

LC-PDA および LC-MS/MS によるイヌサフランおよびグロリオサ中の コルヒチン、デメコルシンおよびコルチコシドの分析

安藤尚子・中田千恵子・長尾舞・西山隆之・桐山秀樹

Analysis of Colchicine, Demecolcine and Colchicoside
 in *Colechicum autumnale* and *Gloriosa superba* L. by LC-PDA and LC-MS/MS

Naoko ANDO・Chieko NAKATA・Mai NAGAO・Takayuki NISHIYAMA and Hideki KIRIYAMA

緒言

イヌサフラン及びグロリオサに含まれるコルヒチンを原因とする全国の食中毒は、平成 26 年から令和 5 年の 10 年間で 26 件発生し、33 名の患者のうち 15 名が死亡している¹⁾。同 10 年間の有毒植物による食中毒死者の総数が 17 名であったことを鑑みると、原因のほとんどを占めるコルヒチンの検査体制を整えることは、有毒植物による食中毒事例において非常に有効である。

コルヒチンのヒト経口最小致死量は、体重 50 kg の場合 4.3 mg 程度で、イヌサフランの球根には 0.08～0.2% のコルヒチンが含まれている²⁾ ことから、10 g 程度の球根を喫食しただけでも死亡する可能性がある。イヌサフランに含まれるアルカロイドは、コルヒチンの他、デメコルシン及びコルチコシドが知られており³⁾、これら 3 成分について当センター所有の 3 種類の LC を用いた簡便・迅速な検査体制を整え、イヌサフラン及びグロリオサを分析した。

また、コルヒチン等の調理による影響を確認したので報告する。

方法

1. 試料

試料は、イヌサフラン葉と球根及びグロリオサ球根を用いた。調理品は、イヌサフラン葉を細切り・混合した後、水煮、油炒め及び天ぷらに調理したものを用いた。

水煮は、イヌサフラン葉の 5 倍量の水で 2 分間茹でた後、搾り、茹で汁と水煮を試料とした (図 1)。油炒めは、イヌサフラン葉の 5% 量のサラダ油で 1 分間炒めた後、葉の 10% 量の醤油を加えた (図 2)。天ぷらは、市販の天ぷら粉に水を加えて衣とし、イヌサフラン葉の 5 倍量のサラダ油で揚げ、揚げ油と天ぷらを試料とした (図 3)。

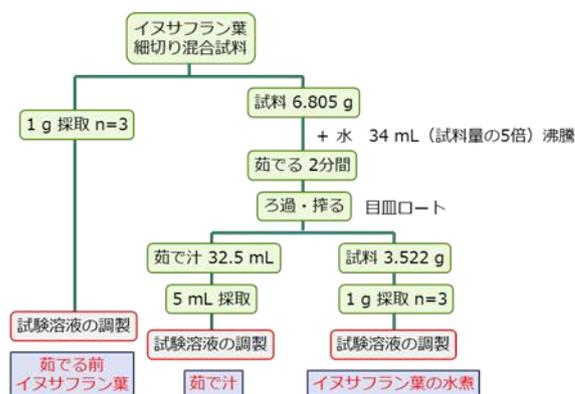


図 1 水煮の調理方法

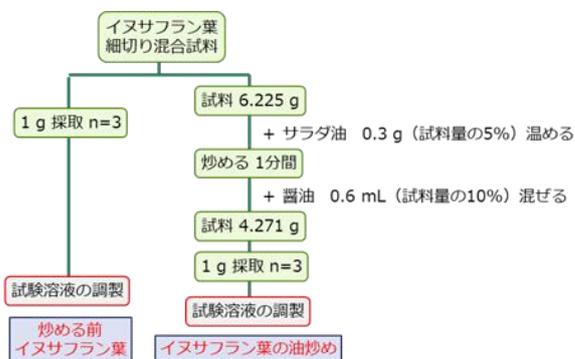


図 2 油炒めの調理方法

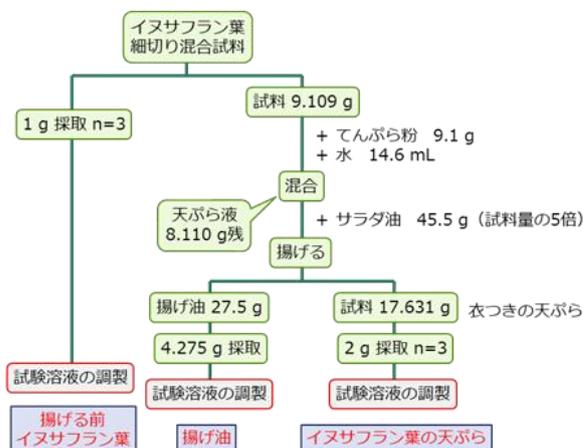


図 3 天ぷらの調理方法

2. 試薬等

1) 標準品・混合標準溶液

コルヒチン標準品は、富士フィルム和光純薬（株）製の和光一級を、デメコルシン標準品は、富士フィルム和光純薬（株）製の生化学用を、コルチコシド標準品は、Toronto Research Chemicals Inc.製を用いた。

