチン導入後、G2の一時的な増加が報告されている。また、米国では、5価ワクチン使用開始後G3P[8]の増加が認められている<sup>4)</sup>。ワクチンの使用と主流株との関連は明かではないが、今後も継続した調査は必要と考えている。

### 謝 辞

奈良県感染症発生動向調査にご協力いただいた定点医療機関の先生方に深謝いたします。

### 文 献

- 1) 小林宣道：病原微生物検出情報，35, 66-67 (2014)
- 2) 杉本大地，中野守，稲田真知，他：臨床とウイルス，44, 121-126 (2016)
- 3) 米田正樹，北堀吉映：感染症学雑誌，89, 609-612 (2015)

- 4) 小林宣道：病原微生物検出情報，32, 64-66 (2011)
- 5) 北堀吉映，井上ゆみ子，米田正樹，他：臨床とウイルス，39, 161-168 (2011)

## 奈良県におけるヒトパレコウイルスの検出状況 2016年

稲田眞知・藤谷美沙子・杉本大地・千葉翔子・中野 守・榮井 毅

### Detection of Human Parechovirus in Nara Prefecture

Machi INADA・Misako FUJITANI・Daichi SUGIMOTO・Shoko CHIBA・Mamoru NAKANO  
and Takeshi SAKAI

#### 緒言

全ヒトパレコウイルス (Human parechovirus : HPeV) は、主に小児の胃腸炎や呼吸器疾患患者から検出されるウイルスで、ピコルナウイルス科パレコウイルス属に分類される<sup>1)</sup>。以前は同科エンテロウイルス属のエコーウイルス 22 型・23 型とされていたが、ウイルス学的特徴から 1999 年にパレコウイルス属として独立し、それぞれ HPeV1 型・2 型と命名された。その後、2004 年に 3 型が愛知県から、2007 年には 6 型が新潟県から新たな遺伝子型として報告されるなど、今では 17 種類の遺伝子型に分類されている。我が国では、1 型と 3 型の感染例が多く報告されているが、特に数年おきに検出がある 3 型は、乳幼児、特に新生児では敗血症や脳炎を引き起こすことがあり、軽視できないウイルスである。

2015 年までの検出状況については、別途報告<sup>2)</sup>した。2016 年の奈良県でのヒトパレコウイルスの検出状況を報告する。

#### 対象及び方法

2016 年 1 月～12 月に奈良県感染症発生動向調査事業により病原体定点等から提供された検体のうち、臨床診断名や臨床症状から HPeV 感染が疑われるもの

(エンテロウイルス陰性の脳脊髄膜炎症状、重症呼吸器感染症症状、発疹、感染性胃腸炎等のあるもの) を対象とした。検体は、98 例 136 検体 (咽頭ぬぐい液等呼吸器系検体 72 検体、便等腸管系検体 28 検体、髄液 17 検体、血液他 12 検体、その他尿等 7 検体) で、患者年齢は、生後半年まで 14 例、生後半年から 1 歳まで 4 例、1 歳 32 例、2 歳 11 例、3 歳以上 87 歳まで 35 例、不明 2 例であった。これらについて既報<sup>2)</sup>に従い検査を実施した。

#### 結果

供試した 98 例中 10 例 (10.2%) から HPeV を検出した (表)。遺伝子型別では、1 型 3 例、3 型 6 例、4 型 1 例であった。複数種の検体が提供された事例では、一部の検体からのみ検出したものが 2 例 (No.8 は咽頭、吸引痰、血清、尿は陰性、No.9 は尿は陰性) あった。検出時期は、1 型は 3 月から 7 月、3 型は 7 月から 10 月、4 型は 8 月に検出があった。患者年齢は、生後半年までが 4 例 (検出率 29%)、生後半年から 1 歳までが 1 例 (同 25%)、1 歳が 3 例 (同 9%)、2 歳が 1 例 (同 9%)、34 歳が 1 例 (同 3%) と検出率は生後半年までが最も高かった。性差は、男：女=1:1 であった。地域別では、3 型の検出は北部が最も早かった。

表 ヒトパレコウイルスの検出状況

No.	発病	検出ウイルス	性別	採取時年齢	検体種別	臨床診断名	症状	採取地域
1	3/19	HPeV-1	女	1 歳 1 ヶ月	咽頭・便	発疹症	発疹 (紅疹)	中部
2	7/13	HPeV-1	男	1 歳 1 ヶ月	咽頭	発疹症	発疹	中部
3	7/14	HPeV-1	女	0 歳 7 ヶ月	便	感染性胃腸炎	胃腸炎 (下痢・10 回/日・泥状・クリーム色)	中部
4	7/23	HPeV-3	女	0 歳 0 ヶ月	髄液・血清	パレコウイルス疑い	発熱、発疹 (四肢メインに小発疹、特に手掌、足底)、胃腸炎 (下痢 4 回/日・水様性～泥状。黄土色)、けいれん	北部
5	7/27	HPeV-3	女	0 歳 5 ヶ月	咽頭	ウイルス性発疹症	全身の点状紅斑 (全身に細かい点状の紅斑あり、BCG 翌日からの発疹)、発熱・感冒症状はない	北部
6	8/5	HPeV-3	男	34 歳 5 ヶ月	咽頭・便便	流行性筋痛症	発熱、頭痛、関節痛 (筋肉痛)、下痢、呼吸困難	北部
7	8/14	HPeV-4	女	2 歳 10 ヶ月	便	感染性胃腸炎	発熱、胃腸炎 (下痢・2 回/日・泥状・普通の色、嘔気、嘔吐)	中部
8	9/10	HPeV-3	男	1 歳 0 ヶ月	便	無菌性髄膜炎・脳症	発熱、熱性けいれん、胃腸炎 (嘔吐)、髄膜炎 (けいれん重積)、髄液細胞数上昇	中部
9	9/18	HPeV-3	男	0 歳 0 ヶ月	便・髄液	高サイトカイン血症	発熱、発疹	北部
10	10/10	HPeV-3	男	0 歳 3 ヶ月	咽頭	発疹症	発熱、発疹 (紅斑)	中部

診断名は、1型を検出した3例は、感染性胃腸炎や発疹症で、3型は1型の診断名に加えて、無菌性髄膜炎・脳症や高サイトカイン血症、流行性筋痛症などであった。4型の診断名は感染性胃腸炎であった。症状は遺伝子型にかかわらず、発疹（紅疹）の記載が多かった。

