

第3章 調査研究・報告

第2節 報 告

QuEChERS 法による種実類中残留農薬一斉試験法の検討

中永絵理・南浦茉奈・上床知佐奈・竹田依加・上眞佐美

Investigation for Simultaneous Analysis of Pesticides in Nuts and Seed with QuEChERS Method

Eri NAKAE・Mana MINAMIURA・Chisana UWATOKO・Erika TAKEDA and Masami KAMI

緒言

食品中に残留する農薬の一斉試験法については、厚生労働省通知（平成 17 年 1 月 24 日付け，食安発第 0124001 号）により定められている。さらに，平成 19 年 11 月 15 日付け，食安発第 1115001 号（平成 22 年 12 月一部改正）により，「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¹⁾」（以下，ガイドラインとする）が示された。通知で定める試験法以外の方法で試験を実施する場合，その試験法がガイドラインの基準に適合していることを確認することで，通知で定める試験法と同等な試験法とみなされる。

過去に当センターにおいては，QuEChERS 法による農産物中残留農薬一斉試験法（以下，独自試験法とする）を確立し，ガイドラインに従い妥当性評価を実施したことを報告した²⁾。本研究では，種実類の検査対象作物の拡大を目的とし，まず，ごまの種子について，独自試験法の前処理方法の適応が可能であるかを検証した。さらに，ガイドラインに従って妥当性評価を実施したので報告する。

方法

1. 試料

試料には，奈良県内で流通している金ごまを用い，ミルで均一化した。直ちに使用しない場合は小分けにして冷凍保存し，使用時に解凍して用いた。

2. 試薬等

GC-MS/MS の標準品は林純薬工業（株）製 GC/MS 用農薬混合標準溶液 7 グループ 354 化合物，LC-MS/MS の標準品は富士フィルム和光純薬（株）製 LC/MS 用農薬混合標準溶液 4 グループ 116 化合物を用いた。

前処理に用いた n-ヘキサン，トルエン，アセトン，アセトニトリルおよびメタノールは全て富士フィルム和光純薬（株）製残留農薬分析用を，無水硫酸マグネシウム，クエン酸三ナトリウム二水和物および塩化ナトリウムは全て富士フィルム和光純薬（株）製特級を，

クエン酸水素二ナトリウム 1.5 水和物は関東化学（株）製特級を，LC-MS/MS 移動相用の超純水，メタノールおよび酢酸アンモニウムは全て富士フィルム和光純薬（株）製の LC/MS グレードを用いた。

精製に用いた，オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム（1,000 mg）は Agilent 社製 Bond Elut C18（1,000 mg，6 mL），グラファイトカーボン/エチレンジアミン-N-プロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラムは SUPELCO 社製 ENVI-Carb II/PSA（500 mg / 500 mg，6 mL）であった。

3. 装置

GC-MS/MS は Agilent 社製ガスクロマトグラフ GC7890B および同社製質量分析計 7000D を，LC-MS/MS は Waters 社製液体クロマトグラフ ACQUITY UPLC H-Class システムおよび同社製質量分析計 Xevo TQ-S micro を使用した。

ミルは National 製 MX-X107 を，高速ホモジナイザーは KINEMATICA 製 Polytron PT-10-35 GT を，遠心分離機はエッペンドルフ・ハイマック・テクノロジー（株）製 himac CR 21N を，ロータリーエバポレーターはヤマト科学（株）製 RE800 および RE801 を使用した。

4. 測定条件

GC-MS/MS および LC-MS/MS の測定条件を表 1 および表 2 に示した。

表 1 GC-MS/MS 測定条件

カラム	VF-5MS 30 m x 250 μm x 0.25 μm
オープン温度	70°C (2 min) - 25°C/min - 150°C - 3°C/min - 200°C (0 min) - 8°C/min - 310°C (5 min)
注入口温度	250°C
キャリアーガス	He
イオン化法	EI (70 eV)
注入モード	Splitless, 2 μL
イタフェーズ温度	280°C
四重極温度	150°C
流量	1.5 mL/min Constant Flow

表 2 LC-MS/MS 測定条件

カラム	ACQUITY UPLC BEH C18 1.7 μ m, 2.1 mm x 100 mm
カラム温度	50°C
移動相	A液：5 mM酢酸アンモニウム B液：5 mM酢酸アンモニウムメタノール溶液
流速	0.4 mL/min
グラジエント条件	B%濃度：5%→5%(1 min)→95%(15 min) →95%(20 min)→5%(20.1 min) Stop time 25 min
データ取込	2 min ~ 20 min
注入量	2 μ L
Source Temperature	150°C
Capillary Voltage	3000 V
イオン化方法	ESI(+), ESI(-)

5. 試験溶液の調製

試験溶液の調製フローを図に示した。まず、試料 5.00 g を 50 mL ポリプロピレン製遠沈管に量り採り、水 10 mL を正確に加え、15 分間放置した。これにアセトニトリル 10 mL を正確に加え、高速ホモジナイザーで 1 分間抽出した。次に、塩化ナトリウム 1 g、クエン酸三ナトリウム二水和物 1 g、クエン酸二ナトリウム 1.5 水和物 0.5 g、無水硫酸マグネシウム 4 g を添加して 1 分間強く振とうした後、室温で 3,000 rpm、10 分間遠心分離した。

次に、あらかじめ 10 mL のアセトニトリルでコンディショニングした Bond Elut C18 ミニカラムに遠心分離後の上層のアセトニトリル層を正確に 4 mL 注入した。ミニカラムにリザーバーを接続し、20 mL のアセトニトリルで溶出した。抽出液と溶出液は、100 mL のナス型フラスコに回収した。ナス型フラスコに回収した溶液は、ロータリーエバポレーターを用い、40°C の水浴上で減圧濃縮した。

ナス型フラスコに 2 mL のアセトニトリルトルエン (3:1) 混液を加えて残渣を溶解した。溶解液をあらかじめ 10 mL のアセトニトリルトルエン (3:1) 混液でコンディショニングした ENVI-Carb II/PSA ミニカラムに注入した。再度、ナス型フラスコに 2 mL のアセトニトリルトルエン (3:1) 混液を加え、同様の操作をした。次にナス型フラスコ内に 10 mL のアセトニトリルトルエン (3:1) 混液を加えて、軽く超音波をあてフラスコ内の残留物を溶解し、リザーバーを接続した ENVI-Carb II/PSA ミニカラムに注入した。さらに、同様の操作を 2 回繰り返した。溶解液は、100 mL のナス型フラスコに回収した。

ナス型フラスコに回収した溶液は、ロータリーエバポレーターを用い、40°C の水浴上で減圧濃縮した。乾固手前で減圧濃縮を終了し、残余の溶媒は、窒素気流下で除去した。アセトン/n-ヘキサン (1:1) 混液で残留物を溶解し、目盛り付き試験管で正確に 2 mL に定容し

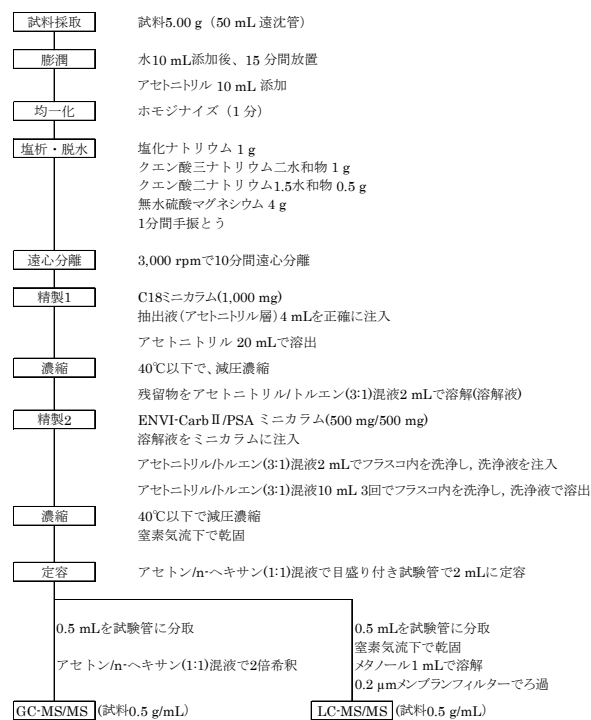


図 フローシート

た (試験液 I)。

次に試験液 I を別の試験管に 0.5 mL 採取し、窒素気流下で乾固した後、メタノールを 1 mL 加えて再溶解し、0.2 μ m のメンブレンフィルターを用いてろ過した (試験液 II)。さらに、試験液 I をアセトン/n-ヘキサン (1:1) 混液で 2 倍希釈した (試験液 III)。試験液 II を LC-MS/MS、試験液 III を GC-MS/MS を用いて分析した。

6. 標準溶液の調製

GC-MS/MS分析は各農薬濃度がそれぞれ2.5, 5, 15, 25, 37.5 ng/mLになるように、標準溶液をブランク試料から操作して得られた試験溶液で希釈し、マトリックス添加標準溶液 (試料 0.5 g 相当/mL) を調製した。

LC-MS/MS分析は各農薬濃度がそれぞれ2.5, 5, 15, 25, 37.5 ng/mLになるように標準溶液をメタノールで希釈し調製した。

7. 妥当性評価

選択性は、各試料のブランク試料を調製し、定量を妨げるピークがないことを、あらかじめ確認した。真度、併行精度および室内精度の評価は、試験者 1 名が 2 濃度 (0.01 μ g/g, 0.05 μ g/g)、併行数 2, 5 日間の枝分かれ試験により実施した。

評価に用いる目標値は、添加濃度 0.01 μ g/g の場合、真度 70%~120%, 併行精度 25%未満, 室内精度 30%未満, 添加濃度 0.05 μ g/g の場合、真度 70%~120%,

併行精度 15%未満, 室内精度 20%未満とした。

結果

1. 抽出条件の検討

膨潤の有無が抽出効率に与える影響について検討した。添加回収試験の回収率が70%~120%である化合物数は、膨潤の有無で大きな差は見られなかった。しかし、膨潤無しの場合では、検体内への抽出溶媒の浸透が悪く、抽出液を正確に4 mL分取することが困難であった。

2. 通知試験法との比較

通知試験法と独自試験法について、標準溶液を0.01 µg/g 添加した添加回収試験を実施し、回収率が

70%~120%の化合物数を比較したところ、顕著な差は見られなかった。

3. 妥当性評価結果

ガイドラインに従い、真度、併行精度および室内精度の評価を行い、A(真度, 精度とも目標値を満たす), B (A以外で真度が50%~150%), C (A以外で真度が30%~50%もしくは150%~) および D (真度30%未満もしくは、精度、選択性の目標値を満たさない) の4つの判定に分類した。

妥当性評価の結果を表3および表4に示した。GC-MS/MSでは、340化合物中214化合物、LC-MS/MSでは112化合物中73化合物でガイドラインの目標値を達成した。