コルヒチン、デメコルシン及びコルチコシドの標準品をメタノールで希釈し、100 µg/mLの混合標準溶液を調製した。

2) その他の試薬等

メタノール及びアセトニトリルは HPLC 用又は LC/MS 用、りん酸二水素ナトリウム二水和物、りん酸水素二ナトリウム・12水、りん酸、くえん酸一水和物、くえん酸三ナトリウム二水和物及びトリクロロ酢酸は試薬特級、ぎ酸（約 99%）及び超純水は LC/MS 用、全て富士フィルム和光純薬（株）製を用いた。

5 mmol/L りん酸緩衝液(pH7.0)は、りん酸二水素ナトリウム二水和物 7.8 g 及びりん酸水素二ナトリウム・12水 17.9 g を水で 1 L とし、これを水で 20 倍希釈して用いた。

5 mmol/L くえん酸緩衝液(pH4.0)は、くえん酸一水和物 7.0 g 及びくえん酸三ナトリウム二水和物 6.0 g を水で 1 L とし、これを水で 10 倍希釈して用いた。

10 mmol/L りん酸緩衝液(pH2.9)は、りん酸二水素ナトリウム二水和物 6.24 g 及びりん酸 0.68 mL を水で 1 L とし、これを水で 5 倍希釈して用いた。

No.5C ろ紙は（有）桐山製作所製の桐山ルート用ろ紙 No.5C を、Captiva EMR-Lipid はアジレント・テクノロジー（株）製の 3 mL、300 mg を、0.20 µm メンブレンフィルターはアドバンテック東洋（株）のフィルター孔径 0.20 µm 親水性 PTFE メンブレンフィルター-DISMIC-13HP を用いた。

3. 装置

ポリトロンは KINEMATICA 社製のポリトロン PT2100 を、高速冷却遠心機はエッペンドルフ・ハイマック・テクノロジーズ（株）製の CR21N を用いた。

HPLC-PDA は（株）島津製作所製の LC-10A シリーズ、UHPLC-PDA はウォータース社製の ACQUITY UPLC H-Class システムを用いた。

LC-MS/MS は、ウォータース社製で LC は ACQUITY UPLC H-Class システム、MS/MS は Xevo TQ-S micro を用いた。

4. 試験溶液の調製

試料の試験溶液の調製方法を図 4 に示した。

1) 抽出

試料の抽出は、1 試料当たり 3 併行で行い、平均値

を定量結果とした。

試料は、はさみで細切り後、混合しておく。試料 1 g を秤取し、メタノール 30 mL 加えてポリトロンで 1~2 分間ホモジナイズ後、No.5C ろ紙で吸引ろ過し、メタノールで 50 mL に定容し、抽出液とした⁴⁾。

ただし、衣付きの天ぷらの試料採取量は 2 g、茹で汁と揚げ油の試料採取量は 5 mL とした。

2) 精製・希釈

(1) LC-PDA 用試験溶液

抽出液 5 mL をメタノールで 10 mL に定容後、0.20 µm メンブレンフィルターでろ過して試験溶液とした。

(2) LC-MS/MS 用試験溶液

南谷らの報告⁵⁾を参考にした。抽出液 5 mL に 10 w/v% トリクロロ酢酸 2 mL 添加し、メタノールで 10 mL に定容したものを負荷液とした。PP 製遠沈管にセットした Captiva EMR-Lipid に負荷液 2 mL を負荷し、常温で 1,000×g で 1 分間遠心分離し、溶出液を捨てた。Captiva EMR-Lipid を新しい PP 製遠沈管にセット後、負荷液 1 mL を負荷し、同様に遠心分離して得られた溶出液にメタノールを加えて 10 mL とした。これの 1 mL を採取し、メタノールで 10 mL に定容後、0.20 µm メンブレンフィルターでろ過して試験溶液とした。