また、3型のウイルス遺伝子の系統樹解析では、2016年の検出株は全て、標準株 Can82853-01 (AJ889918) のクラスターに分類された（図）。

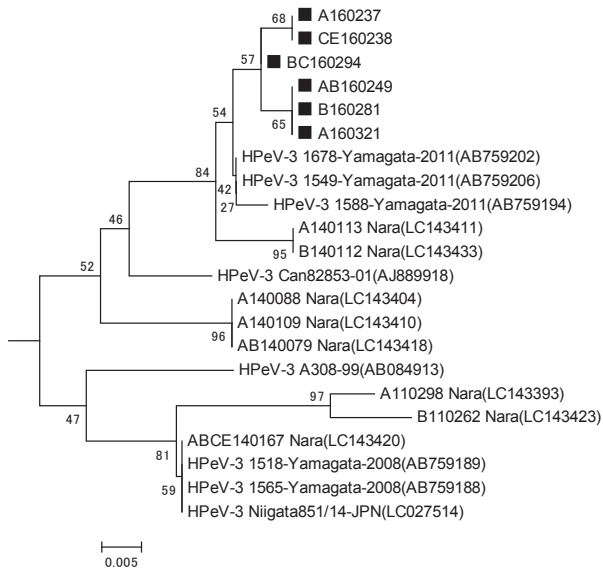


図 HPeV3 型の VP1-VP3 領域(256bp)の系統樹

### まとめ及び考察

2016年は、2014年以來の3型の検出年であった。全国でも5月頃から検出が増加しており（IASR 速報グラフ ウイルスその他 <http://www.niid.go.jp/niid/ja/iasr/510-surveillance/iasr/graphs/2293-iasrgv4.html>），全国的に2016年は3型の検出年となった。これまで奈良県では、2011年、2014年に検出があり、2～3年おきに流行する<sup>1)</sup>とされる流行状況と一致していた。

また、2016年は医療機関からの HPeV 感染疑い患者検体の搬入も多くあった。病原体定点医療機関での対象疾患は、11疾患あるが、HPeV は多様な症状を呈するため、11疾患の診断名から流行状況を把握することは困難である。中には、成人男性の流行性筋痛症の検体も搬入があった。担当医に聞き取りをしたところ、エンテロウイルスが原因とされるボルンホルム病とは筋痛部位が異なり、四肢を中心とした筋痛症とのことであった。また、この成人男性については、子ども等からの家族内感染の可能性なども聞き取りを行っていたが、特に見られないとのことであった。

また、急性脳症を呈していた患者（No. 8）は、他

に搬入された呼吸器検体・血清・尿からの検出はなかったが、呼吸器検体からはライノウイルス A も検出した。

3型のウイルス系統樹解析では、2016年の検出株は全て同じクラスターに分類された。3つのクラスターに分かれた2014年に比較すると、流行は小さいものであったと考えられる。

HPeV は、特に3型の重症度から近年注目されるウイルスであるが、臨床症状だけではエンテロウイルス感染との鑑別が困難なため、確定診断には遺伝子診断が必須である。特に乳幼児では敗血症や中枢神経系症状など重症例の報告もあることから、県内の流行状況の把握は、重要と思われる。今後の検出情報などに注視し、積極的な情報提供により症例集約・検査の実施など検討していきたい。

### 謝辞

検体の提供にご協力いただいた奈良県感染症発生動向調査病原体定点の先生方に深謝いたします。

### 文献

- 1) 相澤悠太, 齋藤昭彦: ウイルス 65, 17-26 (2015)
- 2) 稲田真知, 藤谷美沙子, 杉本大地, 他: 臨床とウイルス, 44, 277-284 (2017)



## 流行性耳下腺炎の流行とムンプスウイルスの検出状況について

藤谷美沙子・稲田眞知・杉本大地・千葉翔子・中野 守・榮井 毅

### Epidemic Parotitis and Detection Status of Mumps Virus

Misako FUJITANI・Machi INADA・Daichi SUGIMOTO・Shoko CHIBA・Mamoru NAKANO  
and Takeshi SAKAI

#### 緒言

流行性耳下腺炎はムンプスウイルスが原因の感染症であり、耳下腺のびまん性腫脹、疼痛、発熱を主症状とし、2～7歳の小児に好発する。不顕性感染が3分の1程度あり、患者は発症数日前からウイルス排出が始まっているため保育園、幼稚園、小学校等で集団発生を起こすことがある。一般に予後は良好であるが、無菌性髄膜炎をはじめ、感音性難聴、脳炎、精巣炎、卵巣炎など様々な合併症を引き起こす。有効な予防法はワクチン接種であり、1989年に麻しん、流行性耳下腺炎、風しん混合（MMR）ワクチンの接種が可能となったことから接種率が増加し、患者数は減少した。しかし、ワクチン株による無菌性髄膜炎の発生が社会問題となったことから、1993年にMMRワクチンの定期接種は中止された。現在は単味ワクチンが任意接種となっているが、4～5年間隔で大きな流行を繰り返している。今年（2016年）は2009～2010年以来の流行となっており、発生状況及び検出したムンプスウイルスの遺伝子学的解析について報告する。

また今回の流行を機に、国立感染症研究所が実施するAMED感染症実用化研究事業（新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業）「ワクチンによって予防可能な疾患のサーベイランス強化と新規ワクチンの創出等に関する研究」の分担研究「ムンプスウイルスの流行解析ならびに病原体発現の分子機構」の研究協力者として稲田総括研究員、藤谷が参加している。

#### 対象及び方法

##### 1.検査対象

2016年1月から12月の間に感染症発生動向調査事業で定点医療機関から得られた検体のうち、ムンプスウイルスが原因と疑われる32例（診断名が流行性耳下腺炎、髄膜炎等）を調査対象とした。

#### 2.検査方法

咽頭ぬぐい液または髄液からQIAamp Viral RNA Mini Kit（QIAGEN）を用いて、添付のプロトコールに従ってRNAを抽出・精製した。その後、プライマーSH-F（5'-TCAAGTAGTGTGCGATGATCTC-3'）/SH-R（5'-AGGTGGCATTGTCTGACATTG-3'）を用いたRT-PCRを実施した。得られた遺伝子増幅産物についてダイレクトシーケンスを行い、塩基配列決定後、近隣結合（NJ）法により標準株を用いた系統樹解析を実施した。

#### 結果

##### 1.流行性耳下腺炎の流行について

流行性耳下腺炎は、4～5年間隔で流行を繰り返している。奈良県では過去に2001～2002年、2005～2006年、2009～2010年に流行がみられた。2016年は、第8週に定点当たり報告数が2.09となり、全国で5番目に報告数の多い状況となった。また、第8週の近府県の報告はいずれも1.0未満であり、奈良県のみが高い状況であった。その後、13週に2.74となり、全国で2番目に高い値となった。それ以降、例年より高い水準で増減を繰り返した。

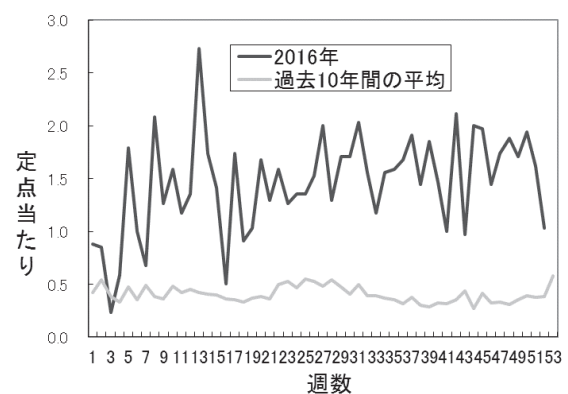


図1 奈良県における流行性耳下腺炎の週別報告数（2016年と過去10年平均との比較）

## 2. ムンプスウイルスの検出及び遺伝子型

検査を実施した 32 例のうち、ムンプスウイルスを検出したものは 10 例あった。10 例の概要を表 1 に示した。発症月に偏りはなく、性差もなかった。年齢は 4 歳 1 例、5 歳 3 例、6 歳 2 例、7 歳 1 例、8 歳 2 例、10 歳 1 例であった。ワクチン接種歴は、1 例のみ接種歴を確認できたが、その他に確認できたものはなかった。