表3 GC-MS/MS対象化合物の妥当性評価結果

作物 添加濃度(µg/g) 妥当性評価項目	ごまの種実						判定	作物 添加濃度(µg/g) 妥当性評価項目	ごまの種実						判定
	0.01		0.05		0.05				0.01		0.05		0.05		
	真度	併行	室内	真度	併行	室内		真度	併行	室内	真度	併行	室内		
DCIP	11%	22%	70%	6%	22%	53%	D	MCPBエチル	68%	2%	7%	62%	4%	4%	B
クロフェンテジン(分解物)	68%	3%	10%	64%	3%	10%	B	MCPB	70%	5%	10%	63%	5%	5%	B
ジクロロボス	74%	4%	11%	65%	8%	8%	B	ホスファミドン II	104%	2%	6%	93%	4%	4%	A
アリドクロール	72%	5%	11%	62%	7%	8%	B	ベンフレセート	96%	1%	6%	91%	3%	4%	A
ネライストキシソ	45%	8%	18%	33%	11%	17%	C	ジクロロフェンチオン	65%	3%	7%	57%	5%	6%	B
ジクロロベニル	60%	4%	11%	54%	5%	6%	B	ジメテナミド	92%	1%	6%	83%	3%	4%	A
EPTC	34%	8%	25%	27%	13%	17%	D	プロバニル	89%	3%	4%	81%	4%	4%	A
ピフェニル	33%	6%	20%	28%	9%	11%	D	テルブカルブ	87%	1%	6%	80%	3%	3%	A
メビソス	75%	2%	8%	66%	2%	12%	B	プロモブチド	89%	4%	6%	83%	2%	3%	A
ブチレート	37%	6%	17%	29%	12%	16%	D	アセトクロール	88%	3%	7%	79%	4%	4%	A
クロルメホス	59%	2%	10%	54%	6%	7%	B	クロルピリホスメチル	73%	3%	7%	65%	3%	4%	B
エトリジアゾール	45%	3%	13%	36%	7%	7%	C	メトリブジン	93%	2%	5%	87%	4%	5%	A
メタクリホス	86%	2%	6%	82%	3%	4%	A	オキシホコナゾール代謝産物I(ホルミル体)	90%	4%	6%	81%	5%	5%	A
クロロネブ	67%	2%	9%	64%	3%	4%	B	ピンクゾリン	81%	5%	6%	75%	4%	5%	A
チオンクラム	21%	5%	36%	13%	7%	34%	D	スピロキサミン I	99%	1%	4%	90%	3%	4%	A
クリミジン	86%	2%	6%	83%	2%	3%	A	パラチオンメチル	93%	3%	7%	83%	1%	3%	A
オルトフェニルフェノール	86%	1%	4%	82%	3%	3%	A	シメコナゾール	102%	3%	5%	91%	3%	3%	A
イソプロカルブ	93%	1%	4%	89%	2%	3%	A	トルクロホスメチル	74%	2%	6%	68%	4%	4%	B
モリネート	58%	5%	11%	54%	5%	6%	B	アラクロール	88%	3%	5%	80%	3%	4%	A
XMC	93%	2%	5%	89%	2%	3%	A	シメトリン	83%	1%	4%	77%	3%	4%	A
オメトエート	92%	1%	8%	81%	4%	4%	A	メタラキシル	95%	2%	5%	92%	3%	3%	A
テクナゼン	50%	3%	8%	43%	3%	5%	C	アメトリン	81%	3%	4%	72%	4%	4%	A
キシリルカルブ	95%	2%	5%	90%	2%	3%	A	フェンクローロホス	63%	2%	9%	54%	4%	5%	B
プロボキスル	102%	2%	6%	95%	4%	4%	A	シメメチリン	61%	13%	20%	57%	7%	7%	B
プロバクロール	89%	4%	7%	85%	3%	3%	A	プロメトリン	75%	3%	4%	68%	4%	4%	B
クロルエトキシホス	61%	2%	9%	53%	6%	7%	B	ジチオビル	90%	1%	5%	83%	4%	5%	A
デトシメチル	95%	2%	4%	87%	2%	3%	A	ナフタレンアセタミド	95%	3%	5%	85%	4%	4%	A
ジフェニルアミン	69%	1%	7%	65%	3%	4%	B	ピリミホスメチル	79%	2%	5%	70%	4%	4%	A
エトプロホス	89%	2%	4%	80%	3%	3%	A	テルブトリン	76%	2%	5%	67%	3%	3%	B
エタルフルラリン	77%	7%	9%	67%	4%	6%	B	スピロキサミン II	100%	3%	7%	91%	3%	3%	A
フェンメディファム	99%	4%	5%	90%	3%	3%	A	フェニトロチオン	92%	4%	6%	81%	3%	3%	A
クロルプロファム	79%	4%	6%	73%	4%	4%	A	エトフメセート	98%	3%	5%	94%	5%	5%	A
ジクロルアニド代謝物	136%	3%	3%	124%	3%	6%	B	プロマシル	101%	3%	8%	89%	5%	5%	A
フルシラゾール代謝物	94%	5%	5%	83%	4%	4%	A	ジメチルピホス(E)	97%	3%	5%	87%	4%	4%	A
トリフルラリン	73%	3%	7%	63%	6%	6%	B	ジクロルアニド	9%	17%	112%	6%	35%	66%	D
ジクロロホス	99%	1%	6%	88%	3%	3%	A	エスプロカルブ	65%	2%	8%	58%	6%	6%	B
2,6-ジクロロベンザミド	96%	1%	3%	89%	2%	3%	A	キノクラミン	93%	1%	5%	79%	4%	4%	A
ペンフルラリン	76%	2%	5%	63%	6%	6%	B	マラチオン	97%	4%	6%	87%	3%	3%	A
スルホテップ	88%	3%	5%	82%	4%	4%	A	メトラクロール	88%	2%	5%	80%	4%	4%	A
ジオキサベンソホス	89%	3%	8%	83%	3%	3%	A	クロルピリホス	65%	4%	8%	57%	6%	7%	B
モノクロトホス	99%	4%	11%	86%	5%	5%	A	チオベンカルブ	71%	4%	9%	62%	4%	5%	B
カズサホス	82%	2%	4%	74%	3%	4%	A	ジメチルピホス(Z)	99%	2%	4%	87%	4%	4%	A
ダイアレート I, II	61%	4%	8%	55%	5%	5%	B	クロルタールジメチル	72%	2%	7%	69%	4%	4%	B
ホレート	71%	3%	6%	65%	4%	4%	B	フェンチオン	82%	1%	5%	76%	3%	4%	A
BHC (a)	63%	2%	8%	58%	3%	5%	B	ジエトフェンカルブ	97%	3%	5%	87%	4%	4%	A
チオメトン	80%	2%	6%	73%	4%	4%	A	シアナジン	101%	4%	6%	92%	2%	3%	A
デスメディファム	100%	4%	8%	90%	4%	4%	A	フェンプロピモルブ	91%	2%	5%	85%	4%	4%	A
ジメトエート	132%	3%	4%	129%	4%	5%	B	パラチオン	89%	5%	8%	79%	3%	3%	A
ジクロラン	80%	2%	5%	71%	3%	3%	A	イソフェンホスオキソン	108%	3%	8%	93%	4%	4%	A
フリラゾール	97%	3%	5%	91%	3%	4%	A	トリアジメホス	97%	2%	3%	89%	3%	4%	A
カルボフラン	107%	7%	13%	100%	9%	9%	A	イソカルボホス	97%	6%	7%	90%	5%	5%	A
シマジン	87%	3%	5%	85%	5%	5%	A	テトラコナゾール	104%	2%	5%	95%	4%	4%	A
アトラジン	87%	3%	6%	82%	5%	5%	A	カルベタミド	98%	6%	10%	96%	5%	7%	A
スウエップ	77%	1%	9%	76%	2%	4%	A	フサライド	76%	2%	7%	70%	3%	4%	B
BHC (b)	71%	1%	8%	67%	3%	5%	B	ニトタールイソプロピル	84%	1%	6%	71%	5%	5%	A
ジメチピン	95%	4%	6%	93%	3%	4%	A	プロモホス	61%	5%	9%	53%	9%	9%	B
クロルプロファム	93%	4%	5%	80%	5%	5%	A	ジフェナミド	99%	4%	6%	93%	6%	6%	A
クロマゾン	90%	3%	4%	84%	4%	4%	A	ホスチアゼート I, II	110%	8%	8%	96%	9%	9%	A
キントゼン	48%	3%	8%	38%	5%	6%	C	チアメトキサム	102%	8%	8%	95%	8%	8%	A
プロバジン	82%	2%	6%	77%	4%	4%	A	ペンディメタリン	71%	3%	8%	56%	8%	8%	B
トリフルアニド代謝物	140%	2%	5%	126%	3%	6%	B	シプロジニル	65%	3%	6%	56%	5%	5%	B
ジオキサチオン(分解物)	78%	6%	12%	79%	7%	8%	A	クロルフェンピホス(a)(E)	99%	5%	6%	84%	8%	8%	A
BHC (y)	65%	5%	10%	61%	4%	4%	B	ペンコナゾール	90%	3%	7%	82%	6%	6%	A
テルブホス	70%	3%	7%	62%	6%	6%	B	フィプロニル	108%	4%	7%	96%	8%	8%	A
シアノホス	96%	2%	5%	90%	3%	3%	A	ジメタメトリン	77%	2%	7%	65%	6%	6%	B
ホノホス	71%	3%	6%	65%	4%	4%	B	トリフルアニド	31%	6%	40%	22%	16%	27%	D
プロビザミド	89%	2%	4%	81%	6%	6%	A	クロゾリネート	73%	14%	19%	60%	6%	8%	B
ピロキロン	89%	2%	5%	85%	3%	4%	A	イソフェンホス	91%	2%	6%	78%	6%	6%	A
ホスファミドン I	99%	3%	4%	94%	5%	5%	A	ピリフェノックス(Z)	82%	9%	14%	74%	3%	4%	A
ダイアジノン	80%	3%	7%	74%	3%	4%	A	アレスリン I~IV	91%	12%	14%	66%	8%	8%	B

表3 GC-MS/MS対象化合物の妥当性評価結果 (続き)

作物	ごまの種実						判定	作物	ごまの種実						判定
	0.01			0.05					0.01			0.05			
添加濃度(µg/g)	真度	併行	室内	真度	併行	室内	添加濃度(µg/g)	真度	併行	室内	真度	併行	室内	判定	
妥当性評価項目							妥当性評価項目								
ピリメタニル	69%	1%	6%	65%	3%	4%	B	クロルフェニルピリンホス (6) (Z)	98%	4%	4%	85%	6%	6%	A
ジスルホトン	77%	6%	7%	68%	4%	4%	B	エチクロゼート	99%	4%	7%	88%	7%	7%	A
プロピドロジャクソン I	85%	4%	12%	74%	4%	5%	A	メカルバム	88%	10%	19%	84%	5%	6%	A
ターバシル	97%	3%	5%	87%	3%	3%	A	チアベンダゾール	92%	5%	6%	80%	8%	8%	A
イサゾホス	90%	3%	8%	87%	3%	3%	A	ジクロシメット I, II	98%	3%	3%	90%	4%	4%	A
テフルトリン	67%	3%	6%	61%	7%	8%	B	フェントエート	126%	11%	19%	103%	13%	17%	B
エトリムホス	80%	3%	7%	72%	2%	3%	A	キャプタン	29%	4%	55%	10%	4%	125%	D
BHC (6)	79%	7%	16%	74%	12%	17%	A	キナルホス	88%	3%	5%	76%	4%	5%	A
トリアレート	52%	1%	6%	45%	5%	7%	C	ジメビペレート	74%	4%	8%	64%	4%	7%	B
フェノチオール	51%	4%	11%	42%	5%	9%	C	プロシミド	85%	2%	5%	80%	4%	4%	A
テブピリミホス	69%	2%	6%	61%	5%	5%	B	トリアジメノール I, II	99%	4%	6%	85%	6%	6%	A
イプロベンホス	97%	2%	4%	85%	4%	4%	A	ホルベット	27%	6%	29%	9%	3%	91%	D
オキサベトリニル	89%	2%	7%	85%	3%	3%	A	ゾキサミド(分解物)	86%	13%	13%	83%	31%	31%	D
ペノキサコール	88%	2%	5%	82%	3%	4%	A	フェリムゾ	84%	3%	5%	74%	8%	8%	A
ホルモチオン	69%	9%	46%	32%	16%	40%	D	メトブレ II	52%	14%	25%	43%	10%	11%	C
メチダチオン	91%	2%	7%	82%	3%	3%	A	テブコナゾール	97%	4%	11%	90%	6%	12%	A
クロルベンシド	46%	3%	11%	37%	5%	7%	C	プロバキグ	76%	13%	13%	72%	8%	14%	A
プロモホスエチル	53%	5%	9%	43%	6%	8%	C	ジクロホップメチル	74%	3%	9%	69%	6%	10%	B
キノメチオネート	15%	1%	25%	4%	3%	42%	D	ジフルフェニカン	84%	4%	9%	77%	6%	10%	A
プロバホス	99%	2%	5%	82%	7%	7%	A	レスメトリン I, II	68%	3%	7%	55%	8%	14%	B
ピリフェノックス (E)	81%	3%	7%	68%	6%	6%	B	ビベロニルプロキシド	82%	5%	8%	70%	7%	10%	A
パクロブトラゾール	102%	3%	3%	86%	7%	7%	A	ニトラリン	96%	4%	8%	87%	8%	9%	A
テトラクロルピリンホス	97%	3%	6%	83%	4%	4%	A	ビオレスメトリン	67%	4%	4%	56%	8%	15%	B
トリクラミド	86%	15%	17%	79%	13%	13%	A	エボキシコナゾール	97%	3%	9%	88%	4%	6%	A
ジスルホトンスルホン	100%	4%	6%	90%	5%	5%	A	ゾキサミド	107%	8%	10%	86%	20%	20%	D
ブタクロール	76%	4%	7%	67%	5%	5%	B	メフェンビルジエチル	88%	3%	7%	81%	5%	7%	A
エンドスルファン (a)	48%	9%	16%	45%	5%	7%	C	クリプチカルブ	77%	2%	8%	64%	7%	9%	B
フェノチオカルブ	84%	1%	5%	76%	5%	5%	A	ビロメトキシニル	73%	9%	9%	70%	6%	11%	B
ジタリムホス	14%	1%	35%	3%	5%	40%	D	アセタミプリド	97%	22%	27%	94%	7%	9%	A
ブタミホス	88%	3%	5%	78%	4%	5%	A	ピリダフエンチオン	97%	2%	7%	89%	6%	7%	A
フルトリアホール	102%	3%	5%	94%	6%	6%	A	イブロジオン	103%	4%	11%	88%	12%	12%	A
ナプロバミド	92%	5%	5%	85%	5%	5%	A	プロムコナゾール I, II	90%	4%	7%	82%	4%	6%	A
TCMTB	71%	4%	18%	58%	8%	12%	B	テトラメトリン I, II	84%	3%	8%	72%	7%	7%	A
フェナミホス	101%	7%	9%	87%	5%	7%	A	ホスメット	82%	7%	16%	69%	11%	11%	B
クロルフェンソン	72%	4%	5%	67%	5%	6%	B	ピフェントリン	55%	3%	12%	44%	9%	11%	C
ヘキサコナゾール	90%	9%	12%	80%	6%	6%	A	EPN	82%	4%	9%	71%	5%	7%	A
フルトラニル	102%	4%	4%	90%	5%	5%	A	プロモプロビレート	70%	3%	8%	59%	8%	10%	B
トリシクラゾール	97%	2%	5%	86%	4%	5%	A	ビベロホス	88%	2%	9%	80%	6%	7%	A
プロチオホス	52%	6%	10%	40%	7%	8%	C	ピコリナフェン	81%	3%	7%	73%	6%	8%	A
メトミノストロピン (E)	100%	2%	3%	91%	4%	4%	A	フェノキシカルブ	86%	3%	13%	89%	4%	6%	A
フルジオキシニル	97%	4%	5%	92%	4%	6%	A	ピフェナゼート	95%	6%	7%	85%	9%	9%	A
プレチラクロール	83%	4%	6%	72%	4%	5%	A	メトキシシクロール	79%	2%	7%	66%	6%	8%	B
イソプロチオラン	91%	4%	4%	82%	5%	5%	A	エトキサゾール	72%	4%	7%	65%	8%	9%	B
プロフェノホス	79%	2%	3%	67%	3%	7%	B	フェンプロバトリン	76%	9%	11%	66%	11%	12%	B
ウニコナゾール p	93%	3%	13%	83%	6%	12%	A	フェンアミド	98%	3%	7%	91%	5%	7%	A
オキサジアゾン	76%	4%	10%	74%	4%	5%	A	インダノファン	88%	9%	9%	82%	4%	7%	A
トリブホス	58%	5%	17%	48%	6%	11%	C	テブフェンピラド	75%	2%	7%	65%	7%	8%	B
チフルザミド	95%	3%	11%	85%	5%	7%	A	アニロホス	91%	8%	8%	83%	7%	7%	A
フラムプロップメチル	92%	3%	7%	92%	4%	5%	A	ピフェノックス	95%	7%	11%	75%	7%	8%	A
ミクロブタニル	94%	2%	5%	90%	4%	5%	A	エトキサゾール代謝物	50%	14%	48%	34%	14%	35%	D
フルシラゾール	92%	3%	8%	89%	5%	6%	A	クロメプロップ	72%	6%	7%	65%	6%	7%	B
ジクロブトラゾール	90%	2%	7%	77%	4%	7%	A	フラメトビル	98%	4%	8%	94%	5%	7%	A
プロブフェン	64%	5%	15%	58%	6%	9%	B	フェノトリン I, II	52%	8%	13%	46%	12%	12%	C
カルボキシ	91%	3%	5%	83%	3%	5%	A	テトラジホス	55%	4%	12%	52%	5%	7%	B
ブピリメート	87%	3%	6%	81%	4%	5%	A	ホサロン	84%	4%	12%	75%	6%	6%	A
オキシフルオアルフェン	75%	9%	15%	72%	6%	8%	A	ペンチキサゾン	79%	3%	9%	72%	5%	6%	A
イミベンコナゾール脱ベンジル体	102%	2%	7%	89%	4%	6%	A	レプトホス	46%	5%	20%	36%	8%	10%	C
アゾコナゾール	95%	1%	4%	91%	3%	4%	A	アジンホスメチル	97%	9%	11%	86%	12%	12%	A
イマザメタベンズメチルエステル I, II	107%	6%	16%	95%	7%	11%	A	シハロトリン I, II	84%	6%	9%	72%	12%	12%	A
クレソキシムメチル	90%	5%	5%	82%	4%	5%	A	ピリプロキシフェン	66%	3%	10%	58%	9%	9%	B
メトミノストロピン (Z)	94%	4%	7%	87%	4%	6%	A	シハロホップブチル	90%	4%	13%	81%	7%	10%	A
クロルフェナビル	77%	5%	16%	78%	7%	7%	A	メフェナセット	93%	4%	8%	85%	6%	7%	A
シフルフェナミド	96%	5%	9%	86%	5%	5%	A	フラメトビル代謝物	84%	4%	9%	74%	8%	11%	A
イソキサチオン	83%	9%	11%	73%	6%	7%	A	アミトラズ	30%	12%	34%	27%	11%	14%	D
シプロコナゾール	96%	3%	6%	87%	6%	6%	A	アクリナトリン	80%	9%	21%	71%	21%	21%	D
フェノキサニル	98%	4%	7%	90%	7%	7%	A	ビラゾホス	92%	3%	7%	81%	7%	8%	A
ニトロフェン	65%	3%	3%	54%	6%	7%	B	フェナリモル	88%	2%	7%	79%	5%	7%	A
ベルタン	59%	2%	10%	50%	8%	9%	C	アジンホスエチル	93%	3%	7%	83%	6%	7%	A
クロルプロビレート(クロルベンジレートと分離不可)	74%	4%	5%	66%	6%	6%	B	ジアリホス	86%	6%	10%	71%	7%	7%	A
クロルチオホス I, II	62%	3%	7%	55%	7%	7%	B	ビラクロホス	93%	4%	8%	82%	6%	7%	A
エンドスルファン (b)	63%	6%	11%	58%	4%	5%	B	フェノキサプロップエチル	82%	3%	8%	76%	6%	6%	A
ピリミノバックメチル (Z)	99%	5%	8%	92%	4%	4%	A	スビロジクロフェン	106%	13%	34%	126%	7%	51%	D
フルフェンビルエチル	100%	5%	5%	90%	6%	6%	A	ビテルタノール I, II	95%	2%	7%	92%	2%	2%	A
フェンシルホチオン	101%	2%	7%	88%	5%	5%	A	ペルメトリン (cis,trans)	49%	4%	12%	46%	7%	10%	C
ジニコナゾール	86%	2%	8%	77%	6%	6%	A	ビリダベン	62%	3%	12%	55%	6%	9%	B
オキサジキシル	100%	2%	4%	97%	3%	4%	A	フルキンコナゾール	88%	3%	7%	84%	4%	5%	A
エチオン	82%	2%	8%	68%	7%	7%	B	オキシシプロコナゾール	99%	3%	7%	97%	4%	8%	A
フルアクリピリム	105%	10%	10%	94%	12%	12%	A	ブタフェナシル	107%	1%	9%	105%	4%	9%	A
メブロニル	95%	9%	10%	85%	10%	10%	A	エトベンザニド	65%	5%	8%	56%	8%	8%	B
スルプロホス	70%	5%	8%	59%	8%	8%	B	カフエンストール	102%	3%	9%	94%	6%	8%	A
トリアゾホス	96%	6%	9%	86%	6%	6%	A	フェンブコナゾール	100%	1%	7%	98%	3%	6%	A
アザメチホス	72%	17%	30%	61%	29%	29%	D	シフルトリン I~IV	79%	1%	9%	71%	8%	10%	A
ペナラキシル	91%	5%	11%	86%	4%	4%	A	シベルメトリン I~IV	74%	5%	12%	65%	9%	11%	B
イソキサジフェンエチル	90%	3%	11%	78%	5%	6%	A	ハルフェンブロックス	54%	4%	13%	39%	11%	13%	C
クロルニトロフェン	65%	4%	12%	47%	7%	8%	C	エトフェンブロックス	51%	2%	13%	46%	8%	11%	C
カルフェントラゾンエチル	94%	3%	4%	87%	5%	6%	A	フルシトリン I, II	91%	3%	11%	83%	8%	9%	A
カルボフェノチオン	65%	3%	15%	55%	8%	10%	B	シラフルオフェン	39%	1%	14%	34%	9%	13%	C
シアノフェンホス	83%	4%	9%	79%	5%	7%	A	フルリド	104%	2%	6%	102%	4%	9%	A
エディフェンホス	93%	6%	8%	83%	8%	8%	A	ビリミジフェン	60%	4%	9%	51%	8%	8%	B
ノルフルラゾン	98%	3%	6%	93%	5%	5%	A	フェンバレート I, II(スフェンバレートを含む)	75%	1%	8%	62%	8%	9%	B
プロビコナゾール I, II	88%	3%	5%	84%	5%	6%	A	フルミオキサジン	90%	5%	12%	89%	5%	7%	A
キノキシフェン	49%	6%	8%	43%	4%	6%	C	フルバリネート-tau I, II	77%	10%	16%	63%	25%	25%	D
エンドスルファンサルフェート	60%	3%	8%	54%	5%	6%	B	ビラクロストロピン	95%	3%	7%	83%	5%	6%	A
トリフロキシストロピン	94%	3%	9%	87%	5%	6%	A	ジフェノコナゾール I, II	90%	2%	7%	88%	4%	6%	A
レナシル	93%	4%	8%	86%	9%	10%	A	インドキサカルブ	94%	3%	9%	98%	3%	5%	A
ピリミノバックメチル (E)	97%	2%	6%	92%	5%	5%	A	デルタメトリン	80%	14%	14%	61%	15%	15%	D