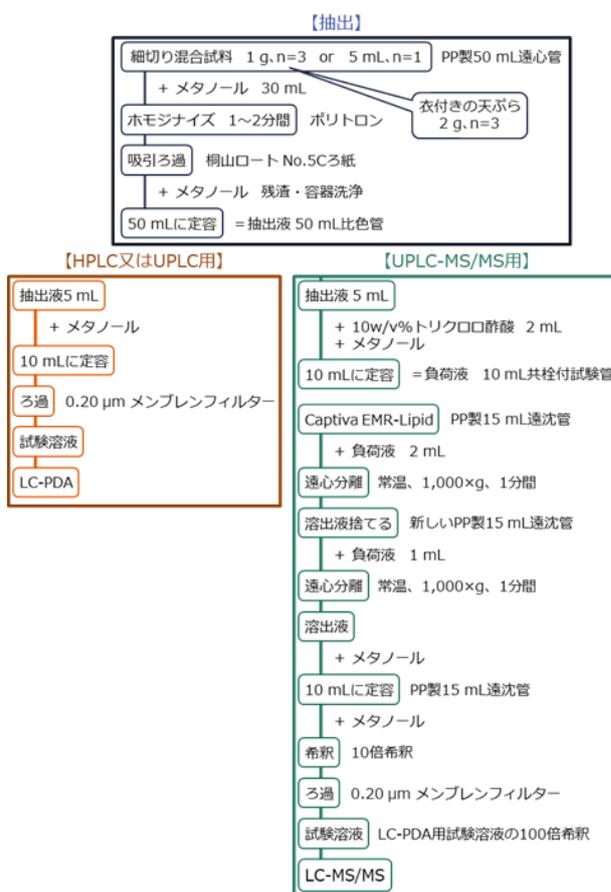


図 4 試料の試験溶液の調整方法

5. 検量線

1) LC-PDA 用検量線

100 µg/mL 混合標準溶液をメタノールで希釈し、0.2, 0.5, 2, 5, 10 及び 20 µg/mL に調製した。検量線は原点を通過せず、1/濃度の重み付け最小二乗法で求めた。

また、抽出のみで調製した試験溶液は、複雑な操作がなく迅速に調製できるが、夾雑物が多く含まれる。そこで、試験溶液の調製の際に抽出液 5 mL に 100 µg/mL 混合標準溶液を 0, 0.06, 0.12, 0.24, 0.36 及び 0.48 mL 添加し、メタノールで 10 mL に定容することで検量線用溶液 (0, 0.6, 1.2, 2.4, 3.6 及び 4.8 µg/mL) を調製し、標準添加法での検量線を作成した。

2) LC-MS/MS 用検量線

100 µg/mL 混合標準溶液をメタノールで希釈し、1, 2, 5, 10, 20, 50 及び 100 ng/mL に調製した。検量線は原点を通過せず、1/濃度の重み付け最小二乗法で求めた。

3) 検量線の評価

「水道水質検査方法の妥当性評価ガイドライン」⁶⁾ を参考に、最初にブランク (メタノール) を測定し、次に低濃度の混合標準溶液から高濃度の混合標準溶液を順番に測定し、最後にブランク (メタノール) を測定する。この一連の測定を 4 回繰り返し、各濃度の混合標準溶液の測定データからキャリーオーバー、真度及び精度で検量線の評価した。また、分析機器の検出下限値を「JIS K 0124 : 2011 高速液体クロマトグラフィ―通則」又は「JIS K 0136 : 2015 高速液体クロマトグラフィ―質量分析通則」を参考に検量線の最低濃度を 10 回繰り返し測定し、ピーク面積値の標準偏差の 3.67 倍の値を濃度に換算した値を検出下限とした。LC-PDA でのピークの完全分離は、日本薬局方⁷⁾ を参考とした。

6. 機器の測定条件

LC-PDA と LC-MS/MS の測定条件を表 1~3 に示す。

表 1 HPLC-PDA の測定条件

カラム	Inertsil ODS-3V 粒径 5 µm, 4.6×150 mm		
カラム温度	40°C		
注入量	10 µL		
流速	0.8 mL/min		
移動相	A : メタノール, B : アセトニトリル C : 5 mmol/L リン酸緩衝液 (pH7.0)		
グラジエント	保持時間	A(%)	B(%) C(%)
	0分	10	10 80
	5分	10	10 80
	10分	20	20 60
	15分	25	25 50
	20分	25	25 50
	20.01分	10	10 80
	30分	10	10 80
測定波長	350 nm		

表 2 UHPLC-PDA の測定条件

カラム	ACQUITY UPLC BEH C18 粒径 1.7 µm, 2.1×150 mm		
カラム温度	40°C		
注入量	2 µL		
流速	0.2 mL/min		
移動相	A : メタノール, B : アセトニトリル C : 5 mmol/L リン酸緩衝液 (pH7.0)		
グラジエント	保持時間	A(%)	B(%) C(%)
	0分	13	13 74
	1.5分	13	13 74
	3分	20	20 60
	7分	20	20 60
	7.01分	13	13 74
	10分	13	13 74
測定波長	350 nm		

表 3 LC-MS/MS の測定条件

カラム	ACQUITY UPLC BEH C18 粒径 1.7 µm, 2.1×150 mm		
カラム温度	40°C		
注入量	2 µL		
流速	0.2 mL/min		
移動相	A : 0.05% ぎ酸, B : アセトニトリル		
グラジエント	保持時間	A(%)	B(%)
	0分	85	15
	1分	85	15
	10分	5	95
	10分	85	15
	15分	85	15
イオン化モード	ESI+	ソース温度	150°C
キャピラリー電圧	3.0 kV	脱溶媒温度	400°C
コーンガス	50 L/Hr	脱溶媒ガス	800 L/Hr
化合物名	MRM	コーン電圧	コリジョン エナジー
コルヒチン	400.1>358.1 定量	34 V	22 eV
	400.1>310.1 定性		26 eV
	400.1>326.0 定性		24 eV
デメコルシン	372.1>310.1 定量	48 V	22 eV
	372.1>340.8 定性		18 eV
	372.1>282.1 定性		24 eV
コルチコシド	548.0>386.1 定量	44 V	26 eV
	548.0>344.1 定性		36 eV
	548.0>312.0 定性		36 eV