表 1 ムンプスウイルスを検出した検体の概要

No	発症月	性別	発症年齢	ワクチン接種歴
1	2016.5	男	5	不明
2	2016.6	男	8	無
3	2016.6	女	8	不明
4	2016.7	男	4	無
5	2016.5	男	10	不明
6	2016.8	男	5	無
7	2016.9	女	7	無
8	2016.1	女	6	不明
9	2016.11	男	5	無
10	2016.12	女	6	有 (2016.11 接種)

ムンプスウイルスを検出した 10 例について系統樹解析を行った結果 (図 2)、8 例が G 型、その他 H 型 1 例、B 型 1 例であった。B 型を検出したものは、鳥居株と塩基配列が一致した。

### 考 察

2016 年は、奈良県だけでなく全国でも流行性耳下腺炎の報告の多い年であった。発症年齢は、全国的には 6 歳未満からの報告が減少、10 歳以上からの報告が増加傾向とされている。今回の調査期間に、奈良県で 10 歳以上の患者は 1 例であったが、今後増加する可能性があるため動向に注意が必要である。

ムンプスウイルスは、A~N の 12 群 (E, M は欠番) の遺伝子群があり、流行型は年代ごとに変化している。1980 年代は B 型、1990 年代は J 型と B 型、1999 年は G 型と L 型、2000 年以降は G 型が主流となっている。ムンプスウイルスを検出した 10 例のうち 8 例は G 型であったことから、奈良県での流行遺伝子型は、これまで同様に G 型が主流であった。また、B 型が 1 例検出された。国内産のワクチンは、すべて B 型であり、鳥居株及び星野株が使用されている。この B 型を検出した患者は、発症の 20 日前にワクチン接種を行っていた。ワクチン接種を行うことにより、無菌性髄膜炎を発症することがあるが、自然感染による無菌性髄膜炎の発症より発症率は極めて低い。また、ワクチン接種は唯一の予防法であり、接種することで発症及び重篤な合併症を予防する目的がある。流行性耳下腺

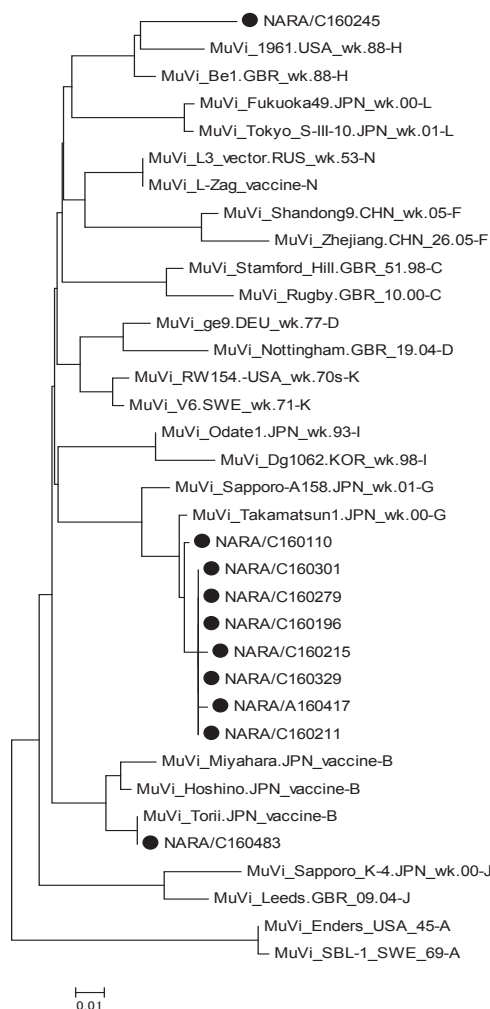


図 2 系統樹解析

炎は、予後が良好な疾患ではあるが、髄膜炎、感音性難聴などを引き起こすことがある。特に感音性難聴は、予後が悪く、発症頻度は高いと言われている<sup>1)</sup>。近年のワクチン接種率は、30~40%程度であり<sup>2)</sup>、高いとはいえない状況である。発症率の低下及び合併症の予防のためにも、ワクチンの接種率を高めることは非常に重要であると考えられる。

今後も流行性耳下腺炎の動向に注視し、迅速な状況把握、情報提供に努めたい。

### 文 献

- 1) 厚生労働省健康局健康課予防接種室：病原微生物検出情報，37, 201-202 (2016)
- 2) 佐藤弘，多屋馨子：病原微生物検出情報，37, 198-199 (2016)

## 第3章 調査研究・報告

### 第3節 他誌掲載論文の要旨



## 複数回にわたり感染源と疑われた日帰り入浴施設の レジオネラ属菌検査と衛生指導

吉田孝子<sup>1</sup>・橋田みさを<sup>1</sup>・堀 重俊<sup>1</sup>・大前壽子<sup>1</sup>・松岡久嗣<sup>2</sup>・上山江美子<sup>2</sup>・佐羽えみ<sup>2</sup>・田中 尚<sup>2</sup>

<sup>1</sup>奈良県保健研究センター・<sup>2</sup>奈良県中和保健所

病原微生物検出情報 (IASR), 37, 206-208 (2016)

2012年4月、2013年6月、2014年11月の3回にわたり、同一施設の利用者からレジオネラ症患者が発生した事例があった。当該施設は、原因施設として特定されなかったが、各々の患者発生時の浴槽水検査でレジオネラ属菌が検出された。そこで、当該施設の配管洗浄の効果を確認するため、洗浄直後の配管等の拭き取り検査を行ったところ、再度レジオネラ属菌が検出された。さらに、患者発生時と配管洗浄直後に検出された計5株についてパルスフィールド・ゲル電気泳動(PFGE)を行ったところ、4株が一致し、2012年より同一のレジオネラ属菌による汚染が継続していることが示唆された。そこで、配管洗浄に用いていた次亜塩素酸ナトリウムをアルカリ性の泉質による影響が少ない二酸化塩素に変更し、配管洗浄を実施したところレジオネラ属菌不検出になった。今後も県内保健所と連携し、公衆衛生に寄与する科学的データの提供に努めたい。

## 奈良県の2010/11-2014/15シーズンにおける DS-1類似G1P[8]ロタウイルスの疫学的研究

杉本大地・中野 守・稲田眞知・米田正樹・藤谷美沙子・北堀吉映

臨床とウイルス, 44, 121-126 (2016)