表4 LC-MS/MS対象化合物の妥当性評価結果

作物 添加濃度(µg/g)	ごまの種実						作物 添加濃度(µg/g)	ごまの種実					
	0.01			0.05				0.01			0.05		
妥当性評価項目	真度	併行	室内	真度	併行	室内	妥当性評価項目	真度	併行	室内	真度	併行	室内
Abamectin B1a	62%	14%	55%	80%	8%	35%	D Monolinuron	81%	5%	8%	87%	4%	4%
Acibenzolar-S-methyl	62%	14%	27%	62%	9%	9%	B Naproanilide	77%	7%	7%	80%	4%	4%
Aldicarb	80%	18%	18%	85%	8%	9%	A Novaluron	78%	20%	20%	88%	5%	9%
Aldoxycarb	94%	4%	4%	94%	2%	3%	A Oryzalin	108%	7%	33%	114%	11%	14%
Anilofos	82%	11%	11%	87%	3%	9%	A Oxamyl	89%	3%	9%	92%	1%	2%
Azamethiphos	62%	11%	17%	64%	15%	19%	D Oxaziclomefone	70%	6%	7%	72%	3%	3%
Azinphos-methyl	67%	10%	10%	71%	6%	6%	B Oxyacboxin	31%	32%	70%	30%	34%	64%
Azoxystrobin	106%	13%	15%	103%	9%	12%	A Pencycuron	73%	7%	8%	74%	3%	3%
Bendiocarb	88%	7%	7%	92%	2%	3%	A Pirimicarb	85%	8%	10%	86%	4%	4%
Benzofenap	75%	10%	10%	73%	5%	5%	A Propaquizafop	74%	10%	13%	74%	2%	4%
Boscalid	86%	8%	14%	88%	3%	4%	A Pyraclostrobin	86%	8%	9%	83%	3%	4%
Butafenacil	55%	13%	18%	55%	9%	19%	B Pyrazolynate	22%	19%	94%	23%	41%	70%
Carbaryl	87%	2%	4%	87%	3%	3%	A Pyrifthalid	90%	5%	10%	87%	5%	5%
Carbofuran	132%	5%	7%	135%	4%	5%	B Quizalofop-ethyl	71%	9%	9%	71%	4%	6%
Carpropamid	80%	6%	8%	82%	1%	3%	A Silafluofen	49%	16%	74%	36%	32%	69%
Chloridazon	91%	6%	8%	90%	2%	3%	A Simeconazole	73%	10%	20%	76%	3%	4%
Chloroxuron	85%	29%	41%	91%	6%	7%	D Spinosyn A	88%	7%	12%	93%	4%	13%
Chromafenozide	36%	7%	15%	38%	4%	4%	C Spinosyn D	82%	16%	31%	92%	13%	33%
Clofentezine	51%	5%	8%	55%	4%	4%	B Tebufenozide	51%	7%	10%	50%	3%	5%
Cloquintocet-mexyl	70%	7%	7%	73%	3%	3%	B Tebuthiuron	91%	3%	5%	92%	4%	4%
Clothianidin	89%	3%	3%	89%	5%	7%	A Teflubenzuron	70%	24%	28%	70%	4%	6%
Cumyruuron	85%	6%	7%	91%	3%	3%	A Tetrachlorvinphos	89%	13%	13%	86%	2%	5%
Cyloate	40%	29%	71%	34%	23%	28%	D Thiabendazole	71%	2%	5%	72%	2%	9%
Cyflufenamid	86%	5%	8%	86%	3%	4%	A Thiocloprid	95%	4%	5%	95%	3%	3%
Cyprodinil	58%	8%	18%	55%	6%	8%	A Thiamethoxam	91%	2%	3%	93%	4%	4%
Daimuron	89%	5%	5%	88%	3%	3%	A Thiodicarb	1%	28%	224%			
Diflubenzuron	93%	12%	12%	93%	3%	6%	A Triflumuron	68%	7%	13%	70%	3%	4%
Dimethirimol	66%	14%	17%	67%	5%	6%	B Triconazole	92%	9%	20%	100%	7%	7%
Diuron	85%	6%	7%	85%	2%	4%	A Cymoxanil	90%	7%	7%	85%	3%	4%
Epoxiconazole	77%	8%	8%	86%	3%	4%	A Pyrimethanil	65%	8%	13%	64%	5%	7%
Fenamidon	82%	6%	8%	84%	2%	3%	A Pymetrozine	34%	12%	32%	37%	17%	20%
Fenoxaprop-ethyl	70%	9%	10%	73%	4%	5%	A Ametryn	74%	8%	8%	75%	3%	4%
Fenoxycarb	17%	7%	16%	18%	2%	7%	D Carbetamide	96%	4%	4%	98%	4%	4%
Fenpyroximat Z	68%	10%	11%	71%	2%	6%	B 3-Hydroxycarbofuran	96%	8%	8%	96%	2%	5%
Fenpyroximat E	66%	8%	8%	66%	4%	7%	B Prometryn	70%	11%	11%	71%	5%	5%
Ferimzone E	85%	5%	7%	81%	4%	4%	A Bromacil	80%	6%	7%	82%	2%	3%
Ferimzone Z	67%	13%	13%	78%	9%	9%	B Amitraz	29%	16%	32%	29%	13%	39%
Flufenacet	91%	7%	7%	94%	2%	2%	A Phoxim	78%	5%	9%	79%	2%	3%
Flufenoxuron	79%	8%	8%	76%	2%	2%	A Fenpropimorph	88%	7%	7%	84%	6%	6%
Fluridon	90%	8%	8%	98%	4%	6%	A Cyazofamid	104%	14%	17%	85%	9%	10%
Furametpyr	80%	7%	8%	83%	4%	4%	A Benalaxyl	83%	7%	7%	86%	2%	5%
Furathiocarb	75%	11%	11%	75%	3%	4%	A Flamprop-methyl	89%	7%	7%	95%	4%	4%
Hexaflumuron	86%	29%	38%	83%	5%	5%	D Triflumizole	76%	7%	10%	80%	4%	4%
Hexythiazox	48%	9%	10%	49%	3%	6%	C Clodinafop-propargyl	89%	8%	8%	90%	3%	3%
Imazalil	88%	10%	11%	89%	7%	7%	A Pentoxazone	71%	7%	9%	69%	6%	7%
Imidacloprid	90%	7%	9%	93%	3%	3%	A Etozazole	56%	8%	8%	59%	3%	5%
Indanofan	84%	8%	8%	82%	3%	5%	A Mefenpyr-diethyl	75%	7%	12%	82%	2%	2%
Indoxacarb	86%	6%	18%	91%	5%	6%	A Pyrazophos	79%	9%	9%	79%	3%	5%
Iprovalicarb	94%	7%	9%	96%	4%	4%	A Carbosulfan	27%	0%	141%	5%	0%	157%
Isoxaflutole	64%	13%	16%	63%	12%	18%	B Trifloxystrobin	86%	6%	12%	91%	7%	15%
Linuron	82%	13%	13%	82%	2%	3%	A Benfuracarb	4%	45%	165%	0%	6%	172%
Lufenuron	79%	20%	22%	85%	7%	7%	A Carfentrazone-ethyl	92%	17%	17%	100%	8%	8%
Mepanipyrim	67%	10%	10%	68%	2%	4%	B Oxabtrinil	92%	13%	16%	89%	9%	9%
Methabenzthiazuron	80%	6%	7%	84%	3%	3%	A Triflumizole Metabolite	68%	9%	9%	74%	2%	6%
Methiocarb	83%	5%	5%	84%	3%	3%	A Chlorbufam	79%	19%	22%	75%	8%	8%
Methomyl	155%	8%	8%	160%	2%	3%	C						
Methoxyfenozide	91%	6%	6%	93%	3%	3%	A						

考 察

ごまの種子を対象とし、独自試験法で妥当性評価を実施した結果、GC-MS/MS 対象化合物の 63%、LC-MS/MS 対象化合物で 65%が目標値を満たした。過去に行った野菜・果実²⁾では、GC-MS/MS 対象化合物でほうれんそう 88%、ばれいしょ 86%、だいこん類の根 86%、ゆず 88%、かき 85%であり、LC-MS/MS 対象化合物でほうれんそう 52%、ばれいしょ 58%、だいこん類の根 48%、オレンジ 51%、かき 51%であった。ごまの種子は野菜・果実に比べ、GC-MS/MS 対象化合物では低い傾向であり、LC-MS/MS 対象化合物では高い傾向であった。GC-MS/MS 対象化合物で、低い傾向であった原因としては、ごまの脂質含有量が低い検体であるという特性が影響していると考えられた。また、通知試験法と独自試験法を比較したところ、

顕著な差は見られなかったことから、通知試験法と同等の性能があると考え、今後の検査に使用できると判断した。今後は、豆類についても検討し、検査体制の充実をはかっていきたい。

文 献

- 1) 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)
- 2) 南浦菜奈, 米田正樹, 北岡洋平, 他: 奈良県保健研究センター年報, 54, 43-52 (2019)

奈良県における結核菌の分子疫学調査（2021年）

森村実加・田中慶哉・井上健太郎・井上ゆみ子・内田美枝

Molecular Epidemiological Research of *Mycobacterium tuberculosis* in Nara Prefecture (2021)

Mika MORIMURA・Keiya TANAKA・Kentaro INOUE・Yumiko INOUE and Yoshie UCHIDA

緒言

結核は、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）が減少傾向にあるものの、2020年の新登録結核患者数は12,739人報告されており、我が国の主要な感染症である（厚生労働省：2020年結核登録者情報調査年報集計結果、https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/000175095_00004.html）。奈良県における2020年の新登録結核患者数は133人で前年（186人）より減少した。罹患率は10.0で、前年値（14.0）より減少し、全国値（10.1）と同程度となった。

平成28年に「結核に関する特定感染症予防指針」が改正され、菌が分離された全患者の結核菌株を確保し、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、地方衛生研究所では遺伝子型別手法である Variable numbers of tandem repeats (VNTR) 型別による解析が進められている。奈良県と奈良市は2013年度から結核菌分子疫学調査事業として県内患者由来の結核菌株を収集し、当センターにおいてVNTR型別を実施している。

今回、2021年に当センターへ搬入された結核菌について、VNTR型別を実施した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、2021年に当センターへ搬入された65株のうち、検査過程において非結核菌と同定した1株を除く64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。

2. 方法

1) VNTR 型別

結核菌からのDNA抽出方法は既報¹⁾のとおり。

VNTR型別は、国内標準法として提唱されている Japan Anti-Tuberculosis Association (JATA) (12)-VNTR法²⁾を実施した。PCR条件は既報¹⁾のとおり

とし、得られたPCR産物は、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。

2) 遺伝系統の推定

Setoらの方法に従い、VNTR型別結果のパターンから遺伝系統を推定するMAP (maximum a posteriori estimation)³⁾を利用した。

3) 菌の同定

(JATA)(12)-VNTRすべての領域においてPCR産物の増幅が見られなかった株に関し16S rRNAの遺伝子解析を行い菌種同定した。

結果

1. 検体

結核菌64株の患者年齢階級別および性別菌株数を表1に示す。年齢階級別で見ると、70歳以上が52株(81.3%)あり、高齢者由来の菌株が多かった。また、外国生まれ患者由来菌株は4株(6.3%)あった。

表1 患者年齢階級別および性別菌株数

年齢階級	男性	女性	計
0～19	0	0	0
20～29	2(2)	0	2(2)
30～39	0	0	0
40～49	1	2(2)	3(2)
50～59	1	0	1
60～69	4	2	6
70～79	12	7	19
80～89	12	8	20
90～	8	5	13
計	40(2)	24(2)	64(4)

()は外国生まれ患者株数

2. VNTR 型別

VNTR型別の結果、結核菌64株は58パターン of JATA(12)-VNTR型に分かれ、10株(15.6%)が4クラスターを形成した。

3. 遺伝系統の推定

JATA(12)-VNTR 型から遺伝系統を推定した結果、北京祖先型 39 株(60.9%)、北京新興型 11 株(17.2%)、非北京型 13 株 (20.3%)、型別不明が 1 株 (1.6%) であると推定された (図 1)。