7. 有毒植物の測定

実際のイヌサフラン葉と球根及びグロリオサ球根のコルヒチン類を絶対検量法で定量した。

8. 添加回収

イヌサフラン葉及び球根をそれぞれ、はさみで細切り・混合後、1 g 採取し 100 µg/mL 混合標準溶液を 1 mL 添加し、30 分間放置したものを添加試料 (各 0.1 mg/g 添加) とした。分析者 1 名で 1 日に添加なし試料 1 併行と添加試料 2 併行で 5 日間 HPLC-PDA を用いて絶対検量線法による定量を行い、添加試料から添加なし試料の濃度を差し引いて、精度・併行精度・室内精度を求めた。

9. 調理によるイヌサフラン葉のコルヒチン類への影響

イヌサフラン葉の未調理品と水煮と茹で汁、油炒め及び天ぷらと揚げ油を LC-PDA 及び LC-MS/MS を用いて絶対検量線法により定量し、調理によるコルヒチン類への影響を確認した。

結果

LC-PDA の定量下限値は、各 0.02 mg/g. LC-MS/MS の定量下限値は、各 0.01 mg/g であった。

1. LC-PDA 移動相の選択

LC-PDA 移動相の緩衝液は、5 mmol/L りん酸緩衝液(pH7.0)とした。

検討にあたって HPLC-PDA を用いてグラジエント条件を表 4, 移動相の緩衝液として 10 mmol/L りん酸緩衝液(pH6.9), 5 mmol/L くえん酸緩衝液(pH4.0)及び 10 mmol/L りん酸緩衝液(pH2.8)の 3 種を比較した(図 5)。

表 4 HPLC-PDA のグラジエント条件

移動相	A:メタノール, B:アセトニトリル C:緩衝液			
	保持時間	A(%)	B(%)	C(%)
0分		10	10	80
5分		10	10	80
15分		25	25	50
20分		25	25	50
20.01分		10	10	80
30分		10	10	80

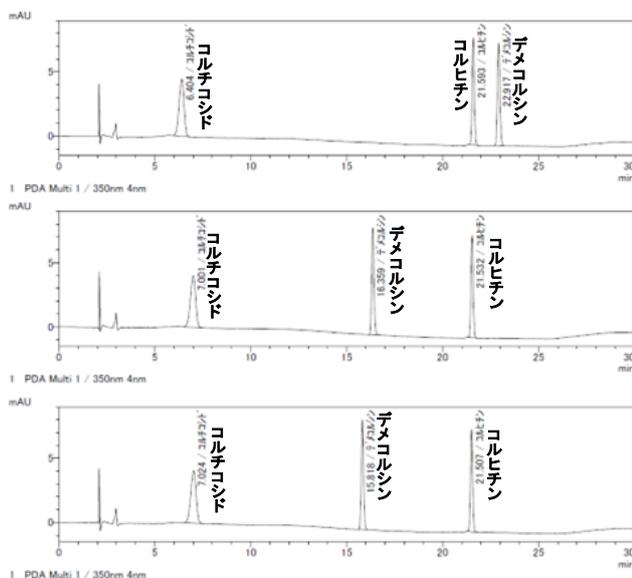


図 5 各 2 µg/mL 混合標準溶液の HPLC-PDA クロマトグラム

上図: 緩衝液 10 mmol/L りん酸緩衝液(pH6.9)
中図: 緩衝液 5 mmol/L くえん酸緩衝液(pH4.0)
下図: 緩衝液 10 mmol/L りん酸緩衝液(pH2.8)

10 mmol/L りん酸緩衝液(pH2.8)は、検量線作成時にコルチコシドの 0.2 µg/mL での繰り返し精度が 10%を超過したこと、及び 5 mmol/L くえん酸緩衝液(pH4.0)は、イヌサフラン葉及びグロリオサ球根の抽出液への 0.1 µg/mL 混合標準溶液の添加試験で、回収率 80~120%を満たさなかったことから、緩衝液はりん酸緩衝液(pH6.9)を選定した。さらに、ピーク形状や再現性を確認した結果、濃度を 5 mmol/L に変更した。

2. 検量線の評価

LC-PDA と LC-MS/MS の検量線の評価は、表 5~7 及び図 6 に示したとおり評価基準を満たした。

評価基準は、「水道水質検査方法の妥当性評価ガイドライン」⁶⁾を参考に、キャリアオーバーは検量線の下限濃度(LC-PDA; 0.2 µg/mL, LC-MS/MS; 1 ng/mL)を下回る, 真度は調製濃度の 80~120%, 精度はいずれの濃度においても相対標準偏差(RSD) 10%以下, 機器の検出下限は検量線の下限濃度を下回る, 分離度は 1.5 以上とした。