ロタウイルスDS-1類似G1P[8]はわが国で発見され、各地で類似株が検出されているリアソータントによる変異株である。本研究では、奈良県におけるDS-1類似G1P[8]の流行状況の把握を目的として2010年から2015年の発生動向を調査し、更に検出ウイルスの遺伝子解析を行った。DS-1類似G1P[8]を2012年3月に初めて確認し、以降G1P[8]の約50%程度に変異株が混在し、断続的に流行していることを確認した。DS-1類似G1P[8]においては、6歳以上の患者が10%とG1P[8]と比べ高い年齢層の患者が含まれていた。ウイルスのVP6遺伝子解析からは、これまでに登録されている株と比較しアミノ酸配列で100%一致したものの、コドン324と344に二種類の異なる配列(324 CTG, 344 GCA : 324 TTG, 344 GCG)を有する株が混在して流行していたことが判明した。

# Epidemiological Characteristics of Sapovirus and Human Astrovirus Detected among Children in Nara Prefecture, Japan, during the 2009/2010–2014/2015 Seasons

Masaki Yoneda, Mamoru Nakano, Daichi Sugimoto, Machi Inada, Misako Fujitani,  
and Yoshiteru Kitahori

Jpn. J. Infect. Dis., 70, 87-91, (2017)

The current study elucidated the epidemiological characteristics of sapovirus (SaV) and human astrovirus (HAstV) associated with gastroenteritis among children in regional populations of Nara Prefecture, Japan, during the 2009/2010–2014/2015 seasons. The SaV detection rate was 7.5% (71/948) according to reverse transcription-polymerase chain reaction. A high SaV detection rate of 13.5% was observed among children 4 years of age. The highest SaV detection rate was observed in June (19.2%), followed by July (11.1%). The detected SaV included 7 genotypes: GI.1, GI.2, GII.3, GII.1, GI.3, GII.2, and GV, in order of decreasing prevalence. In comparison, the HAstV detection rate was 4.2% (40/948). The HAstV detection rate among children 4 years of age was 12.2%. The HAstV detection rate was highest in July (13.9%), followed by May (10.5%) and August (6.7%). The detected HAstVs included genotypes 1, 4, 6, and 8. The most prevalent genotype was 1, followed by 4 and 8. This report provides an epidemiological overview of SaV and HAstV infection in Nara Prefecture, Japan.

## 奈良県におけるヒトパレコウイルスの検出状況

稲田真知・藤谷美沙子・杉本大地・米田正樹・中野 守・北堀吉映

臨床とウイルス, 44, 277-284 (2017)

奈良県におけるヒトパレコウイルスの流行状況を把握するため、特に臨床症状から注目される3型を中心に調査を実施した。2011年、2013年、2014年の検索期間において、777症例から採取された咽頭ぬぐい液、糞便など901検体のうち、51例60検体(7%)からヒトパレコウイルスが検出された。遺伝子型別では、1型24例(47%)、3型23例(45%)及び6型4例(8%)であった。検出時期は、1型は夏から初冬に検出され、3型は初夏をピークとする季節性が見られた。また臨床診断名は、1型は感染性胃腸炎、3型は発疹性疾患、6型は気管支炎などが主で、遺伝子型により臨床症状が異なった。特に3型は2014年に大きく流行し、新生児で新生児無呼吸症候群を、成人男性で流行性筋痛症を呈している症例もあった。

## 第3章 調査研究・報告

### 第4節 報告書の要旨





## 検査機関の信頼性確保に関する研究

渡辺卓穂\*・梶村計志\*\*・伴埜行則\*\*\*・大久保祥嗣\*\*\*\*・先山孝則\*\*\*\*\*・山下浩一・  
田畑佳世\*\*\*\*\*・高井靖智\*\*\*\*\*

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）平成 28 年度分担研究報告書

近畿地区の地方衛生研究所 7 機関による共同研究を行い、LC/MS/MS を用いた動物用医薬品の残留分析時におけるマトリックス効果について、原因の解明および制御法の検証を行った。鶏卵および牛乳を試料とし、大阪府が調製した共通マトリックス溶液と、各機関の検査標準作業書に基づいて調製した独自マトリックス溶液でそれぞれ検量線を作成し、その傾きを溶媒検量線と比較した。その結果、共通マトリックス溶液を用いた分析では、機関ごとにイオン化抑制やイオン化促進等、さまざまなマトリックス効果が観察され、動物用医薬品分析時のマトリックス効果が分析条件に依存することが示唆された。また、独自マトリックス溶液の分析では、マトリックス効果が減少した機関と増大した機関が見られ、減少の要因として前処理時の脱水剤の追加が、増大の要因として最終液中の食品試料濃度の高さが考えられた。

\*一般財団法人食品薬品安全センター、\*\*大阪府立公衆衛生研究所、\*\*\*京都市衛生環境研究所、\*\*\*\*神戸市環境保健研究所、\*\*\*\*\*大阪市立環境科学研究所、\*\*\*\*\*堺市衛生研究所、\*\*\*\*\*和歌山県環境衛生研究センター

## 国産ワインにおけるフモニシン汚染発生原因菌の分類・同定と汚染機構の解明

中川博之\*・橋本ルイコ\*\*・陰地義樹・北岡洋平

日本食品化学研究振興財団第 22 回（平成 27 年度）研究成果報告書

国内ワイナリーより分離した *Fusarium* 属カビについて、従来コメやムギから分離されている *Fusarium* 属標準菌株 (*Fusarium fujikuroi*(*F.fujikuroi*) 及び *Fusarium proliferatum*(*F.proliferatum*)) と遺伝子学的差異があるかを調べるために  $\beta$ -tubulin 配列を調べた。その結果、コメやムギ由来の *Fusarium* 属標準菌株とそれぞれ同じ遺伝子型に属しており、同種であると考えられた。これらの菌株のコメ培地培養時におけるフモニシン産生試験を行った。ワイナリーより分離した *F.fujikuroi* 16 株すべてでフモニシン B1(FB1)及びフモニシン B2(FB2)が産生した。

さらに、コメ培地にてフモニシン産生が顕著であった菌株についてブドウ果への接種試験を行い、ブドウ果を侵襲し、ブドウ果においてフモニシン産生を示すかについて検討を行った。健全粒(損傷のない粒)において、粒内部への侵入はほとんどなかった。ブドウ果を穿刺あるいは切断した損傷部に分生子を接種した粒では、接種後 1 日目で損傷部から菌の侵入が認められた。また、接種ブドウ果における FB1 産生性は、損傷の程度が大きいほど産生量が多い傾向が見られた。