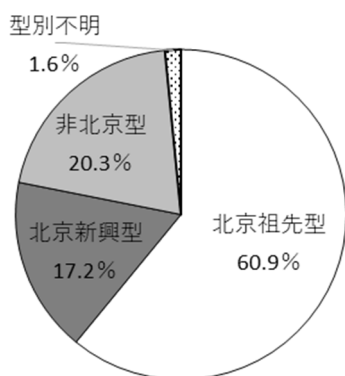


図 1 遺伝系統の推定

北京祖先型、北京新興型、非北京型、型別不明の年齢群別構成割合を図 2 に示す。

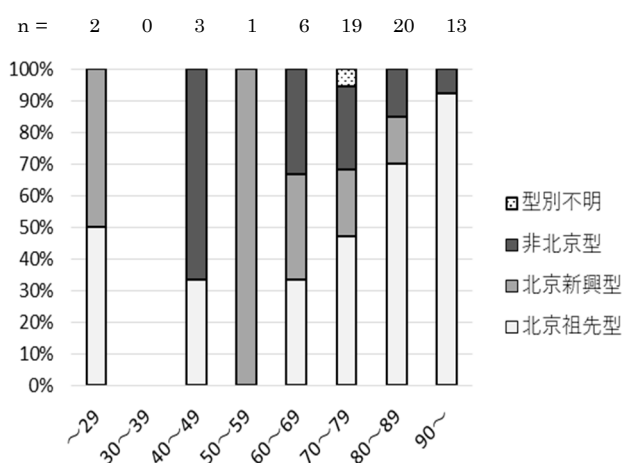


図 2 年齢群別遺伝系統の推定

4. 菌の同定

PCR 産物の増幅が見られなかった 1 株に関し 16S rRNA の遺伝子解析を行った結果 *Mycobacterium avium* と同定した。

考 察

WHO は、2035 年までに世界の結核罹患率の目標を 10 以下とし、日本においても 2021 年に「改訂版ストップ結核ジャパンアクションプラン」が策定され 2025 年までに罹患率を 7 以下にすることを提示した。厚生

労働省は「結核に関する特定感染症予防指針」について、2020 年までに低蔓延国となる罹患率を 10 以下にすることを提示した。奈良県の 2020 年の罹患率は 10.0 であり目標値に到達した。しかし罹患率の減少については、新型コロナウイルスの影響による受診控えおよび保健所業務のひっ迫等による検査数の減少も要因のひとつだと考える。

JATA(12)-VNTR 型が全て一致した菌株群は 4 クラスターあったが、疫学的関連性は認められなかった。JATA(12)-VNTR 法は、疫学的関連性の低い菌株を含むサーベイランス分析において分離できず同一型になる菌株が多く見出されている。これらの菌株をより厳密に異同判定するため、解析領域を比較的解析しやすい 3 領域を追加した JATA(15)-VNTR⁴⁾ を汎用することにより型別分解能が上がると思われる。さらに、クラスター形成株は、追加疫学調査について保健所や主管課と検証していく必要があると思われる。

北京型・非北京型の分類では、北京型株 (78.1%) の検出が多く、全国的な傾向と一致した⁵⁾。

年齢群別では、50 歳以上では年齢群が低くなるにつれて、北京新興型と非北京型の割合が増加した。北京新興型は北京祖先型よりも感染力が強く、クラスターが形成されやすいとされており⁵⁾、また非北京型は、世界の約 7 割を占め、勤労世代の我が国への持ち込みが多いとされている。今後、遺伝系統分布が次第にシフトされ北京新興型および非北京型の割合が高くなると思われる。

50 歳未満では、5 株中 4 株が外国生まれ患者由来菌株で非北京型が 2 株、北京新興型が 1 株、北京祖先型が 1 株であった。2020 年の全国の新登録結核患者における外国生まれの者の割合は 11.1%と年々増加が続いている (厚生労働省：2020 年結核登録者情報調査年報集計結果)。2019 年 4 月より「特定技能」での新たな外国人材の受入れが可能となり、外国人労働者の長期滞在が今後も増加することが予想され、感染拡大のリスクファクターとして危惧されていることから、特にアジアの高蔓延国からの入国前結核スクリーニングおよび入国後の検診やケア等、保健所や関連機関と協力した外国人結核の感染伝播の抑制強化が望まれる。

今回の調査は、若年層 (40 歳未満) および中年層 (40 歳以上 60 歳未満) の VNTR 検査率が少なかった。感染症サーベイランスシステム (NESID) によると、奈良県の 2021 年の結核届出対象のうち、診断方法が、「塗抹検査もしくは分離・同定による病原体の検出」による患者を対象とした VNTR 検査率は 38.1%であった。そのうち 60 歳未満での検査率は 22.2%であり、

60歳以上の検査率は40.7%であったことから、60歳未満での検査率が低いことが示唆された。若年層および中年層の疫学情報を調査することは、今後の動向を予測する手段として重要であるため積極的疫学調査が望まれる。

一方、16S rRNAの遺伝子解析において *M. avium* と同定された菌株は、小川培地上のコロニーがオレンジ色で濃い色調を示し、釣菌した際柔らかい感触であり、コロニー形態が通常と異なった。同定結果については患者所在医療機関を管轄する保健所へ通知済である。

今後も科学的根拠となる分子疫学解析情報を提供するため、県内の結核菌 VNTR 型別データベースを充実させていき、奈良県の結核対策に寄与していきたい。

謝 辞

本報は、奈良県ならびに奈良市結核菌分子疫学調査事業で得られたデータを解析してまとめたものであり、関係機関の皆様に深謝いたします。

文 献

- 1) 辻本真弓, 田邊純子, 橋田みさを, 他: 奈良県保健研究センター年報, 51, 65-66 (2016)
- 2) 前田伸司, 村瀬良朗, 御手洗聡, 他: 結核, 83, 673-678 (2008)
- 3) Seto J, Wada T, Iwamoto T, *et al.*: *Infect. Genet. Evol.*, 35, 82-88 (2015)
- 4) 前田伸司, 和田崇之, 岩本朋忠: 日本細菌学雑誌, 65, 201(2010)
- 5) 岩本朋忠: 結核, 84, 755-759 (2009)

奈良県におけるカルバペネム耐性腸内細菌科細菌の遺伝子検出状況（2021年）

井上健太郎・井ノ上美紅・築山結衣・井上ゆみ子・内田美枝

Detection of the Antimicrobial-Resistant Genes in Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae* Isolated in Nara Prefecture (2021)

Kentaro INOUE・Miku INOUE・Yui TSUKIYAMA・Yumiko INOUE and Yoshie UCHIDA

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。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り、耐性菌の出現は医療上の大きな問題となっている。

CRE感染症は、感染症法の五類全数把握対象疾患に指定されており、2017年3月、厚生労働省通知¹⁾によりCRE感染症として届出のあった菌株は、地方衛生研究所で試験検査を実施するように明記された。そのため、患者から分離された菌株は保健所等の協力により当センターに搬入され、β-ラクタマーゼ産生性及びβ-ラクタマーゼ遺伝子の検査を実施している。

今回、2021年1月から2021年12月に、奈良県でCRE感染症と診断され、搬入された菌株について、検査を実施したので結果をまとめて報告する。

方法

1. 材料

2021年1月から2021年12月までの間に、CRE感染症と診断された患者からの分離菌30株について、検査を実施した。なお、患者情報、菌種等は発生届に基づく。

2. ディスク拡散法によるβ-ラクタマーゼ産生性確認試験

1) メタロ-β-ラクタマーゼ産生性確認試験

ミューラーヒントン寒天培地上に、メロペネム（MEPM）とセフトジジム（CAZ）の薬剤ディスクと、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ディスク（SMA）を配置した。いずれかの薬剤ディスクにおいて、阻止円径の拡張を確認した場合を陽性と判定した^{2,3)}。

2) KPC型カルバペネマーゼ産生性確認試験

当該試験は、国立感染症研究所の病原体検出マニユア

ルの変更に伴い、2021年3月に当センター標準作業書を改訂した。

MEPMとセフメタゾール（CMZ）の薬剤ディスク及びKPC型カルバペネマーゼ活性阻害剤である3-アミノフェニルボロン酸（APB）500μgを添加したMEPMとCMZディスクを使用した。MEPMディスクにおいて、阻止円径の拡張が5mm以上ある場合を陽性と判定した²⁾。

なお、改訂前の2021年2月までは、MEPMとイミペネム（IPM）の薬剤ディスク及びAPB500μgを添加したMEPMとIPMディスクを使用した。いずれかの薬剤ディスクにおいて、阻止円径の拡張が5mm以上ある場合を陽性と判定した³⁾。

3. β-ラクタマーゼ遺伝子型確認試験

PCR法によりカルバペネマーゼ遺伝子^{2,3)}（IMP型、NDM型、KPC型、OXA-48型）、ESBL遺伝子^{4,5)}（TEM型、SHV型、CTX-M-1 group(G)、CTX-M-2 group(G)、CTX-M-9 group(G)）及びAmpC遺伝子⁶⁾（MOX型、CIT型、DHA型、ACC型、EBC型、FOX型）の保有の有無を確認した。

4. 薬剤耐性遺伝子の同定

カルバペネマーゼ遺伝子を検出した菌株については、IMP-1型シーケンス用プライマー^{2,3)}を用い、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Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) 解析により薬剤耐性遺伝子を同定した。

結果

1. 菌株の由来

供試した30株の由来は、性別では、男性16株、女性14株であった。年齢は、70～79歳が最も多く、70歳以上の高齢者が80%を占めた。

検出部位は、血液が10株（33%）と多かった。次いで、尿8株（27%）で、その他は喀痰、腹水などであった。菌種は、*Escherichia coli*が8株（27%）で最も

多く、次いで *Enterobacter cloacae* , *Klebsiella pneumoniae* が各 6 株 (20%) などであった (表)。

2. ディスク拡散法によるβ-ラクタマーゼ産生性確認試験

1) メタロ-β-ラクタマーゼ産生性確認試験

阻止半径の拡張が確認できたのは、18 株 (60%) で、菌種は、*E. coli* が 7 株、*K. pneumoniae* が 5 株、*E. cloacae* が 4 株、*Klebsiella oxytoca* が 2 株であった。

2) KPC 型カルバペネマーゼ産生性確認試験

阻止半径の拡張が 5 mm 以上で陽性と判定したのは、3 株 (10%) で、菌種は、*E. cloacae*、*E. cloacae* complex、*Providencia stuartii* が各 1 株であった。

3. β-ラクタマーゼ遺伝子型確認試験

PCR 法の結果、全 30 株のうち、カルバペネマーゼ遺伝子では、IMP 型遺伝子を 18 株 (60%) 検出した。菌種は、*E. coli* が 7 株、*K. pneumoniae* が 5 株、*E. cloacae* が 4 株、*K. oxytoca* が 2 株であった。

ESBL 遺伝子では、CTX-M-2G を検出した菌株が 17 株、TEM 型を検出した菌株が 7 株、CTX-M-1G 及び CTX-M-9G を検出した菌株が各 4 株、SHV 型を検出した菌株が 3 株あった。なお、ESBL 遺伝子を重複して保有する菌株が 10 株あった。

AmpC 遺伝子では、EBC 型を検出した菌株が 5 株、DHA 型を検出した菌株が 1 株あった。

今回確認したいずれの薬剤耐性遺伝子も検出しなかった菌株が 6 株あった。

4. 薬剤耐性遺伝子の同定

PCR 法で IMP 型遺伝子を検出した 18 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、16 株が *bla*_{IMP-6} と、2 株が *bla*_{IMP-1} と一致した。なお、*bla*_{IMP-1} を検出した 2 株はいずれも *K. oxytoca* であった。

考 察

CRE は、二つに大別される。一つは、カルバペネム系薬剤分解酵素であ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、もう一つはカルバペネマーゼには分類されない AmpC や、ESBL などのβ-ラクタマーゼを産生し、耐性を示す菌である。CPE については、カルバペネマーゼ産生遺伝子がプラスミドの水平伝達により、菌種を超えて拡散する可能性や、他系統の薬剤にも耐性になることが多いため、臨床上重要視されている。

今回の調査では、医療機関で CRE と判定され、発生

表 β-ラクタマーゼ産生性及び遺伝子検査の結果

番号	菌種	ディスク法による確認試験		PCR法による検出遺伝子			シーケンス結果
		MBL	KPC	カルバペネマーゼ	ESBL	AmpC	
1	<i>Escherichia coli</i>	+	-	IMP型	TEM型,CTX-M-1G,CTX-M-2G	-	<i>bla</i> _{IMP-6}
2	<i>Escherichia coli</i>	+	-	IMP型	TEM型,CTX-M-2G	-	<i>bla</i> _{IMP-6}
3	<i>Escherichia coli</i>	+	-	IMP型	TEM型,CTX-M-2G	-	<i>bla</i> _{IMP-6}
4	<i>Escherichia coli</i>	+	-	IMP型	CTX-M-2G,CTX-M-9G	-	<i>bla</i> _{IMP-6}
5	<i>Escherichia coli</i>	+	-	IMP型	CTX-M-2G	-	<i>bla</i> _{IMP-6}
6	<i>Escherichia coli</i>	+	-	IMP型	CTX-M-2G	-	<i>bla</i> _{IMP-6}
7	<i>Escherichia coli</i>	+	-	IMP型	CTX-M-2G	-	<i>bla</i> _{IMP-6}
8	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	CTX-M-1G,CTX-M-2G	-	
9	<i>Enterobacter cloacae</i>	+	-	IMP型	TEM型,CTX-M-2G	-	<i>bla</i> _{IMP-6}
10	<i>Enterobacter cloacae</i>	+	-	IMP型	TEM型,CTX-M-2G	-	<i>bla</i> _{IMP-6}
11	<i>Enterobacter cloacae</i>	+	-	IMP型	CTX-M-2G	EBC型	<i>bla</i> _{IMP-6}
12	<i>Enterobacter cloacae</i>	+	-	IMP型	CTX-M-2G	-	<i>bla</i> _{IMP-6}
13	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	+	-	-	EBC型	
*14	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	-	-	-	EBC型	
15	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	-	IMP型	TEM型,SHV型,CTX-M-1G,CTX-M-2G	DHA型	<i>bla</i> _{IMP-6}
16	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	-	IMP型	SHV型,CTX-M-2G	-	<i>bla</i> _{IMP-6}
17	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	-	IMP型	CTX-M-2G	-	<i>bla</i> _{IMP-6}
18	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	-	IMP型	CTX-M-2G	-	<i>bla</i> _{IMP-6}
19	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	-	IMP型	CTX-M-2G	-	<i>bla</i> _{IMP-6}
20	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	-	TEM型,SHV型,CTX-M-1G,CTX-M-9G	-	
*21	<i>Klebsiella aerogenes</i>	-	-	-	-	-	
22	<i>Klebsiella aerogenes</i>	-	-	-	-	-	
23	<i>Klebsiella aerogenes</i>	-	-	-	-	-	
24	<i>Enterobacter cloacae</i> complex	-	+	-	-	EBC型	
25	<i>Enterobacter cloacae</i> complex	-	-	-	-	EBC型	
26	<i>Klebsiella oxytoca</i>	+	-	IMP型	CTX-M-9G	-	<i>bla</i> _{IMP-1}
27	<i>Klebsiella oxytoca</i>	+	-	IMP型	CTX-M-9G	-	<i>bla</i> _{IMP-1}
28	<i>Serratia marcescens</i>	-	-	-	-	-	
29	<i>Serratia marcescens</i>	-	-	-	-	-	
30	<i>Providencia stuartii</i>	-	+	-	-	-	