表 5 HPLC-PDA の検量線の評価

評価項目	コルヒチン	デメコルシン	コルチコシド
キャリアオーバー	なし	なし	なし
真度 (%)	98.7~101.1	99.1~101.4	96.6~103.4
精度 (%)	0.1~1.6	0.3~1.3	0.4~5.8
機器の検出下限 (µg/mL)	0.009	0.013	0.065
分離度	7.9~39.6	5.8	—

表 6 UHPLC-PDA の検量線の評価

評価項目	コルヒチン	デメコルシン	コルチコシド
キャリアオーバー	なし	なし	なし
真度 (%)	96.5~104.9	96.0~107.1	96.7~104.1
精度 (%)	2.0~2.7	1.4~7.8	0.6~7.2
機器の検出下限 (µg/mL)	0.061	0.079	0.109
分離度	49.6~56.8	8.7~9.7	—

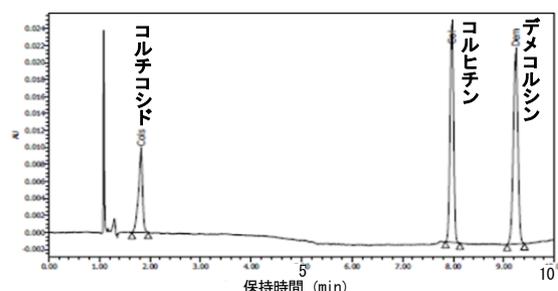


図 6 各 5 µg/mL 混合標準溶液の UHPLC-PDA クロマトグラム

表 7 LC-MS/MS の検量線の評価

評価項目	コルヒチン	デメコルシン	コルチコシド*2
キャリアオーバー	なし	なし	なし
真度 (%)	95.1~104.2	94.7~104.0	89.4~117.2 94.5~104.7
精度 (%)	0.8~2.4	0.6~3.1	1.2~4.7 0.9~5.0
機器の検出下限 (ng/mL)	-0.019*1	0.250	0.585 0.243

*1: 検量線の最低濃度が検出下限付近の濃度より濃いため

*2: コルチコシドは、2本のピークが検出した

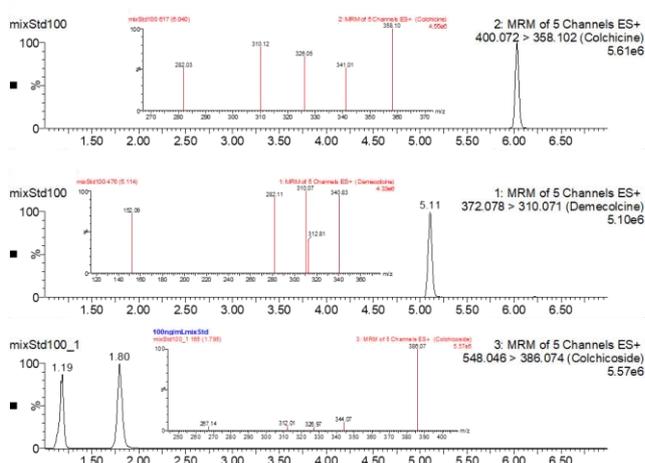


図 7 混合標準溶液の LC-MS/MS クロマトグラムと MS スペクトル

なお、LC-MS/MS でのコルチコシドのピークは、2本検出したので（図 7）、それぞれの検量線で定量後、平均値をコルチコシドの濃度とした。

3. 標準添加法と絶対検量線法による比較

イヌサフラン葉の HPLC-PDA 及び UHPLC-PDA での定量結果は、標準添加法並びに絶対検量線法で差が見られなかった（表 8, 9）。

イヌサフラン及びグロリオサ球根でも差が確認できなかった。

表 8 イヌサフラン葉の HPLC-PDA での標準添加法と絶対検量線法の定量値

【単位：mg/g】 n=4			
	コルヒチン	デメコルシン	コルチコシド
標準添加法	0.07	0.13	検出しない
絶対検量線法	0.08	0.13	検出しない

表 9 イヌサフラン葉の UHPLC-PDA での標準添加法と絶対検量線法の定量値

【単位：mg/g】 n=4			
	コルヒチン	デメコルシン	コルチコシド
標準添加法	0.08	0.05	検出しない
絶対検量線法	0.08	0.05	検出しない

4. 有毒植物の測定結果

イヌサフラン葉と球根及びグロリオサ球根のコルヒチン類を HPLC-PDA で定量した結果を表 10 及び図 8~10 に、同じイヌサフラン葉と球根及びグロリオサ球根のコルヒチン類を 3 種類の LC で定量した結果を表 11~13 に示す。