\*国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 食品研究部門、\*\*千葉県衛生研究所

## 自然毒中毒事件における毒キノコの遺伝子解析による同定

岡山明子

公益財団法人 大同生命厚生事業団 平成 27 年度「地域保健福祉研究助成」報告集

自然毒による食中毒は 1 件あたりの患者数は少ないが死亡例の多いことが特徴である。中でもキノコ毒による死者は全自然毒中毒死者の 31.5% を占め、フグ毒に次ぐ。食中毒事件の残食は、キノコ採取から時間が経過しており、また調理済みであることが多く、図鑑等で鑑別できるようなキノコ本来の形態を呈していない。そこで近年充実しつつある担子菌類 DNA データベースを利用した遺伝子解析によるキノコの同定を実施することにした。食中毒事件では迅速な結果報告を求められることから、特殊な試薬や装置を用いることなく遺伝子を抽出し増幅する方法について種々検討した。その結果、キノコからの遺伝子抽出溶媒に 1 M 塩化カリウム液及び 10 mM EDTA を含む 100 mM Tris-塩酸 Buffer (pH9.5) を用い、Ampdirect Plus を PCR 反応液の Buffer として使用したところ、キノコの粗抽出液でも良好な遺伝子増幅が得られた。この方法を用いて、奈良県内の神社境内、道路脇等で採取したキノコ及び平成 23 年の食中毒原因となったドクササコ冷凍保存検体について ITS 領域の増幅を行い、BLAST 相同性検索を行った。これらのキノコは専門家の形態鑑別済みであるが、異なる属の検索結果となるものはなかった。また、4 年間の保存期間を経たキノコであっても遺伝子解析による同定が可能であった。

ITS 領域を用いた相同性検索は、食中毒事件における鑑別の有用な手段となり得ることがわかり、当センターにおいても専門家の形態鑑別に替わる手法を取り入れることができた。

## 奈良県で検出したヒトパレコウイルス 3 型の遺伝子解析に基づく疫学的研究

稲田真知

公益財団法人 大同生命厚生事業団 平成 27 年度「地域保健福祉研究助成」報告集

本県では平成 26 年度に検索を開始した HPeV-3 について、遡り調査を実施し本県でも全国と同様に HPeV-3 を検出する事がわかった。検出した中には新生児の重症例も見られた。検出する時期は夏期が多く、エンテロウイルス感染症と検出時期や症状が似ていることから、臨床症状だけでは鑑別は難しいと思われる。新生児では網状チアノーゼや掌蹠の紅斑が特徴的な症状とされており、病原体検査票にも発疹に関して特記されていることが多かったことから、発疹症状のあるものについて、エンテロウイルス感染症との鑑別検索は重要と思われた。2014 年に検出が多かったことについては、少なくとも 3 系統のウイルスが混合流行していたためとも考えられ、今後もウイルス解析が流行予測に役立つと思われる。

## ロタウイルスワクチンによる発生動向への影響に関する研究

杉本大地

公益財団法人 大同生命厚生事業団 平成 27 年度「地域保健福祉研究助成」報告集

2010/11～2014/15 シーズンの 5 シーズンについて、疫学調査及びウイルス遺伝子解析を行い、包括的に流行状況を把握するとともに、DS-1 類似 G1P[8]株について遡り調査を実施し、ワクチンが本県の感染症発生動向調査に与える影響を調査した。ロタウイルスの遺伝子型は、2013/14 シーズンを除いた 4 シーズンにおいて G1P[8]と G3P[8]が少しずつ入れ替わりながら主流株となっていた。DS-1 類似 G1P[8]株については、2011/12 シーズンに初めて出現していたが、Wa G1P[8]から全面的に入れ替わることなく約 40～70%の頻度で共存状態が続いていることがわかった。今回は、ワクチン接種歴のある患者は 6 例と少なく、ワクチンが発生動向に与える直接の影響を評価することには至らなかった。



## 第3章 調査研究・報告

### 第5節 研究発表の抄録



## いわしつみれ汁のヒスタミン食中毒事例における UPLC-FL の適用

村上友規・折口菜都希・安藤尚子・岡山明子

平成 28 年 5 月 19 日（東京） 第 111 回日本食品衛生学会学術講演会

平成 28 年 2 月、県内の保育園・幼稚園にて「いわしつみれ汁」のヒスタミンによる食中毒が発生した。フルオレスカミンを用いた玉瀬らの方法により検査を行ったが、HPLC 移動相にイオンペア試薬を用いるためカラム平衡化に時間がかかり、更に 1 検体あたり 35 分間の測定時間を要する。迅速な対応が求められる食中毒発生時には、少しでも速く結果を報告することが求められるため、現在の検査方法の改善が課題となる。そこで、本検討では UPLC を用いてイオンペア試薬を使用せずにメソッドを構築し、測定時間の短縮化を図ることを目的とした。検討の結果、移動相に 10 mM リン酸塩水溶液を用いることでイオンペアを使用せずに良好な分離が得られ、1 検体あたり 35 分間要していた測定時間を 5 分に短縮することが可能となった。

## ヒスタミンによる食中毒の事例報告及び測定時間短縮の検討 ～ 保健所への迅速な報告を目指して ～

村上友規・仲井菜都希・安藤尚子・岡山明子

平成 28 年 6 月 19 日（大和郡山市） 平成 28 年度奈良県衛生関係職員研修会

平成 27 年 5 月に「うるめいわし丸干し」及び平成 28 年 2 月に「いわしのつみれ汁」を喫食したことによる 2 件のヒスタミン食中毒事件が発生した。これまでのヒスタミンの公定法と比較検討しつつフルオレスカミンを用いた玉瀬らの方法により検査を行い、測定時間の短縮に一定の成果が得られた。しかし、HPLC 移動相にイオンペアを用いるためカラム平衡化に時間がかかり、更に 1 検体当りの測定時に 30 分以上を要する。そこで、更なる測定時間の短縮を図るため UPLC を用いて検討を行った。その結果、当初の食中毒発生時には保健所への結果報告に 3 日間を要していたのが、1 日以内に報告出来るようになった。

## フグによる食中毒事件への対応について

折口菜都希・村上友規・山本雄也・北岡洋平・西山隆之・安藤尚子・  
山下浩一・岡山明子・村上太郎\*・仲谷正\*・紀雅美\*・山野哲夫\*

平成 28 年 11 月 18 日（青森市） 第 53 回全国衛生化学技術協議会年会

平成 28 年 1 月、医療機関から保健所へ「フグ食中毒の疑いがある患者を治療している」旨の連絡があった。保健所の調査によると、県内の家庭で 2 名が嘔吐、麻痺等の食中毒症状を呈し入院（内 1 名は大阪市で入院）し、フグによる食中毒が疑われた。

当センターにおいてフグ毒テトロドトキシン（TTX）の検査を行った。検査の結果、魚類の卵巣から 35 MU/g、患者の気管内容物から 29 MU/g と何れも中毒量を超える TTX を検出した。また、大阪市立環境科学研究所で行った血清、尿中 TTX 濃度の検査でも TTX を検出した。さらに、遺伝子解析による魚種鑑別の結果、卵巣と患者の気管内容物はカラスまたはトラフグの組織であった。これらの結果から、本件はフグの卵巣を喫食したことによるテトロドトキシン中毒であると断定した。