MBL: メタロ-β-ラクタマーゼ産生性

KPC: KPC型カルバペネマーゼ産生性

※番号14,21は標準作業書改訂前に実施

届出がされた 30 株のうち、カルバペネマーゼ遺伝子である IMP 型を検出したのは、18 株であり、16 株が *bla*_{IMP-6}、2 株が *bla*_{IMP-1} であった。*bla*_{IMP-6} は、奈良県を含む西日本で多く検出されているカルバペネマーゼ遺伝子⁷⁾であり、IPM に対しては、耐性を示さないことがあるため、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⁸⁾。また、全国で検出され、*E. cloacae* から分離されることが多い *bla*_{IMP-1} は⁹⁾、奈良県内では 2019 年に 1 株の検出例があり⁹⁾、西日本以外から流入が懸念される。今回検出した 2 株の菌種はいずれも *K. oxytoca* であり、代表的な *E. cloacae* と異なることから、他菌種への拡大等を含め、今後注視していく必要がある。

今回の検査結果では、カルバペネマーゼ遺伝子に加え複数の耐性遺伝子を保有する菌株が多く認められた。特に、表の番号 15 の菌株は IMP 型を含め、4 種類の ESBL 遺伝子と AmpC 遺伝子の DHA 型を保有していた。ESBL 遺伝子、及び AmpC 遺伝子はプラスミドを介し様々な菌種に伝播していく可能性がある¹⁰⁾と報告され、複数の耐性遺伝子を獲得した菌株は、多剤耐性傾向を示すため、非常に懸念される。

奈良県の CRE 感染症届出における CPE の割合は、全国の病原体サーベイランス¹¹⁾と比較して高い傾向にある。この原因は不明であるが、*K. aerogenes* など生来薬剤耐性傾向を有し、CPE ではない菌種の届出数の減少による相対的 CPE の増加、及び *bla*_{IMP-1} を有する CPE の他地域からの流入等による CPE の増加が一因と推察される。

CRE の増加は、臨床上、さらに院内感染対策上、重大な問題である。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うと共に、地域の CPE 浸潤状況を監視していく必要がある。

謝 辞

今回の調査を実施するにあたり、菌株を提供して頂きました医療機関、及び保健所の皆様に深く御礼申し上げます。

文 献

- 1) 厚生労働省健康局結核感染症課長通知「カルバペネム耐性腸内細菌科細菌 (CRE) 感染症等に係る試験検査の実施について」、健感発 0328 第 4 号、(平成 29 年 3 月 28 日)
- 2) 国立感染症研究所「病原体検出マニュアル 薬剤耐性菌」(2020 年 6 月)
- 3) 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)

- 4) Xu L, Ensor V, Gossain S, *et al.* : *J. Medical Microbiology*, **54**, 1183-1187 (2005)
- 5) Monstein H, Ostholm-Balkhed A, Nilsson M, *et al.* : *APMIS*, **115**, 1400-1408 (2007)
- 6) 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」(2016 年 9 月)
- 7) 国立感染症研究所薬剤耐性研究センター「令和 3 年度 薬剤耐性菌の検査に関する研修」(2021 年 10 月)
- 8) Shigemoto N, Kuwahara R, Kayama S, *et al.* : *Diagn Microbiol Infect Dis.* , **72**, 109-112 (2012)
- 9) 吉田孝子, 松井恵梨子, 佐伯美由紀, 他 : 奈良県保健研究センター年報 ,**54**, 74-77 (2019)
- 10) 中村竜也 : 臨床と微生物, **42**, 541-552 (2015)
- 11) 国立感染症研究所 : 病原微生物検出情報, **42**, 123-124 (2021)

成人の侵襲性肺炎球菌感染症分離菌株の血清型と薬剤感受性について (2013年～2021年；奈良県)

内田美枝・井上健太郎・井上ゆみ子

Serotype and Drug Susceptibility of Adult Invasive Pneumococcal Disease Isolates,
2013-2021 in Nara Prefecture

Yoshie UCHIDA・Kentarou INOUE and Yumiko INOUE

緒言

ヒト上気道の常在菌である肺炎球菌は、重篤な呼吸器感染症を起こす市中肺炎の主たる起因病原体である。更に、血管内侵入により髄膜炎、菌血症、敗血症などに至った病態である「侵襲性肺炎球菌感染症 (invasive pneumococcal disease : IPD)」は、「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」の改正 (2013年4月) による五類全数把握疾患への追加以降、奈良県内では年間約20～30件発生する。肺炎球菌は、莢膜により分類される血清型が侵襲性病態決定に重要な役割を果たすことが報告され¹⁾、成人に向けては、2014年10月から23価肺炎球菌莢膜多糖体ワクチン (PPSV23) が65歳以上に定期接種されている。

一方、ペニシリン (PCG) 耐性を示す肺炎球菌 (penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* : PRSP) は、世界的課題である薬剤耐性菌への取り組みの一環として、国による薬剤耐性サーベイランスが実施されている。年次ごとに僅かな減少傾向を示すが、成果指標には届かず依然として高い水準を示す。特に髄液分離の PRSP において耐性率が非常に高い²⁾。また、五類定点把握疾患である PRSP 感染症の定点当たり報告数において減少傾向ではあるが、成人患者が占める割合はむしろ増加傾向にある³⁾。

そこで今回、侵襲性病態における肺炎球菌の血清型と薬剤感受性について、2013年4月から2021年12月に入手した成人 IPD 患者由来菌株を用いて年次の解析を実施した。

方法

奈良県内において2013年4月から2021年12月に届出された IPD を対象に、微生物検査室を有する県内9医療機関の協力により、成人 IPD 患者由来の肺炎球菌144株を収集した (表1に解析カバー率を示す)。収集した菌株は国立感染症研究所に送付し、膨潤法による血清型別、および微量拡散法による薬剤感受性試

験が実施された。ワクチン接種記録等の患者情報は、NESID および患者調査票を参考にした。これらは厚生労働科学研究費補助金の新興・再興感染症および予防接種政策推進研究事業として2013年度から2021年度に3期実施された全国10道県における「成人の重症肺炎サーベイランス構築に関する研究」、「成人の侵襲性細菌感染症サーベイランスの構築に関する研究」、「成人の侵襲性細菌感染症サーベイランスの充実化に資する研究」の分担研究の一部として実施した。

表1 成人 (15歳以上) IPD 届出数に対する解析カバー率

年	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021
IPD (>15y)	9	17	21	23	32	27	19	15	13
菌株回収数	3	15	18	16	27	23	17	15	10
解析カバー率	33%	88%	86%	70%	84%	85%	89%	100%	77%

結果

144株の内訳は PPSV23 血清型群 (15種類) 80株、非 PPSV23 血清型群 (以下, others) (15種類) 64株であり、PPSV23 血清型群から others への年次的な置換が認められた (図1, 2)。

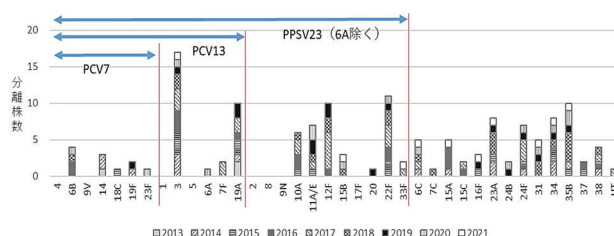


図1 奈良県の成人 IPD 患者由来肺炎球菌の血清型別推移

※両矢印は、ワクチン種類および各カバー血清型範囲を示す

PCV7 : 7 価結合型ワクチン

PCV13 : 13 価肺炎球菌結合型ワクチン

PPSV23 : 23 価肺炎球菌莢膜多糖体ワクチン

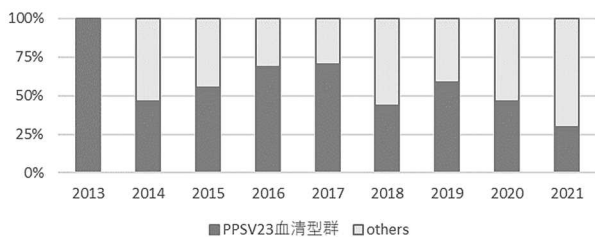


図2 奈良県の成人 IPD 患者由来肺炎球菌の血清型群推移

なお、144 株の PPSV23 接種率は低く、接種歴有りは 16 例 (11%) であった。うち 7 例は PPSV23 血清型群に罹患し、診断後 30 日以内の死亡は 1 例であった。死亡 1 例の罹患は PPSV23 接種後 8 年経過のタイミングであった。others に罹患した 9 例のうち、診断後 30 日以内の死亡は 4 例であった (表 2)。

表 2 PPSV23 接種歴有り 16 例

ワクチン接種	n	ppsv23血清型群に罹患		othersに罹患		
		n	死亡	n	死亡	
有り	<5y	10	4 (40%)	0 (0%)	6 (60%)	3 (50%)
	>=5y	4	3 (75%)	1 (33%)	1 (25%)	0 (0%)
時期不明	2	0 (0%)	0 (0%)	2 (100%)	1 (50%)	

薬剤感受性について、144 株の PCG-MIC 値は <0.015-2 $\mu\text{g/mL}$ であり、0.12 $\mu\text{g/mL}$ 以上を示す PRSP は 37 株 (25.7%) であった (図 3)。PRSP37 株の血清型群比率は、PPSV23 血清型群 (5 種類, 20/94 株 (21%)), others (7 種類, 17/50 株 (34%)) であり、others において耐性化傾向が強かった。MIC 値 2 $\mu\text{g/mL}$ の PCG 強耐性 7 株のうち 5 株が others であり、血清型 6A (主に小児に使用される 13 価肺炎球菌結合型ワクチンに含まれ、PPSV23 には含まれない) も PCG 強耐性であった (図 4)。

PRSP37 株のうち 14 株はセフトキサシム (CTX) に、11 株はメロペネム (MEPM) に対し、CLSI 標準⁴⁾ の中間耐性 (I) または耐性 (R) を認めた。2 剤以上に I または R を認めた 20 株中 12 株は others であった。更に、3 剤全てに I または R を認めた 5 株中 4 株も others であった。PRSP37 株は、その他の系統薬剤に対しても耐性傾向を示し、マクロライド系エリスロマイシン (EM) に対しては 36 株、リンコマイシン系クリンダマイシン (CLDM) に対しては 25 株、ニューキノロン系トスフロキサシン (TFLX) に対しては 25 株で I または R を認め、多剤耐性傾向が確認された。バンコマイシンに対しては全ての株が感性であった。

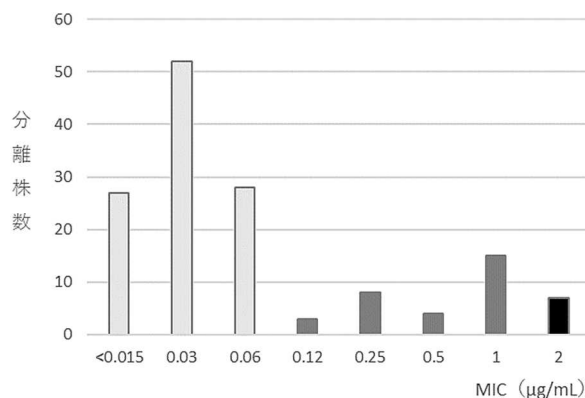


図3 PCG-MIC 値 (144 株)

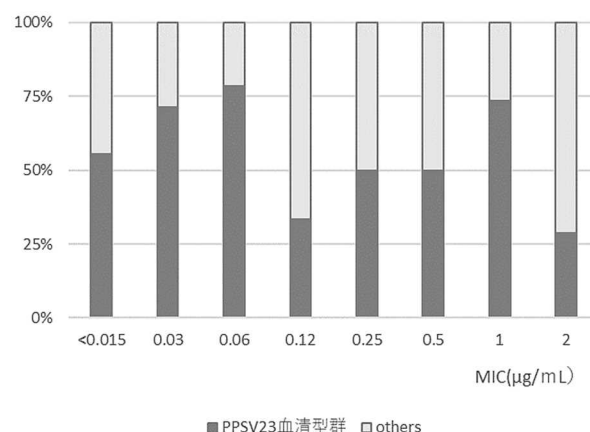


図4 PCG-MIC 各値における血清型群割合

奈良県内で分離率が高い 9 血清型 (3, 22F, 19A, 12F, 35B, 23A, 34, 11A/E, 24F; 下線は others, 以下同様) では、5 血清型 (3, 19A, 35B, 23A, 11A/E) で 25% 以上の高い致死率を認め、4 血清型 (19A, 35B, 23A, 24F) で β -ラクタム系薬に対する感受性の低下を認めた。

血清型 3 は 2014 年から毎年分離され、分離数が最も多かった。診断から 30 日以内の患者死亡率は高く 35% (6/17) であった。一方、PCG-MIC 値は <0.015-0.03 $\mu\text{g/mL}$ であり、CTX および MEPM には全て感性を示した。

血清型 35B は 2015 年より分離され、others で最も分離数が多かった。診断から 30 日以内の患者死亡率は高く 30% (3/10) であった。また、PCG-MIC 値は 0.03-2 $\mu\text{g/mL}$ であり、分離 10 株中 7 株が PRSP であった。うち 6 株は MEPM に I を示し、3 株は CTX を含む 3 剤全てに I または R を示す等、 β -ラクタム系薬に対する耐性傾向を認めた (表 3)。

表 3 奈良県内で分離率が高い 9 血清型の特徴

血清型	3	22F	19A	12F	35B	23A	34	11A/E	24F
n 数	17	11	10	10	10	8	8	7	7
% (対144株)	12%	8%	7%	7%	7%	6%	6%	5%	5%
年齢中央値 (四分位範囲)	74 (69-83)	63 (56-71)	83 (63-91)	71 (68-74)	81 (72-84)	68 (58-76)	68 (50-72)	73 (64-84)	78 (72-80)
死亡率	35%	0%	30%	20%	30%	25%	13%	29%	0%
PCG耐性	0%	0%	60%	0%	70%	100%	0%	0%	14%
CTX耐性	0%	0%	40%	0%	30%	0%	0%	0%	0%
MEPM耐性	0%	0%	0%	0%	60%	0%	0%	0%	0%

考 察

肺炎球菌の莢膜は、血清学的に 90 タイプ以上が報告され、菌のオプソニン化に関与するヒト補体の菌表面への付着を阻害することにより白血球の貪食作用に抵抗性を示し病原性に大きく関与する⁵⁾。肺炎球菌ワクチンは、特に重要な血清型莢膜を抗原として開発され一定の効果を上げているが、成人 IPD 患者由来菌株における PPSV23 血清型カバー率は年次的に低下し、others への置換が報告されている¹⁾。また、血清型置換に加え、PRSP 等の増加による「難治療性 IPD」が懸念される中、奈良県内でも同様の傾向が進行していた。

県内市町村における PPSV23 定期接種率の詳細については不明であるが、IPD 届出における成人の PPSV23 接種率は低く、また、再接種の必要性が認識されていない可能性が危惧された。今回の解析における PPSV23 接種による効果は、基礎疾患のある高齢者の場合においても、接種後 5 年未満であれば、感染予防 60%、重篤化予防 100%であり、効果が期待出来る結果であった。まずは、現行 PPSV23 の 5 年ごとの確実な接種の推進が重要と考える。更には、PCV20 価結合型ワクチン⁶⁾や非莢膜ワクチン等、高い免疫応答や幅広いカバー率が期待されるワクチンへの転換および普及が待たれる。

一方、薬剤耐性菌に対する取り組みは、オニールレポート⁷⁻⁹⁾(薬剤耐性菌による世界中の死者は 2050 年には年間 1 千万人になるとの予測)以降、世界各国でアクションプランが策定され、対策が実施されている。しかし、Murray ら¹⁰⁾は 2019 年の耐性菌関連死は 204 カ国・地域で 127 万人と推計し、当初の想定以上のペースで死者数が増加していると報告した。肺炎球菌は耐性菌関連死の原因菌として、大腸菌、黄色ブドウ球菌、肺炎桿菌について 4 番目に多く、高齢化の進む日本において、薬剤耐性肺炎球菌への取り組みは急務と考える。基礎疾患や加齢による免疫低下状態にあ