表 10 有毒植物中のコルヒチン類の HPLC-PDA での定量結果

【単位：mg/g】				
有毒植物	n 数	コルヒチン	デメコルシン	コルチコシド
イヌサフラン葉	3	0.06	0.12	検出しない
	2	0.05	0.10	検出しない
イヌサフラン球根	3	0.19	0.28	検出しない
	4	0.16	0.31	<0.02
グロリオサ球根 1*	2	0.02	<0.02	検出しない
	2	1.6	<0.02	0.16
	3	1.6	<0.02	検出しない
	3*	0.86	<0.02	0.12
	4	0.71	検出しない	<0.02
	4*	0.82	<0.02	0.05

グロリオサの品種 1*: ルテア, 2*: ピンク, 3*: ロスチャイルディアナ, 4*: ファイヤーパード

表 11 イヌサフラン葉のコルヒチン類定量結果

【単位：mg/g】 n=3			
測定装置	コルヒチン	デメコルシン	コルチコシド
HPLC-PDA	0.07	0.58	検出しない
UHPLC-PDA	0.07	0.17	<0.02
LC-MS/MS	0.07	0.18	<0.01*

*: 2本のピークそれぞれを定量後の平均値

表 12 イヌサフラン球根のコルヒチン類定量結果

【単位：mg/g】 n=3			
測定装置	コルヒチン	デメコルシン	コルチコシド
HPLC-PDA	0.12	0.25	検出しない
UHPLC-PDA	0.12	0.24	<0.02
LC-MS/MS	0.12	0.25	0.01*

*: 2本のピークそれぞれを定量後の平均値

表 13 グロリオサ球根のコルヒチン類定量結果

【単位：mg/g】 n=3			
測定装置	コルヒチン	デメコルシン	コルチコシド
HPLC-PDA	0.96	検出しない	0.07
UHPLC-PDA	0.98	検出しない	0.06
LC-MS/MS	0.99	検出しない	0.08*

*: 2本のピークそれぞれを定量後の平均値

イヌサフラン葉の HPLC-PDA のデメコルシンの定量値が他よりも高い以外は、3 種類の LC で定量値に違いがなかった。

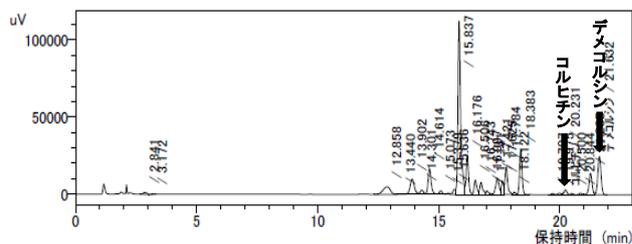


図 8 イヌサフラン葉の HPLC-PDA クロマトグラム

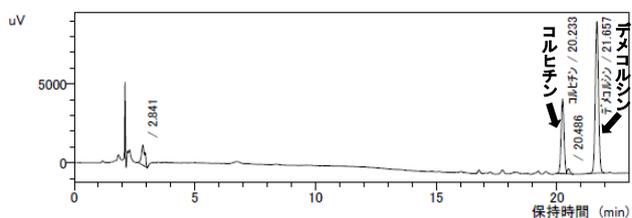


図 9 イヌサフラン球根の HPLC-PDA クロマトグラム

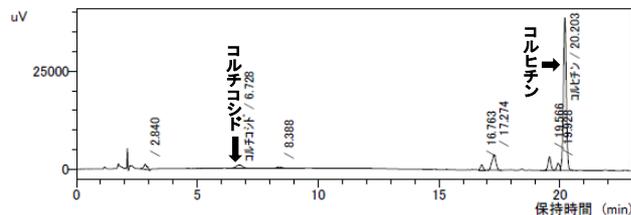


図 10 グロリオサ球根の HPLC-PDA クロマトグラム

5. 添加回収結果

表 14 各 0.1 mg/g 添加イヌサフラン葉の真度・併行精度・室内精度

	添加前含有量 (mg/g)	真度 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)
コルヒチン	0.05	95.3	5.2	6.5
デメコルシン	0.11	97.1	6.1	13.6
コルチコシド	検出しない	95.0	2.7	3.7

表 15 各 0.1 mg/g 添加イヌサフラン球根の真度・併行精度・室内精度

	添加前含有量 (mg/g)	真度 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)
コルヒチン	0.14	94.6	6.8	18.4
デメコルシン	0.28	88.7	12.5	13.8
コルチコシド	<0.02	96.9	2.7	7.9

イヌサフラン葉及び球根のコルヒチン等の回収率は 88.7~97.1%, 併行精度は 2.7~12.5%, 室内精度は 3.7~18.4% となった（表 14, 15）。

6. 調理によるイヌサフラン葉のコルヒチン類への影響

イヌサフラン葉の未調理品及び調理品からは、コルヒチンとデメコルシンのみを検出し、コルチコシドは検出しなかった。HPLC-PDA の絶対検量線によるデメコルシン定量結果が他に比べて高かった。調理後のコルヒチン類の量は調理前に比べて、水煮で 73.5～98.1%、油炒めで 58.5～91.3%、天ぷらで 66.2～84.7% であった (図 11～13)。