\*大阪市立環境科学研究所

## 食中毒原因キノコの遺伝子を用いた鑑別について

安藤尚子・村上友規・仲井菜都希・米田正樹・岡山明子

平成 28 年 12 月 1 日（橿原市） 第 37 回奈良県公衆衛生学会

キノコによる食中毒は、厚生労働省の食中毒統計調査によると平成 18 年から平成 27 年の 10 年間で 494 件発生し、患者数 1,476 名、そのうち 5 名が死亡した。奈良県では近年、平成 7 年、平成 20 年、平成 23 年の 3 件発生し、死者はいなかった。食中毒事件発生時には、食中毒の原因を調査するため原因キノコを鑑別する必要がある。そこで、少量で元の形態が分からないキノコからでも鑑別可能な遺伝子を用いた鑑別方法を検討した。

キノコから短時間で抽出した DNA を用いて ITS 領域の塩基配列を解析し、国際塩基配列データベースに登録されている塩基配列との相同性検索により種を鑑別した。市販のキノコや奈良県内で採取したキノコに適用した結果、適切に鑑別できることを確認した。



## 数年にわたり患者が発生した施設のレジオネラ属菌検査について

吉田孝子

平成 28 年 7 月 21 日（広島市）衛生微生物技術協議会第 37 回研究会レファレンスセンター等関連会議

2012 年 4 月，2013 年 6 月，2014 年 11 月の 3 回にわたり，同一施設の利用者からレジオネラ症患者が発生した事例があった。当該施設は，原因施設として特定されなかったが，各々の患者発生時の浴槽水検査でレジオネラ属菌が検出された。そこで，当該施設の配管洗浄の効果を確認するため，洗浄直後の配管等の拭き取り検査を行ったところ，再度レジオネラ属菌が検出された。さらに，患者発生時と配管洗浄直後に検出された計 5 株についてパルスフィールド・ゲル電気泳動(PFGE)を行ったところ，4 株が一致し，2012 年より同一のレジオネラ属菌による汚染が継続していることが示唆された。そこで，配管洗浄に用いていた次亜塩素酸ナトリウムをアルカリ性の泉質による影響が少ない二酸化塩素に変更し，配管洗浄を実施したところレジオネラ属菌不検出になった。今後も県内保健所と連携し，公衆衛生に寄与する科学的データの提供に努めたい。

## 奈良県における成人の侵襲性肺炎球菌感染症の発生状況 (2013 年度～2015 年度)

辻本真弓・田邊純子・橋田みさを・堀 重俊・大前壽子

平成 28 年 12 月 1 日（橿原市） 第 37 回奈良県公衆衛生学会

2013 年 4 月から 2016 年 3 月に届出された奈良県の成人の侵襲性肺炎球菌感染症(invasive pneumococcal disease : IPD) の報告状況と患者由来肺炎球菌菌株の血清型別結果をまとめた。2013 年 4 月から 2016 年 3 月の県内の成人の IPD 届出数は 55 例であった。55 例中 36 例(65.5%)が 65 歳以上で，高齢者に多い傾向が見られた。収集した肺炎球菌 39 株の血清型で最も多かった血清型は 3 型で 7 株(17.9%)，次いで 19A 型で 5 株(12.8%)であった。ワクチンカバー率は PCV7 が 12.8%(5/39)，PCV13 が 43.6%(17/39)，PPSV23 が 56.4%(22/39)であった。研究班に参加している 10 道県で 2013 年 4 月から 2015 年 12 月までに分離された成人 IPD 患者由来株のワクチンカバー率は PCV7 が 11.1%，PCV13 が 45.2%，PPSV23 が 67.9%であり，当県においては PPSV23 でのカバー率が低く，他は同様の傾向であった。当県においても全国と同様に血清型置換が起こっていると考えられるため，引き続き血清型の動向を監視することが重要である。

## ノロウイルス検査法と発生状況について

藤谷美沙子

平成 28 年 6 月 22 日（大和郡山市） 平成 28 年度奈良県衛生関係職員研修会

ノロウイルスは、ウイルス性急性胃腸炎の主な原因ウイルスである。年間を通して検出されるが、特に冬季に多く、当センターにおいても冬季に行政検査が集中している。感染経路は経口感染、飛沫感染であり、集団生活の場での集団発生や、加熱不十分な二枚貝や汚染された食品の喫食により食中毒を引き起こすこともある。

今回は、当センターで行っているノロウイルス検査法の概要及び大流行を引き起こすと懸念されていた GⅡ.17 を中心に、遺伝子型別発生状況について報告した。

## 奈良県内における A 群ロタウイルスの流行状況(2015/16)

杉本大地・中野 守・藤谷美沙子・千葉翔子・稲田眞知・榮井 毅

平成 28 年 9 月 30 日（和歌山市）

平成 28 年度地方衛生研究所全国協議会近畿支部ウイルス部会研究会

奈良県では、A 群ロタウイルス(RVA)の遺伝子型について 1999 年以来継続して調査を実施している。これまで 2013/14 シーズンを除いて G1P[8]、G3P[8]が主流株となっていたが、2015/16 シーズンには、これまでほとんど検出がなかった G2P[4]が主流株となった。

2015/16 シーズンの奈良県における RVA 検出状況と、一部定点医療機関の協力のもと、ロタウイルス腸炎の臨床的特徴について報告する。

## 流行性耳下腺炎の流行とムンプスウイルスの遺伝子学的解析について

藤谷美沙子・稲田眞知・杉本大地・千葉翔子・中野 守・榮井 毅

平成 28 年 12 月 1 日（橿原市） 第 37 回奈良県公衆衛生学会

流行性耳下腺炎は、ムンプスウイルスが原因の感染症であり、耳下腺のびまん性腫脹、疼痛、発熱等を主症状とし、2～7 歳の小児に好発する。不顕性感染が 3 分の 1 程度あり、患者は発症数日前からウイルス排出が始まっているため幼稚園、小学校等で集団発生を起こすことがある。一般に予後は良好であるが、無菌性髄膜炎、感音性難聴、脳炎など様々な合併症を引き起こす。唯一の予防法は、ワクチン接種であるが、麻しん・流行性耳下腺炎・風しん混合（MMR）ワクチンの定期接種が中止されてからは、単味ワクチンを任意接種となっている。接種率は高くはなく、4～5 年間隔で流行を繰り返している。

今年、2009～2010 年以來の流行となったため、発生状況及び検出したムンプスウイルスの遺伝子学的解析について報告した。

## 奈良県内における A 群ロタウイルスの流行状況(2015/16)

杉本大地・中野 守・藤谷美沙子・千葉翔子・稲田眞知・榮井 毅

平成 28 年 12 月 10 日（奈良市） 平成 28 年度奈良県小児科医会学術講演会

奈良県では、A 群ロタウイルス(RVA)の遺伝子型について 1999 年以來継続して調査を実施している。これまで 2013/14 シーズンを除いて G1P[8]、G3P[8]が主流株となっていたが、2015/16 シーズンには、これまでほとんど検出がなかった G2P[4]が主流株となった。

2015/16 シーズンの奈良県における RVA 検出状況について報告するとともに、今シーズンの感染性胃腸炎に関する情報提供を行う。

## ロタワクチンがウイルスの流行と遺伝子型に与える影響について

青木才一志（あおき小児科）・杉本大地

平成 28 年 8 月 27 日（高松市） 第 26 回日本外来小児科学会

ロタワクチン導入により入院例の減少は報告されているが、一般外来では未だ流行が確認されている。そこで、ワクチンが流行規模と遺伝子型の変遷にどのように影響しているのか、当院で経験したロタウイルス腸炎から検討した。