る高齢者においては、ワクチンによる免疫効果が望めない場合も多く、抗菌薬の処方最後の砦である。治療に欠かせない抗菌薬の効果を失うことなく、継続して長く使用し続けるためには、患者個々の罹患菌性状を含む、状況に応じた適正適量の抗菌薬の丁寧な選択の連続が大変重要である。今回の解析により、肺炎球菌の莢膜は病原性のみならず、薬剤、特に β -ラクタム系薬に対する耐性獲得の点においても大きく関与している可能性が示唆された。治療薬選択時に「血清型」を参考項目として活用することは、耐性菌抑制の観点からも意義が大きいと考えられる。「血清型」を医療機関において診断・治療に活用可能とするための簡易検査法の開発にも期待したい。

謝 辞

本研究にあたり検体の収集にご協力いただきました関係者ならびに研究班の皆様に深謝いたします。

文 献

- 1) 大石和徳:厚生労働科学研究費補助金研究総括研究報告書 (2020)
- 2) 厚生労働省:院内感染対策サーベイランス (JANIS) 検査部門報告 2008~2017 年公開情報
- 3) 奈良県感染症情報センター:定点把握感染症報告状況 (月報)
- 4) Clinical and Laboratory Standards Institute: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing (M100-ED28)
- 5) IASR : 34, No.3 (No.397), 55-56
- 6) Brandon E, Charu S, Kevin C, *et al.* : *Clin. Infect. Dis. Online ahead of print* (2021, Dec 23)
- 7) O'Neill J :Antimicrobial resistance, Review on Antimicrobial Resistance (2014)
- 8) O'Neill J : Tackling drug-resistant infection globally, Review on Antimicrobial (2016)
- 9) G7 OECD report: Antimicrobial Resistance in G7 Countries and Beyond (2015)
- 10) Christopher JLM, Kevin SI, Fablina S, *et al.* : *Lancet*, 399, 629-655 (2022), doi:10.1016/S0140-6736(21)02724-0

リアルタイム PCR を活用した腸管出血性大腸菌の検査

築山結衣・井ノ上美紅・井上健太郎・田中慶哉・森村実加・井上ゆみ子・内田美枝

Examination of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Using Real-Time PCRYui TSUKIYAMA・Miku INOUE・Kentaro INOUE・Keiya TANAKA・Mika MORIMURA・
Yumiko INOUE and Yoshie UCHIDA

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。菌により汚染された食物の摂取が主な感染源となるが、100 個程度の菌量で感染するため、保育園等ではヒトからヒトへの二次感染による集団感染が起こりやすい。そのため、感染症拡大防止を目的とし、感染症法第 15 条に基づく接触者検査が行政検査として実施される。通常、検査は培養法及び Conventional PCR 法により実施しているが、結果判定までには少なくとも 3 から 4 日を要し、培地作製にも時間と人手を要する。特に大規模事例では、短期間に多数の検体が搬入され、より迅速かつ効率的な検査が必要とされる。

近年、奈良県内の保育園・こども園においても EHEC O157 の集団感染が起こり、1 事例あたり 200 から 300 検体に及ぶ大規模な接触者検査を複数回経験したことをふまえ、令和 2 年度末に検査 SOP を改定し、「リアルタイム PCR 法によるスクリーニング (qPCR スクリーニング)」を導入した。そこで今回、今年度発生した大規模集団感染を含む複数事例における行政検査で qPCR スクリーニングを実施し、その有効性の検証を行うとともに、より効果的な qPCR スクリーニングの活用を目的に検証実験を実施したので、結果をまとめて報告する。

材料と方法

1. 材料

各検証に用いた検体、菌株は以下のとおり。

1) qPCR スクリーニングの有効性の検証

2021 年 4 月から 2021 年 12 月の期間に、保健所より行政検査依頼のあった EHEC O157 を検査対象とした 15 事例 314 検体のうち 8 事例 186 検体について検証した。

2) qPCR スクリーニング活用のための検証実験

CDC 標準株である G5244 株 (O157:H7 (VT1,VT2 保

有)) を用いて、検証実験を実施した。

2. 方法

1) qPCR スクリーニングの有効性の検証

増菌培養にはノボビオシン加 mEC 培地 (NmEC, 栄研化学)、分離培養にはセフィキシム・亜テルル酸加ソルビトールマッコンキー寒天培地 (CT-SMAC, OXOID, 栄研化学) を使用した。qPCR スクリーニングは、CycleavePCR O157 (VT gene) Screening Kit Ver.2.0 (タカラバイオ) を用い、一晚培養した NmEC から DNA 抽出を行い、添付文書に従って実施した。VT 遺伝子陽性であった検体については、NmEC から分離培養を実施し、CT-SMAC 上の EHEC を疑うコロニーについて、生化学性状の確認、血清型別試験、Conventional PCR 法による VT 遺伝子型別を行った。血清型別は、病原大腸菌免疫血清「生研」(デンカ) を使用し、VT 遺伝子型別は、Cebula ら²⁾ のプライマーによる PCR で遺伝子を確認した。

2) qPCR スクリーニング活用のための検証実験

滅菌水に標準菌株を懸濁して、 1.5×10^8 cell/mL の菌液を調製し、この菌液を段階的に希釈した 7 試料 (① 1.5×10^6 cell/mL, ② 1.5×10^5 cell/mL, ③ 1.5×10^4 cell/mL, ④ 1.5×10^3 cell/mL, ⑤ 1.5×10^2 cell/mL, ⑥ 15 cell/mL および⑦ 1.5 cell/mL) を試料菌液とした。

(1) qPCR 検出感度の検証

各試料菌液 100 μ L から DNA 抽出を行い、1) と同様のキットを用いて実施した。

(2) 免疫磁気ビーズ使用の有無による分離培地のコロニー検出感度の検証

試料菌液③から⑥を一白金耳量 (約 10 μ L) 分離培地 (CT-SMAC) に塗抹した。また、試料菌液④から⑥を、免疫磁気ビーズ O157「生研」(デンカ株式会社) を使用し、洗浄集菌後、10 μ L を CT-SMAC に塗抹して、免疫磁気ビーズ使用の有無による分離培地上のコロニーを比較した。なお、免疫磁気ビーズ法は、添付文書に従って実施した。

表1 qPCRのCt値と分離培養の検出数

	Ct値		
	15-29.06	33.66-44.21	増幅なし
qPCR	11	25	150
分離培養	11	0	-

結果

1. qPCRスクリーニングの有効性の検証

qPCR法でVT遺伝子増幅が認められた検体は、186検体中36検体であった。36検体について分離培養を実施した結果、Ct値33.66以上の25検体については、EHEC陰性であった。Ct値が29.06以下の11検体については、生化学性状の確認、血清型別、VT遺伝子型別を行った結果、EHEC O157 VT1VT2陽性が9検体、EHEC O157 VT2陽性が2検体であった(表1)。

qPCRスクリーニングの導入により、VT遺伝子増幅が認められなかった150検体については、検査開始後2日で陰性が確定し、qPCR導入前に比べ1日早く行政検査結果を通知することができた。また、Ct値29.06以下の11検体については、強く陽性が疑われる検体として、その後の分離培養を慎重かつ確実に実施することができた。一方、Ct値33.66以上については、増菌液を直接分離培地に塗抹する従来法では菌を分離することは困難であった。

2. qPCRスクリーニング活用のための検証実験

Ct値33.66以上の検体の取り扱いを検討するために実施した検証実験の結果、各試料菌液のqPCRのCt値は、試料菌液①25.76、試料菌液②28.44、試料菌液③31.13、試料菌液④34.03、試料菌液⑤37.27であり、試料菌液⑥及び⑦は増幅シグナルを検出できなかった。分離培養後のCT-SMAC上のコロニーは、免疫磁気ビーズ使用なしでは試料菌液③にのみ14個のコロニー

が認められた。免疫磁気ビーズを使用した場合、試料菌液④は16個、試料菌液⑤は2個のコロニーが認められ、試料菌液⑥はコロニーが認められなかった(表2)。

考察

今回のqPCR検証実験の結果より、Ct値がおおよそ34以上の試料菌液では、分離培養時に免疫磁気ビーズを使用することによりCt値37付近までコロニー検出が可能であることが判明した。

ところで、理論上Ct値35以上は、標的DNAのコピー数が10程度と非常に少なく、試験ごとの誤差範囲が大きいことから、検査精度上の問題が生じる。また、実検体でqPCRスクリーニングを行う際は一晚培養した増菌液よりDNA抽出を行うため、Ct値35以上は増菌液中のDNA量が非常に少ないことを示し、培養前の実検体中のDNA量はさらに少なく、菌量が少ないと考えられる。以上のことから、Ct値35以上については、EHEC陰性としての取り扱いが妥当と思われた。Ct値おおよそ34については、免疫磁気ビーズの使用により分離培地上に10コロニー以上認められたことから、感染拡大防止の観点からも免疫磁気ビーズ法の追加により、菌の分離率を上げることが望ましいと考える。ただし、今回の検証は夾雑物を含まないEHECのみを含む菌液での実験であるため、今後は実検体を用いた検討が必要である。

qPCR法によるスクリーニングは、一度に多検体の検査が可能であり、VT遺伝子陰性のものはEHEC陰性と判定することで陽性疑いの検体に注力できるため、検体数の多い場合には迅速かつ効率的な検査法として有効である。また陰性検体については、従来法より検査日数が1日短くなるため、早期に結果判定をすることが可能である。

表2 qPCRのCt値及び分離培地上のコロニー数

菌液濃度 (cell/mL)	Ct値	コロニー数	
		ビーズ使用なし	ビーズ使用あり
①1.5×10 ⁶	25.76	NT	NT
②1.5×10 ⁵	28.44	NT	NT
③1.5×10 ⁴	31.13	14	NT
④1.5×10 ³	34.03	0	16
⑤1.5×10 ²	37.27	0	2
⑥1.5×10	増幅なし	0	0
⑦1.5	増幅なし	NT	NT

NT: Not Tested

さらに今回の検証により、qPCR 法で陰性判定をするだけでなく、Ct 値の結果を検査に活用することができると考える。Ct 値おおよそ 30 以下については増菌液を直接分離培地に塗抹する従来法で菌を分離し、Ct 値おおよそ 30 から 35 未満については、事例により免疫磁気ビーズを使用して菌の分離率を上げる方法が望ましいと考える。Ct 値 35 以上については、増菌培養後の菌量が非常に少なく、検査精度上の誤差が大きいことから、EHEC 陰性と判定することが妥当と考える。

qPCR の結果を活用することで、効率的に検査を行うことができるので、今後もデータを蓄積し、さらに検証を行っていきたい。

文 献

- 1) 国立感染症研究所: 病原微生物検出情報, 42, 88 (2021)
- 2) Cebula TA, Payne WL, Feng P, *et al.*: *J. Clin. Microbiol.*, 33, 248-250 (1995)

当センターにおける新型コロナウイルス全ゲノム解析 (2021年6月~2022年3月)

松浦侑輝・千葉翔子・美並衣織・中野 守・米田正樹・山崎聖子

Analysis of Whole Genome Sequence of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2
(SARS-CoV-2) in Nara Prefectural Institute of Health

Yuki MATSUURA・Shoko CHIBA・Iori MINAMI・Mamoru NAKANO・Masaki YONEDA and
Seiko YAMAZAKI

緒言

2019年12月に中国で初めて確認された Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) 感染症は、短期間に世界中で広がり、国内では2020年1月14日¹⁾に、奈良県では同年1月28日に初めて患者が確認され、3月11日には世界保健機関(WHO)によりパンデミック状態にあると発表された。

SARS-CoV-2 は新たな遺伝子変異をもつことによってその性質を変化させ続けており²⁾、次世代シーケンサー(NGS)によって得られる全ゲノム配列データは全世界で共有され、抗原性の評価³⁾やワクチンの性能評価⁴⁾等に活用されている。

現在、厚生労働省から各自治体に対し、自治体主体のゲノム解析のさらなる推進のため、ゲノム解析の体制強化や、解析結果の共有と活用の体制等の整備が要請されている。当センターにおいても、国立感染症研究所病原体ゲノム解析センターの解析支援のもと、全ゲノム解析の体制整備を行い、変異ウイルスの発生動向を監視している。

本稿では、当センターにおいて検出された SARS-CoV-2 のゲノム解析による流行ウイルスの系統および変異ウイルスの動向についての解析結果を報告する。

なお、本報告では、当センターに搬入された検体で、全塩基配列の解読が可能であった検体のみを取り扱っているため、奈良県全体の傾向を反映しているわけではないことに留意されたい。

対象と方法

1. 調査対象

2021年6月から2022年3月の間にリアルタイムPCR法による新型コロナウイルス行政検査において陽性となった患者検体(鼻咽頭ぬぐい液、唾液等)のうち、得られた Ct (Threshold Cycle) 値を指標として

選定した681検体を対象とした。

2. 試薬等

臨床検体からのウイルスRNA抽出には、QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)、Maxwell RSC Viral Total Nucleic Acid Purification Kit (Promega) を用いた。

NGSのライブラリーは、国立感染症研究所病原体検出マニュアルに記載されている、新型コロナウイルスのゲノム解析プロトコル⁵⁾に従って作成し、MinION (Oxford NANOPORE Technologies) を使用してデータを取得した。

得られた全長塩基配列を用いて、WHOのSARS-CoV-2に関する世界で共通の系統分類方法である Centre for Genomic Pathogen Surveillance が作成したソフトウェア Phylogenetic Assignment of Named Global Outbreak Lineages (Pangolin) により系統分類 (pango lineage) を行った。Pangolin のバージョンは、version 4.0.5, lineage version 2022-04-09 を使用した。また、pangolin によって決定された pango lineage をもとに、WHO label (<https://www.who.int/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants>) を判定した。

全国の検出状況については、GISAID 登録データを基にした解析ツールである cov SPECTRUM (<https://cov-spectrum.ethz.ch/>) を参照した。

結果

解析を行った検体の内、全長塩基配列の決定が可能であったのは326検体であり、355検体で全長塩基配列が決定出来なかった。全長塩基配列を決定できた検体の採取月別の内訳は、2021年6月が34検体、7月が27検体、8月が67検体、9月が48検体、10月が8検体、11月が1検体、12月が11検体、2022年1月が50検体、2月が45検体、3月が35検体であった。

表 採取月別系統分類

Pango lineage	WHO label	2021年						2022年			合計	
		6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月		3月
B.1.1.7	Alpha	34	27	9								70
AY.29	Delta			58	46	7	1	4				116
AY.29.1	Delta				2	1						3
AY.29.2	Delta								2			2
BA.1	Omicron							4	1			5
BA.1.1	Omicron							1		3	1	5
BA.1.1.1	Omicron							1	26	9	13	49
BA.1.1.2	Omicron							1	21	33	18	73
BA.2.3	Omicron										3	3
	計	34	27	67	48	8	1	11	50	45	35	326

WHO label, pango lineage による分類を採取月別に表に示した。全塩基配列の解読が可能であった 326 検体のうち、アルファ株が 70 例、デルタ株が 121 例、オミクロン株が 135 例であった。

アルファ株に分類された変異株については、調査期間中に検出されたものはすべて B.1.1.7 系統に分類された。

デルタ株に分類された変異株については、調査期間中、B.1.617.2 系統に分類された変異株はなかったが、B.1.617.2 系統から派生した AY.29 (B.1.617.2.29) 系統に分類された変異株が 116 例あった。また、AY.29 系統より派生した AY.29.1 系統に分類された変異株が 3 例、AY.29.2 系統に分類された変異株が 2 例あった。