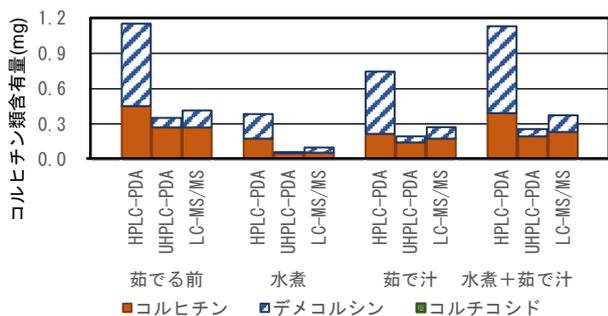


図 11 イヌサフラン葉の水煮によるコルヒチン類への影響

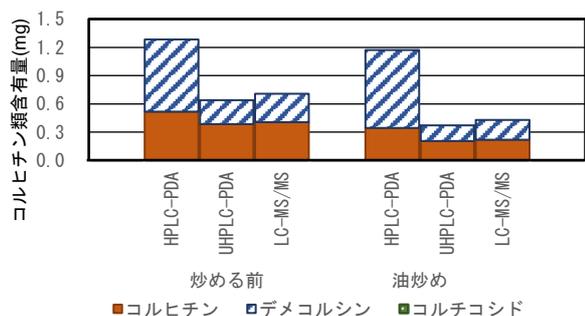


図 12 イヌサフラン葉の油炒めによるコルヒチン類への影響

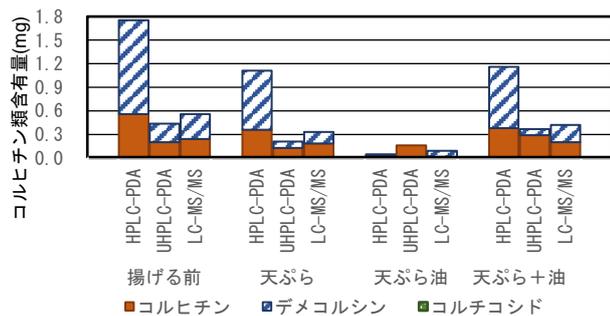


図 13 イヌサフラン葉の天ぷらによるコルヒチン類への影響

考 察

過去のイヌサフラン及びグロリオサによる食中毒時に検出されたコルヒチン濃度⁸⁾は 0.22～2.2 mg/g であり、当センターでも検査対応可能となった。

デメコルシンの保持時間は、移動相の pH の影響を受けたが、コルヒチン及びコルチコシドは pH の影響を受けなかった。

標準添加法と絶対検量線法を比較した際には、定量

値に差がなかった。しかし、調理による有毒植物中のコルヒチン類への影響を 3 種類の LC を用いて絶対検量線法により定量した際には、HPLC-PDA での定量結果が高くなる傾向があり、これはコルヒチン類と夾雑物のピークが重なることが原因であると推察される。このことから絶対検量線法により定量後、標準添加法で結果の確認をすることでより正確な定量結果が得られる。

有毒植物中のコルヒチン類は、イヌサフラン葉でコルヒチン 0.05～0.07 mg/g、デメコルシン 0.10～0.18 mg/g 検出した。イヌサフラン球根でコルヒチン 0.12～0.19 mg/g、デメコルシン 0.25～0.28 mg/g 検出した。また、グロリオサ球根でコルヒチン 0.02～1.6 mg/g、コルチコシド <0.02～0.16 mg/g 検出した。

添加回収結果は、回収率 80～120%、併行精度 15% 以下、室内精度 20% 以下で良好であった。

調理のコルヒチン類への影響は、水煮ではコルヒチン類の 6 割程度が茹で汁に移行した。油炒め及び天ぷらでは、含有コルヒチン類が概ね 5～6 割程度まで減少した。また、天ぷら油には少量しか移行しなかった。

文 献

- 1) 厚生労働省：過去の食中毒事件一覧, https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iry_ou/shokuhin/syokuchu/04.html#j4-3
- 2) 厚生労働省：自然毒のリスクプロファイル：高等植物：イヌサフラン, <https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000058791.html>
- 3) 熊本大学薬学部薬用植物園：植物データベース イヌサフラン, <https://www.pharm.kumamoto-u.ac.jp/yakusodb/detail/003458.php>
- 4) “食品衛生検査指針 理化学編”, 931-936 (2015) (社) 日本食品衛生協会
- 5) 南谷臣昭, 谷口賢, 友澤潤子, 他：令和 2 年度厚生労働科学研究費補助金 食品の安全確保推進研究事業 植物性自然毒による食中毒対策の基盤整備のための研究 研究分担報告書「植物性自然毒の多成分同時分析法の開発」, 11-45 (2020)
- 6) 健康局水道課長「水道水質検査方法の妥当性評価ガイドラインについて」, 健水発 0906 第 1 号 (平成 24 年 9 月 6 日)
- 7) 「第十八改正日本薬局方」, 告示第 220 号 (令和 3 年 6 月 7 日)
- 8) 国立保健医療科学院：健康補外危機管理事例データベース, <https://www.niph.go.jp/h-crisis/archives/category/315/>

食品衛生法第8条に規定する指定成分等の分析条件の検討

長尾舞・西山隆之・安藤尚子・桐山秀樹

Investigation of analytical methods for the designated ingredients, etc. provided for in Article 8 of the Food Sanitation Act.