## プライマリ・ケアにおけるロタワクチンの効果と今後の課題について

青木才一志（あおき小児科）・杉本大地

平成 28 年 10 月 23 日（東京都） 第 20 回日本ワクチン学会

ロタワクチンの普及により入院の減少や外来症例の軽症化についての報告は散見されるが、家族内感染の報告は少ない。当院において 2011 年にワクチン開始後、2014/15、2015/16 に地域的な流行を経験した。そこで、ワクチン接種児と非接種児における臨床症状と家族内感染について検討した。またワクチンが遺伝子型の流行に与える影響について調査を行った。

## ロタワクチンの臨床効果と奈良県におけるウイルス遺伝子型の変遷について

青木才一志（あおき小児科）・杉本大地

平成 28 年 11 月 25 日（奈良市） 第 121 回日本小児科学会奈良県地方会

ロタワクチン導入により入院数や救急外来受診率の減少は報告されているが、臨床効果についての報告は少ない。当院では 2011 年にワクチン開始後、2014/15 と 2015/16 に地域的な流行を経験した。そこで、ワクチン接種児と非接種児における臨床症状と家族内感染について検討した。また、2015/16 シーズンについては流行遺伝子型を同定し得たので、ウイルス遺伝子型の変遷が流行状況や臨床症状に与える影響について若干の考察を加えて報告する。

## プライマリ・ケアにおけるロタワクチンの効果と遺伝子型の変遷について

青木オ一志（あおき小児科）・杉本大地

平成 29 年 2 月 4 日（大阪市） 第 13 回日本小児消化管感染症研究会

ロタワクチンの普及により入院の減少や外来症例の軽症化についての報告は散見されるが、家族内感染の報告は少ない。当院において 2011 年にワクチン開始後、2014/15 2015/16 に地域的な流行を経験した。そこで、ワクチン接種児と非接種児における臨床症状と家族内感染について検討した。またワクチンが遺伝子型の流行に与える影響について調査を行った。

## ロタワクチンの臨床効果とウイルス遺伝子型に与える影響について

青木オ一志（あおき小児科）・杉本大地

平成 29 年 2 月 18 日（尼崎市） 第 270 回日本小児科学会兵庫県地方会

ロタワクチン導入により入院例の減少は報告されているが、一般外来における軽症患者数や臨床効果についての報告は少ない。当院では 2011 年にワクチン開始後、2014/15 と 2015/16 に地域的な流行を経験したので、ワクチン接種児と非接種児における臨床症状と家族内感染について検討した。また過去 10 年の奈良県における流行遺伝子型と全国的なロタウイルス検出状況により、ワクチンが遺伝子型の変遷や流行状況に与える影響について若干の考察を加えて報告する。

## プライマリ・ケアにおけるロタワクチンの効果と今後の課題について

青木オ一志（あおき小児科）・杉本大地

平成 29 年 3 月 12 日（大阪市） 第 30 回近畿小児科学会

ワクチンの普及によりロタ腸炎は減少したが、当院では 2 年連続の流行を経験したので、ワクチン接種児と非接種児における臨床症状や家族内感染について比較した。また遺伝子型も同定し得たので報告する。

患児数 2014/15 は 65 名（ワクチン接種児 27 名）2015/16 は 186 名（同 60 名）臨床症状の比較はワクチン接種児は(平均最高発熱：38.0℃，受診までの嘔吐回数：1.46 回，受診までの下痢回数：2.03 回，水溶性下痢日数：3.36 日)，ワクチン非接種児は(38.1℃，4.07 回，3.82 回，5.33 回)。家族内感染率はワクチン接種児 2014/15(0%)，2015/16(4%)，ワクチン非接種児 2014/15(29.1%)，2015/16(31.7%)。以上よりワクチンは消化器症状の軽症化と家族内感染抑制に極めて有効と判断された。

奈良県の流行遺伝子型は 2014/15 は G1P[8] 64% (変異株 DS-1like 76%) 2015/16 は G2P[4]97% と大きな変遷が認められた。今後もロタ腸炎の地域的な流行と遺伝子型の継続的な監視が必要と思われた。

## 奈良県保健研究センター一年報投稿規定

1. 奈良県保健研究センター一年報は、本研究センターにおいて行った研究・調査の業績を掲載する。
2. 投稿者は、本研究センター職員とする。ただし、共同研究者はこの制限を受けない。
3. 原稿の種類と内容
  - 1) 原著  
調査研究などで新知見を含むまとめたものは、原著として投稿できる。記述の順は、表題（和文、欧文）、著者名（和文、欧文）、要旨（200字程度）、緒言、方法、結果、考察、文献とする。
  - 2) 報告  
調査研究、事業に係る技術等検討などでまとめておく必要のあるものは、報告として投稿できる。記述の順は、表題（和文、欧文）、著者名（和文、欧文）、緒言、方法、結果、考察、文献とする。
  - 3) 資料  
事業に係る技術等検討及び特に記載してまとめておく必要のあるものは、資料として投稿できる。記述の順は、表題（和文、欧文）、著者名（和文、欧文）、本文とする。本文には緒言、方法、結果、考察に相当する内容を含め、体裁にとらわれず自由に記述することができる。資料の長さは刷り上り2ページを超えない。
  - 4) 他誌掲載論文の要旨  
他誌に掲載した論文の内容を紹介する。記述の順は、表題、著者名、掲載誌名、要旨（欧文も可）とする。
  - 5) 研究発表の抄録  
学会（研究会を含む）に発表した内容を紹介する。記述の順は、表題、発表者名、学会名（研究会名）、抄録（欧文も可）とする。抄録の内容は400字以内（欧文は10行以内）にまとめる。
4. 原稿作成要領
  - 1) 執筆要領
    - (1) 本文は日本語を用いる。  
本文中の和文フォント（漢字・ひらがな・カタカナ）はMS明朝（全角）、英数フォント（数字・アルファベット）はCentury（半角）を用いる。フォントサイズは10ポイントを用いる。
    - (2) 原稿はワープロソフトで作成し、句読点は「，」「。」（全角）とする。
    - (3) 原稿はA4版用紙を使用する。  
表題（和文、欧文）、著者名（和文、欧文）、要旨は、1行46文字、緒言以下は、1行24文字、1頁46行の2段組とする。表題は12ポイントを用いる。
    - (4) 見出し等の番号は以下のように記載する。頭出しの数字、カッコ、ドットは半角を用い、見出し文との間に半角スペースを入れる。
      1. Arial（半角）・・・見出し
      - 1) Arial（半角）・・・小見出し
      - (1) Century（半角）、① MS明朝（全角）、i) Century（半角）・・・細分見出し見出し文および小見出し文の英数フォントはArial（半角）、細分見出し文の英数フォントはCentury（半角）を用いる。
    - (5) 単位は国際的に慣用されているものを使用し、数字と単位の間は半角スペースを1つ挿入する。ただし％、℃はMS明朝（全角）を用い、記号と数字の間はスペースを入れない。
  - 2) 表題、著者名、所属機関名
    - (1) 表題の和文フォントはMSゴシック（全角）とし、英数フォントはArial（半角）とする。表題の欧文フォントはCentury（半角）とし、冠詞、前置詞・副詞、接続詞以外の単語は第1字目を大文字にする。
    - (2) 著者名の欧文は、名は最初の1文字のみを大文字とし、姓はすべて大文字とする。
    - (3) 本研究センター職員以外の著者名については、その右肩に「\*、\*\*」の記号をつけ、それぞれの所属機関名をその頁の最下段に脚注として記載する。