オミクロン株については、調査期間中、B.1.1.529 に分類された変異株はなかったが、B.1.1.529 系統から派生した系統である BA.1 (B.1.1.529.1) 系統に分類された変異株が 5 例あった。また、BA.1 系統の派生である BA.1.1 系統に分類された変異株が 5 例、さらに BA.1.1 系統から派生した BA.1.1.1 系統に分類された変異株が 49 例、BA.1.1.2 系統に分類された変異株が 73 例あった。また、B.1.1.529 系統から派生した BA.2 (B.1.1.529.2) 系統に分類された変異株はなかったものの、BA.2 系統から派生した BA.2.3 系統に分類された変異株が 3 例あった。

考 察

1. 全長塩基配列の決定

全ゲノム解析を行った検体のうち、半数以上の検体で、全長塩基配列を決定出来なかった。全長塩基配列を決定出来た検体と出来なかった検体を比較すると、リアルタイム PCR の Ct 値が小さい検体の方が、Ct 値が大きい検体よりも、全長塩基配列が得られやすい傾向が見られたが、明確な境界となる Ct 値を決定することは出来なかった。

2. 変異株検出数の全体的な変遷

奈良県の報告月別新規感染者数と分類された変異株の採取月別検出数を図に示した。

第 4 波と第 5 波のピークの間である 2021 年 6 月、7 月について見ると、当センターで解析した検体から検出された変異株のすべてがアルファ株であり、デルタ株の増加した 8 月にも検出が続いていたことから、第 4 波のピークである 5 月が過ぎた後も、アルファ株が存在し続けていたことが分かる。

8 月、9 月には、県内の新規感染者報告数の急激な増加とともにアルファ株の割合が減少、デルタ株の割合が急増し、アルファ株からデルタ株への急速な入れ替わりが生じて、第 5 波のピークが形成された。

その後、10 月から 12 月上旬にかけて新規感染者報告数は減少し続け、12 月中旬には、新規感染者がほとんど報告されない時期があった。その間、当センターで解析可能であった検体から検出された変異株は、すべてデルタ株であった。12 月下旬には奈良県で初のオミクロン株が検出され、新規感染者報告数の急増とともに、オミクロン株の検出割合が急増した。以上のことから、デルタ株の検出割合の減少は、オミクロン株の増加によって置き換わりが生じたことが原因ではなく、別の要因によるものであると考えられる。

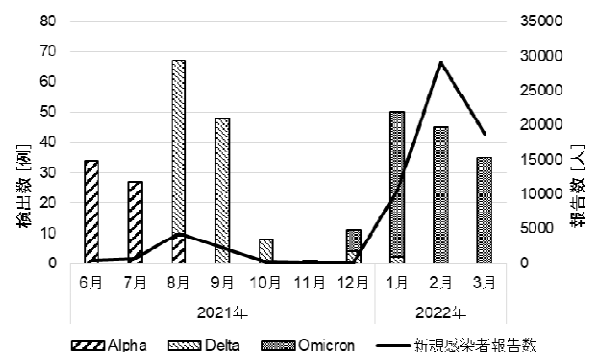


図 奈良県の新規感染者報告数と変異株検出数

3. アルファ株

B.1.1.7 系統の変異株は、全国では 5 月に検出報告数がピークとなった後、10 月上旬を最後に検出報告数は 0 例となっており、当センターでの検出も全国の検出状況と同様の傾向が見られた。

B.1.1.7 系統の変異株は、2020 年 11 月にイギリスで報告されて以降、全世界に感染が広がっており、2020 年の 12 月には関西地方に B.1.1.7 系統の変異株感染者が存在していたことが示唆されている⁶⁾。奈良県でも、国立感染症研究所へ依頼した全ゲノム解析の結果より、2021 年 3 月にはすでに奈良県に B.1.1.7 系統の変異株が存在していたことが分かっており、アルファ株からデルタ株への置き換わりが進んで検出がなくなった 2021 年 9 月までの 6 ヶ月以上の間、B.1.1.7 系統の変異株は大きな変異を生じることなく存在し続けていたと考えられる。

4. デルタ株

AY.29 系統の変異株は、全国では 5 月に検出が報告された後、8 月にピークを迎えており、当センターでの検出は全国の検出状況よりも遅れがあった。AY.29.1 系統の変異株は、全国では 7 月頃から報告数が増加し、8 月にピークを迎えており、当センターでの検出は全国の検出状況よりも少し遅れがあった。AY.29.2 系統の変異株は、全国では 8 月頃から報告数が増加した後、9 月と 12 月に二度のピークがあり、当センターでの検出は全国の検出状況の二度目のピークを少し過ぎた時期であった。いずれの系統の変異株についても、検出状況に遅れはあるものの、全国の傾向と大きな差は見られなかった。

AY.29 系統とその派生系統の変異株は、日本では一部の地域を除いた全国で検出が報告がされている一方で、他国での検出報告がほとんどないため、日本国内で伝播する中で、奈良県にも流入、感染が広がった可能性が高いと考えられる。

5. オミクロン株

BA.1 系統の変異株の全国の検出は 12 月頃からであり、奈良県の検出状況は全国に比べて大きな遅れはなかった。BA.1.1, BA.1.1.1 系統の変異株についてみると、全国でもそれぞれ 2021 年 12 月頃、2022 年 1 月頃から検出されており、いずれも全国の検出報告と同じ傾向が見られた。BA.2.3 系統の変異株は、全国では 2 月頃から報告数が増加しており、検出時期に遅れはあるものの、全国と同様の傾向が見られた。

BA.2.3 系統の変異株は、世界各国で検出が報告されており、日本においては、BA.2 系統の亜系統の中で BA.2 系統に次いで二番目に多く検出されている。

まとめ

全ゲノム解析によって判明した変異株の系統の変遷から、デルタ株、オミクロン株は初検出後に新規感染者の報告数が急増しており、新たな変異株の流入は感染拡大の引き金になる可能性が示唆された。新たな変異株の流入・新規変異株の出現を早期探知し、感染拡大の予兆を捉えて適切な対策につなげるために、新型コロナウイルスの NGS を用いた全ゲノム解析を継続し、調査を続ける必要があると考えられる。

一方で、全ゲノム解析には一定の時間を要するため、解析数に限界があり、流行時の県内の新規感染者に対する解析可能数の確保が喫緊の課題である。そのため、2022 年 3 月に当センターに配備された iSeq100 を用いた全ゲノム解析の効率化・迅速化について検討し、検査態勢の強化が急務である。

また、NGS を用いた全ゲノム解析には、検体中に十分な量の全長 RNA が必要であり、含まれる全長 RNA が少量の検体では全長塩基配列の確定に至らない場合があるため、解析に適した検体の選択も重要な課題の一つである。長期的な検査の実施のためには、適切な検体の選別方法についても検討の余地があると考えられる。

謝辞

SARS-CoV-2 のゲノム解析支援をして頂きました国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センターの諸先生方に深謝いたします。

新型コロナウイルス感染症に対する積極的疫学調査において検体採取を担当された医療機関の諸先生方、保健所等の関係各位にお礼申し上げます。

文献

- 1) 国立感染症研究所: 病原微生物検出情報, 41, 82-84 (2020)
- 2) Steven A. Kemp, Dami A. Collier, *et al.*: *nature* 592, 277-282 (2021)
- 3) Qianqian Li, Jiajing Wu, Jianhui Nie, *et al.* : *Cell*, 182, 5, 3, 1284-1294 (2020)
- 4) Yetian Dong, Tong Dai, Bin Wang, *et al.* : *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6, 387 (2021)
- 5) 国立感染症研究所「新型コロナウイルスゲノム解析マニュアル」(2022 年 2 月版)
- 6) 国立感染症研究所: 病原微生物検出状況, 42, 137-139 (2021)

感染症発生動向調査による患者発生状況：令和3年（2021年）

千葉翔子・松浦侑輝・中野 守・美並衣織・米田正樹・山崎聖子

Status of Infection Diseases in Nara Prefecture, 2021

Shoko CHIBA・Yuki MATSUURA・Mamoru NAKANO・Iori MINAMI・Masaki YONEDA
and Seiko YAMAZAKI

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確に提供・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。

令和3年には、マラリア、アメーバ赤痢及び百日咳について病原体の新たな検出方法が薬事承認されたこと等による届出基準の改正があった。また、急性弛緩性麻痺（急性灰白髄炎を除く。）では、届出様式に検査の実施状況の記載欄が追加された。さらに、新型コロナウイルス感染症は、指定感染症から新型インフルエンザ等感染症に変更された。その他、県内では12月末に内吉野保健所が吉野保健所に統合された。

今回、本県の令和3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117医療機関）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。

令和3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。また、新型コロナウイルス感染症については「新型コロナウイルス感染症に関する報道資料の一覧」（奈良県防災統括室：<https://www.pref.nara.jp/55062.htm>）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

令和3年の全数把握対象疾患の患者届出はのべ434件であった（表1）。なお、現時点（2022年5月時点）では速報値であり、後日変更されることがある。

類別	疾患名	届出数
二類	結核	173
三類	腸管出血性大腸菌感染症	46
四類	日本紅斑熱	1
	レジオネラ症	20
五類	アメーバ赤痢	7
	ウイルス性肝炎	1
	カルバペネム耐性腸内細菌科細菌感染症	29
	急性弛緩性麻痺	2
	急性脳炎	1
	劇症型溶血性レンサ球菌感染症	8
	後天性免疫不全症候群	5
	侵襲性インフルエンザ菌感染症	1
	侵襲性肺炎球菌感染症	18
	水痘（入院例）	5
	梅毒	56
	破傷風	1
	バンコマイシン耐性腸球菌感染症	3
	百日咳	2
	麻しん	1
	新型インフルエンザ等	
	新型コロナウイルス感染症	13953

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

結核は173例の届出があり、2020年の202例から減少した。類型は、患者124例、疑似症患者2例、無症状病原体保有者46例、感染者死亡者の死体1例で

あった。患者の病型は、肺結核が 80 例、その他の結核（結核性胸膜炎、結核性髄膜炎、リンパ節結核、粟粒結核等）が 35 例、肺結核及びその他の結核が 9 例であった。全届出の年齢階層は、0 歳 4 例、1～9 歳 0 例、10～19 歳 1 例、20～29 歳 10 例、30～39 歳 9 例、40～49 歳 5 例、50～59 歳 6 例、60～69 歳 22 例、70～79 歳 50 例、80～89 歳 45 例、90～99 歳 21 例で、70 歳以上が全体の 67.1%を占めており、過去 10 年で 70 歳以上の占める割合は最も高くなった。

3) 三類感染症

腸管出血性大腸菌感染症は 46 例の届出があり、2020 年の 52 例から減少した。類型は、患者 32 例、無症状病原体保有者が 14 例で、その年齢階層は、0～9 歳 26 例、10～19 歳 3 例、20～29 歳 3 例、30～39 歳 7 例、40～49 歳 2 例、50～59 歳 3 例、70～79 歳 1 例、80～89 歳 1 例であった。なお、溶血性尿毒症症候群 (HUS) は 4 例であった。血清群・検出病原体は、O157 が 41 例 (VT1 が 1 例、VT1&VT2 が 29 例、VT2 が 10 例、VT 不明 1 例)、O21 が 1 例 (VT1)、O 115 が 1 例 (VT1)、O165 が 1 例 (VT1&VT2)、O 群判別不能が 2 例 (VT2 が 1 例、VT 不明が 1 例) であった。推定感染経路は、経口感染が 10 例、接触感染が 21 例 (3 例経口感染と重複)、動物・蚊・昆虫等からの感染 1 例、不明が 17 例であった。経口感染が推定されている事例には、羊肉の生食や牛の心臓の生食といった生肉を喫食した記載のある事例が含まれていた。

4) 四類感染症

日本紅斑熱 1 例、レジオネラ症 20 例の届出があった。

日本紅斑熱は、4 月に 1 例の届出があった。60 代男性で、ペア血清での抗体陽転により届出がなされた。マダニによる刺し口があり、発熱、発疹、肝機能異常を呈しており、推定感染地域は、県内とされている。

レジオネラ症は、20 例の届出があり、2020 年の 25 例から減少した。病型は全例、肺炎型であり、男性 14 例 (50～59 歳 2 例、60～69 歳 5 例、70～79 歳 5 例、80～89 歳 2 例)、女性 6 例 (70～79 歳 3 例、80～89 歳 1 例、90～99 歳 2 例) であった。推定感染経路は水系感染が 8 例、塵埃感染が 1 例、不明が 11 例であった。

5) 五類感染症

アメーバ赤痢 7 例、ウイルス性肝炎 (E 型肝炎及び A 型肝炎を除く) 1 例、カルバペネム耐性腸内細菌科細菌感染症 29 例、急性弛緩性麻痺 (急性灰白髄炎を除く) 2 例、急性脳炎 (ウエストナイル脳炎、西部ウマ脳炎、ダニ媒介脳炎、東部ウマ脳炎、日本脳炎、ベ

ネズエラウマ脳炎及びリフトバレー熱を除く) 1 例、劇症型溶血性レンサ球菌感染症 8 例、後天性免疫不全症候群 5 例、侵襲性インフルエンザ菌感染症 1 例、侵襲性肺炎球菌感染症 18 例、水痘 (入院例に限る) 5 例、梅毒 56 例、破傷風 1 例、バンコマイシン耐性腸球菌感染症 3 例、百日咳 2 例、麻しん 1 例の届出があった。

アメーバ赤痢は 7 例の届出があり、男性 5 例 (50～59 歳 3 例、60～69 歳 1 例、70～79 歳 1 例)、女性 2 例 (30～39 歳 1 例、60～69 歳 1 例) であった。病型は、腸管アメーバ症 6 例、腸管外アメーバ症 1 例であった。推定感染経路は経口感染 1 例、性的接触 (同性間) 1 例、性的接触 (異性間) 1 例、性的接触 (同性・異性間) 1 例、不明が 3 例であった。推定感染地域は、経口感染の 1 例がフィリピンで、奈良県 2 例、県外 1 例、不明 3 例であった。

ウイルス性肝炎は、60 歳代女性 1 例の届出があり、サイトメガロウイルス IgM 抗体検査の結果により届出された。

カルバペネム耐性腸内細菌科細菌感染症は 29 例の届出があり、男性 15 例 (40～49 歳 1 例、50～59 歳 1 例、60～69 歳 1 例、70～79 歳 6 例、80～89 歳 6 例)、女性 14 例 (20～29 歳 1 例、60～69 歳 1 例、70～79 歳 4 例、80～89 歳 3 例、90～99 歳 5 例) であった。年齢は 60 歳以上が多く、全体の約 9 割を占めた。病原体検出検体は、血液 10 例、腹水 1 例、髄液 1 例、胆汁 4 例、喀痰 5 例、尿 7 例、その他 2 例であった (重複有り)。分離された菌種は、*Enterobacter cloacae* 7 株、*Klebsiella pneumoniae* 6 株、*Escherichia coli* 5 株、*Enterobacter cloacae complex* 2 株、*Klebsiella oxytoca* 2 株、*Serratia marcescens* 2 株、*Klebsiella aerogenes* 2 株、*Providencia stuartii* 1 株であった。推定感染経路は以前からの保菌が 8 例、中心静脈カテーテル 2 例、尿路カテーテル 6 例、その他医療器具 1 例、手術部位 (手術手技) が 2 例、その他 3 例、不明 7 例であった。