### 3) 図・表および写真

- (1) 図・表および写真は白黒とする。
- (2) 図・写真では下にタイトルと説明を，表では上にタイトル，下に説明を記載する。なお，タイトルと説明は画像貼付しないこととする。
- (3) 図は線の太さ，文字の大きさなど縮尺を考慮して作成し，本文中に挿入しておく。
- (4) 表中の和文フォント（漢字・ひらがな・カタカナ）はMS明朝（全角），英文フォント（数字・アルファベット）はCentury（半角）を用いる。グラフ中のフォントはそれぞれMSゴシック（全角）とArial（半角）を用いる。

### 5) 脚注および引用文献

- (1) 脚注は「\*」を用い，欄外に入れる。
- (2) 引用文献は<sup>1)</sup>，<sup>1,2)</sup>，<sup>1-3)</sup>のように右肩に示し，最後一括して番号順に列記する。
- (3) 文献は下記のように著者名（3名まで），雑誌名，巻，ページ，年号（西暦）の順に記載し，巻数はゴシック体，欧文雑誌名はイタリック体とする。以下に例を示す。
  - 1) 佐藤恭子，山田隆，義平邦利，他：食衛誌，27, 619-623 (1986)
  - 2) J. Hine, A. Dowell, J. E. Singley, *et al.*: *J. Am. Chem. Soc.*, 78, 479-483 (1956)
  - 3) “食品衛生検査指針理化学編”厚生省生活衛生局監修，212-216 (1991)，（社）日本食品衛生協会
- (4) インターネット上のホームページ等は変更・削除されることがあるので本文中に記載する。

### 5. 原稿の提出について

- 1) A4版用紙に印字した原稿1部とする。なお，紙情報にあわせて原稿・図・表の電子情報の形で提出のこと。
- 2) 原稿は所属担当統括主任研究員を経て編集委員に提出する。
- 3) 提出期限は編集委員会で定める。

### 6. 審査

原稿は編集委員会において審査し，採否を決定する。また編集委員会は必要に応じて，種類・内容の変更を求めることができる。

### 7. 校正

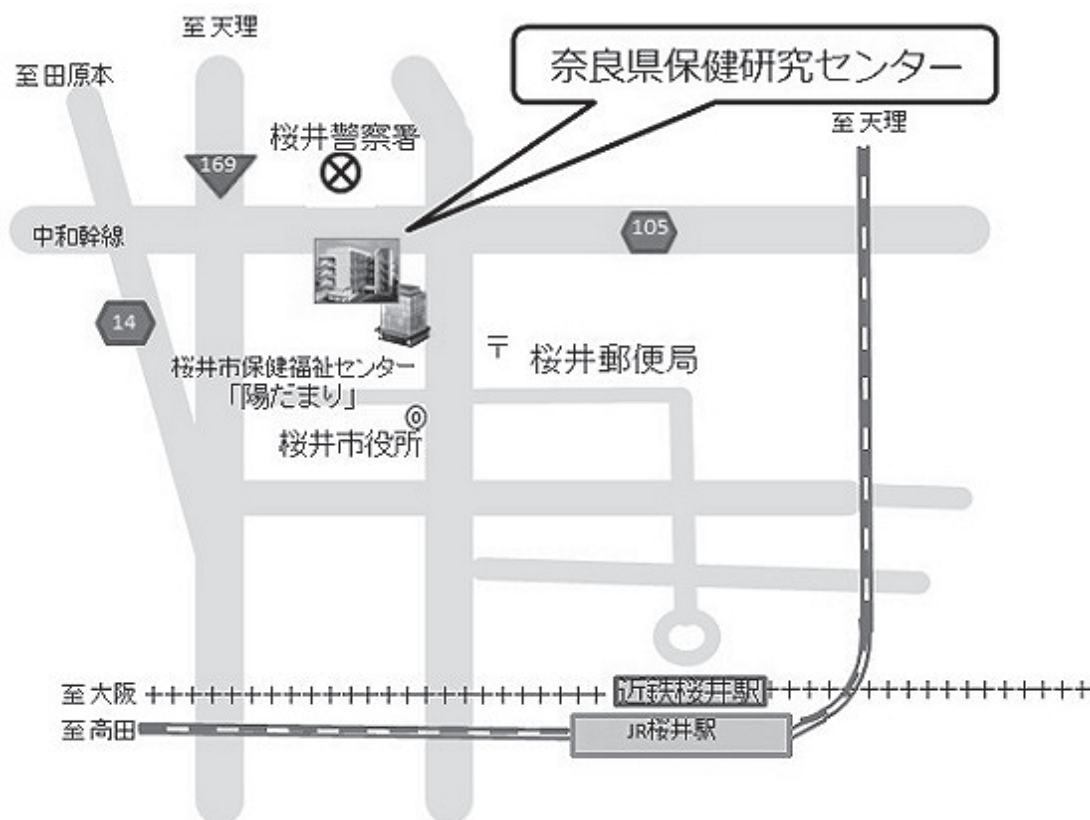
校正はすべて著者の責任とするが，編集委員会は編集の都合上変更を求めることができる。

### 8. その他

- 1) 年報編集に関し必要な事項は，すべて編集委員会において決定する。なお編集委員会はセンター所長（編集委員長），副所長及び食品，細菌，ウイルス・疫学情報担当各1名の編集委員で構成する。
- 2) 編集委員の任期は1年とし，業務は年報の発送をもって終了する。
- 3) 本投稿規定は編集委員の決議により，改正することが出来る。
- 4) 編集委員は年報全体の統一を図る目的でスタイルの調整を行うことができる。

### 9. 附則

- 1) この奈良県保健研究センター年報投稿規定は，平成19年4月12日から施行(改正)する。
- 2) この規定は，平成25年4月1日に改正する。
- 3) この規定は，平成28年6月1日に改正する。
- 4) この規定は，平成29年5月16日に改正する。



【編集委員】

福 田 忠 明 (委員長)
岡 山 明 子
内 田 美 枝
稲 田 眞 知
米 田 正 樹

## 奈良県保健研究センター年報

第51号 平成28年度(2016年)

編集発行人 奈良県保健研究センター  
〒633-0062 奈良県桜井市栗殿1000番地  
電話 0744-47-3160  
FAX 0744-47-3161

印刷所 株式会社アイプリコム  
〒636-0246 奈良県磯城郡田原本町千代360-1  
電話 0744-34-3030