急性弛緩性麻痺は 7 月に 3 歳女児、9 月に 2 歳女児の 2 例の届出があった。両事例とも感染原因・経路は不明であり、ポリオウイルスは検出されなかった。

急性脳炎は、1 月に 70 代男性 1 例の届出があり、原因病原体は不明であった。

劇症型溶血性レンサ球菌感染症は 8 例の届出があり、男性 3 例 (70～79 歳 2 例、90～99 歳 1 例)、女性 5 例 (70～79 歳 1 例、80～89 歳 1 例、90～99 歳 3 例) であった。血清群は B 群 2 例、G 群 3 例、不明 3 例であり、推定感染経路は創傷感染 6 例、その他 (胸部ス

テント) 1例, 不明 1例であった。

後天性免疫不全症候群は男性 5例 (20~29歳 1例, 30~39歳 2例, 50~59歳 2例) の届出があり, うち 1例は梅毒の合併があった。病型は無症候性キャリア 3例, その他 2例 (アメーバ赤痢肝膿瘍疑い 1例, 急性 HIV 感染症 1例) であり, 推定感染経路は性行為感染 (同性間・異性間性的接触) 2例, 不明 3例であった。

侵襲性インフルエンザ菌感染症は 80代男性 1例の届出があり, 発症当日に死亡している。また, ワクチン接種歴は不明であった。

侵襲性肺炎球菌感染症は 18例の届出があり, 男性 12例, 女性 6例であった。年齢階層は, 0~1歳 5例, 50~59歳 2例, 60~69歳 2例, 70~79歳 3例, 80~89歳 5例, 90~99歳 1名であった。ワクチン接種歴は, 1歳以下では 3回以上接種しており, その他の年齢ではワクチン接種歴有り 1例, 接種歴無し 8例, 不明 4例であった。

水痘 (入院例) は 5例の届出があり, 男性 4例 (20~29歳 2例, 30~39歳 1例, 80~89歳 1例), 女性 1例 (10~19歳 1例) であった。病型は全て検査診断例であり, ワクチン接種歴は無し 1例, 不明が 4例であった。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 1例, 不明 3例であった。

梅毒は 56例の届出があり, 2020年の 41例より増加した。男性 36例 (20~29歳 10例, 30~39歳 7例, 40~49歳 12例, 50~59歳 5例, 60~69歳 1例, 70~79歳 1例), 女性 20例 (10~19歳 1例, 20~29歳 12例, 30~39歳 4例, 40~49歳 1例, 50~59歳 1例, 90~99歳 1例) であった。患者の病型は, 早期顕症梅毒 35例 (I期: 男性 15例, 女性 5例, II期: 男性 9例, 女性 6例), 晩期顕症梅毒 1例 (男性), 無症候 (無症状病原体保有者) 20例 (男性 11例, 女性 9例) であり, 無症候のうち男性 1例は, HIV 感染症の合併があった。感染経路は性的接触が 51例 (性交 41例, 経口 10例, 同性間 6例, 異性間 34例, 不明 5例 (重複を含む)), その他 1例, 不明 5例であり, 性的接触 (同性間) は全例男性であった。また, 性風俗産業の従事歴 (直近 6か月以内) があった事例は 7例あり, 性風俗産業の利用歴 (直近 6か月以内) があった事例は 20例であった。推定感染地域は, 奈良県が 16例, 奈良県以外 (都道府県不明, 海外を含む) が 24例, 不明は 16例であった。

破傷風は 80代女性 1例の届出があった。推定感染経路は猫のひっかき傷による創傷感染であり, 筋肉のこわばり, 開口障害, 嚥下障害, 発語障害の症状によ

る臨床診断であった。ワクチン接種歴は不明であった。

バンコマイシン耐性腸球菌感染症は 3例の届出があり, 男性 1例, 女性 2例であり, 全て 80代であった。病原体検出部位は, 血液 1例, 尿 2例であり, 菌種は全て *Enterococcus faecium* であった。推定感染原因・経路は, 前医からの持ち込み感染 1例, 不明 2例であった。

百日咳は女性 2例の届出があり, 2020年の 9例より減少した。推定感染原因・経路は 10歳未満 1例で家族内感染 (不明), 80代 1例で家族内感染 (ひ孫) であった。ワクチン接種歴は, 10歳未満 1例は未接種の記載があり, 他は不明であった。

麻しんは 11月に 90代男性 1例の届出があり, 病型は修飾麻しん (検査診断例) で, ワクチン接種歴は不明であった。推定感染経路は飛沫感染で, 推定感染地域は奈良県であった。

6) 新型コロナウイルス等感染症

新型コロナウイルス感染症は 13953例あり, 男性 7386例, 女性 6566例, 不明 1例であった。その年齢階層は, 0~9歳 959例, 10~19歳 1682例, 20~29歳 2818例, 30~39歳 1861例, 40~49歳 2213例, 50~59歳 2038例, 60~69歳 1029例, 70~79歳 766例, 80~89歳 430例, 90~99歳 152例, 100歳以上 5例であった (図 1)。最も感染者数の多かった月は 8月で, 4339例であった (図 2)。

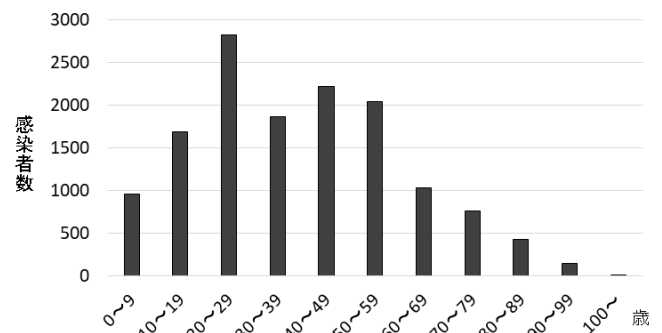


図 1 年齢別新型コロナウイルス感染者数

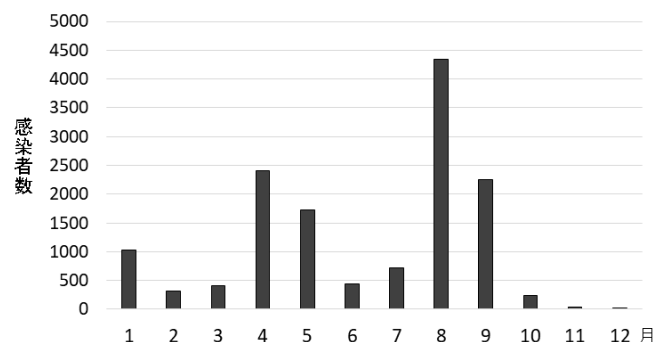


図 2 月別新型コロナウイルス感染者数

2. 定点把握対象疾患の流行状況

県内の定点医療機関数を表2に示す。

表2 患者定点医療機関数（令和3年4月現在）

地区	北部		中部		南部		合計
	奈良市	郡山	中和(東)	中和(西)	内吉野	吉野	
インフルエンザ定点	14(5)	14(1)	11(3)	10(3)	2	4(1)	55(13)
小児科定点	9(4)	9(1)	7(2)	6(3)	1	2(1)	34(11)
眼科定点	3	3	2(1)	2	-	-	10(1)
基幹定点	1(1)	2(2)	1(1)	1(1)	-	1(1)	6(6)
性感染症定点	3	3	2	3	-	-	11
疑似症定点	2(1)	3(3)	3(2)	1(1)	-	1(1)	10(8)

()内は、病原体定点数

1) 週単位報告対象疾患（週報）

週報告対象の18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：2020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、全国レベルよりも多いもの、少ないもの、全国並みのものに分けられた。全国より多かった疾患は、咽頭結膜熱であり、全国並みであった疾患は、RSウイルス感染症、感染性胃腸炎、手足口病、突発性発疹、全国より少なかった疾患は、A群溶血性レンサ球菌咽頭炎、水痘、伝染性紅斑、ヘルパンギーナ、流行性耳下腺炎であった。令和3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、②RSウイルス感染症、③手足口病、④突発性発疹、⑤咽頭結膜熱について、以下に発生状況を述べる。

(1) 感染性胃腸炎

概ね、全国と同様の推移であったが、第47週以降、全国の報告数を上回った。ピークとなった第51週の定点当たり報告数は12.82であった（図3）。

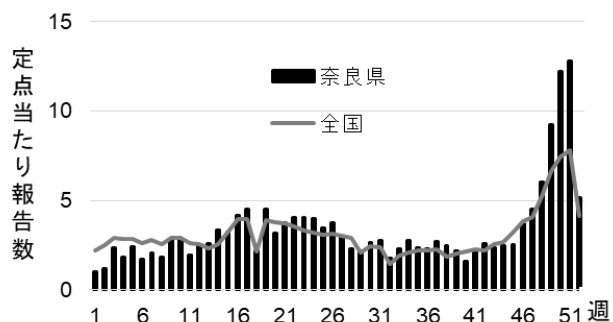


図3 感染性胃腸炎

(2) RSウイルス感染症

本県の定点当たり報告数としては2番目であるが、その他小児科定点把握対象疾患があまり流行しなかった中、近年では最も大きな流行となった。RSウイルス感染症は警報開始基準値等が設定されていないため、

警報の発令はなかったが、第16週頃より増加が始まり、第20週でピークを迎え、定点当たり報告数は10.65となった。近年、RSウイルス感染症の報告数は9月頃にピークを迎えていたが、令和3年では全国的に早い時期から報告数が増加しており、第28週にピークがみられた。本県では全国より8週早い第20週にピークを迎え、またこの週の定点当たり報告数は全国上位5位以内に入った（図4）。

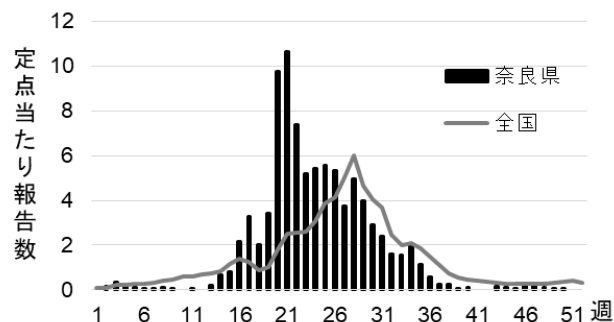


図4 RSウイルス感染症

(3) 手足口病

全国では第41週にピークを迎え、例年夏頃にピークを迎える傾向と大きく異なった。本県では第38週頃より増加が始まり、その後、第46週に定点当たり報告数が4.53となり、全国より5週遅くピークを迎えた（図5）。

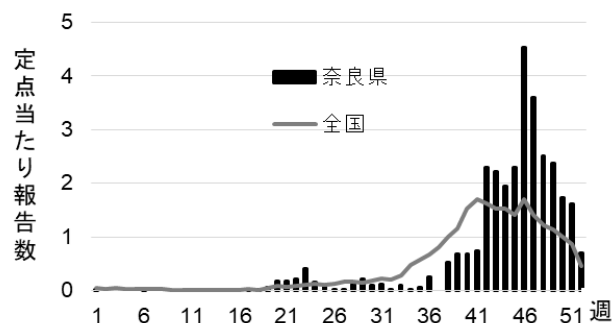


図5 手足口病

(4) 突発性発疹

本県において、令和元年までは上位5位以内でない疾患であったが、令和2年同様、令和3年も上位4位となった。1年を通して報告がみられ、概ね全国と同程度の推移であった。第23週では定点当たり報告数が0.65となり、最も多くなった（図6）。

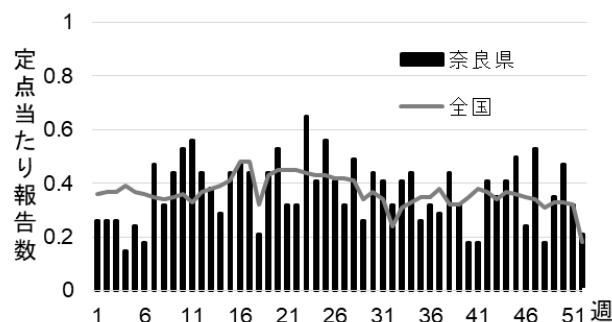


図6 突発性発疹

(5) 咽頭結膜熱

前半の第 14 週までは、定点あたり報告数が全国を上回る週が多くみられ、第 13 週には定点あたり報告数が 0.68 となった。その後、概ね全国と同様の推移であったが、第 21 週では定点あたり報告数が 0.85 とピークを迎え第 24 週までは全国より多い状況となった(図 7)。

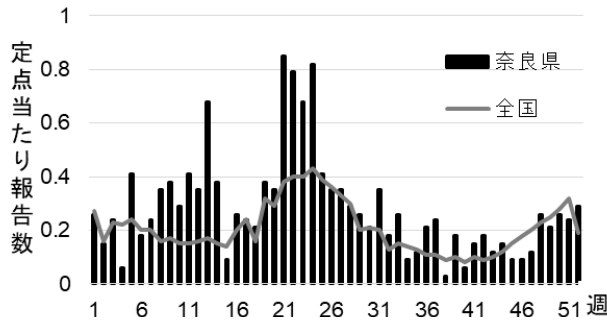


図 7 咽頭結膜熱

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。

性感染症は昨年に比べ、性器クラミジア感染症及び淋菌感染症が男女とも報告数が増加しており、尖圭コンジローマでは男性からの報告数がわずかに減少した。なお、4 疾患とも 15 歳未満からの報告はなかった。

薬剤耐性菌感染症は、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌感染症が昨年に比べ増加し、全国の定点あたり報告数より多い状況であった。また、3 疾患とも 70 歳以上が最も多かった。

考 察

新型コロナウイルス感染症は、国内での患者発生から 2 年経過し、令和 3 年ではアルファ株やデルタ株等の変異株の出現がみられ、感染拡大し大きな流行とな

った。全数把握対象疾患については、例年と大きく報告数は変わらなかった。一方、定点把握対象疾患では、インフルエンザの報告数が全国的にも激減しており、奈良県においても非常に少なく例年の発生動向と大きく異なった。他にも、RS ウイルス感染症の大流行や、手足口病の季節外れの流行もあり、いずれの感染症においても、引き続き発生動向を注視することが重要であると考えられる。

今後、新型コロナウイルス感染症の流行により、感染症対策が浸透したこともあり、その他病原体への感染機会が減少したことで、様々な病原体に対し免疫のない人の間で感染が拡大すること等、複雑な発生動向を辿る懸念がある。また、AMR 対策が、新型コロナウイルス感染症の流行により後退し、二次感染への恐れから、抗菌薬が多用されたことは、今後の薬剤耐性菌感染症への影響も懸念される。全数把握対象疾患及び定点把握対象疾患について、流行期には、週報やホームページ等で、情報提供および注意喚起を行っていくなど、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、各医療機関の方々及び関係機関の方々に深謝いたします。

表 4 令和 3 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
性器クラミジア感染症	男	11	7	6	8	8	13	6	8	8	6	7	9	97
	女	6	9	8	7	7	7	9	13	6	9	16	8	105
性器ヘルペスウイルス感染症	男	1	1	1	1	2			3		1	3		13
	女	6	2	4	1	5	6	1	4	9	6	7	1	52
尖圭コンジローマ	男		1		1	1								3
	女	3	3	1	1	4	1	1		4	2	2	3	25
淋菌感染症	男	6	4	7	5	5	8	2	5	6	4	6	2	60
	女	1		1	1	1		1	1	1	1		1	9
メチシリン耐性黄色ブドウ球菌感染症	男	28	20	27	31	23	28	19	19	24	19	21	25	284
	女	20	18	16	17	10	13	10	8	9	20	17	15	173
ペニシリン耐性肺炎球菌感染症	男		1	1	1	2	3	2			1	2		13
	女	1			1		1	2			1	1		7
薬剤耐性緑膿菌感染症	男				1									1
	女													