Mai NAGAO・Takayuki NISHIYAMA・Naoko ANDO and Hideki KIRIYAMA

緒言

指定成分等とは、食品衛生上の危害の発生を防止する見地から特別の注意を必要とする成分又は物であって、厚生労働大臣が薬事・食品衛生審議会の意見を聴いて、令和2年3月に指定したものである。現在、コレウス・フォルスコリー、ドオウレン、プエラリア・ミリフィカ、ブラックコホシュの4成分等が指定されている。これらは主に健康食品やサプリメントとして流通しているが、健康被害も数多く報告されている。

このうち、県内で原料としての流通が確認されているプエラリア・ミリフィカには、ミロエストロール、デオキシミロエストロール、クワクリン、プエラリンといった女性ホルモン様の作用を示す植物性エストロゲンが多く含まれており、丰胸、美肌、若返り等を謳ったサプリメントが販売されている。しかし、プエラリア・ミリフィカに含まれているミロエストロール等は、大豆イソフラボン類の約1,000~10,000倍強いエストロゲン活性を持ち合わせていると言われており、月経不順や不正出血、消化器障害や皮膚障害など多くの健康被害が報告されている。

今回、県内で健康被害や事故報告があった際の危機管理に活用することを目的として、当センターで保有するLC-MS/MSを用いてプエラリア・ミリフィカの分析条件の検討を行った。

方法

試験法は、令和2年5月に発出された薬生食基発0529第4号 厚生労働省医薬・生活衛生局食品基準審査課長通知りに従った。なお、本通知法では、ミロエストロール及びデオキシミロエストロールの標準品が国内で入手困難なため、クワクリンを定量における基準物質としている。

1. 試料

試料は、県内製薬メーカーにサンプルとして譲渡いただいたプエラリア・ミリフィカ粉末及びインター

ネット通販で購入した市販のサプリメント3製品（製品E、製品K、製品N）を分析対象とした。

2. 試薬等

使用した試薬等は全て富士フイルム和光純薬（株）製で、クワクリン標準品は食品分析用を、メタノール、超純水はLC/MS用を、1 mol/L 酢酸アンモニウムはHPLC用を用いた。

3. 装置

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。

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を使用した。

4. 測定条件

LC-MS/MSにおける分析条件はクワクリン標準液を用いて最適化を行い、表1のとおりとした。

表1 LC-MS/MS測定条件

カラム	ACQUITY UPLC BEH C18 2.1 mm×100 mm 粒子径 1.7 μm
移動相	A)5 mM 酢酸アンモニウム水溶液 B)5 mM 酢酸アンモニウムメタノール溶液
グラジエント条件 (B%)	15(0分)→15(8分)→27(10分)→27(18分)→98(18.5分)→98(20分)→15(20.5分)→15(25分)
カラム温度	55℃
流量	0.3 mL/min
注入量	5 μL
イオン化法	ESI(+)
イオンソース温度	150℃
キャピラリー電圧	0.5 kV
Desolvation 温度	400℃
コーンガス流量	50 L/hr
Desolvation ガス流量	800 L/hr
モニターイオン m/z	369.22>225.14 369.22>213.17 369.22>137.07 369.22>115.15 369.22>69.09

5. 試料の調製

前処理法のフローを図に示す。固形のサプリメントは乳鉢で粉砕し、カプセル型のサプリメントは中身を取り出し、試料 0.4 g を遠心沈殿管に入れ、80%メタノール溶液 2 mL を加えて 15 分間超音波処理した後、遠心分離し、上澄液を正確に 2 mL に定容し、試験溶液とした。この溶液を 0.2 μm メンブランフィルターで濾過後、適宜希釈して試験溶液とした。

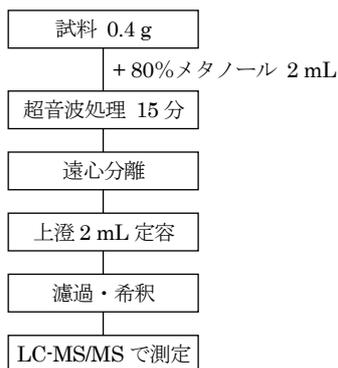


図 フローシート

6. 標準溶液の調製

検量線用の標準液は、クワクリン濃度が 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 10 ng/mL となるようにメタノールで調製した。

最低濃度である 0.5 ng/mL で、シグナル・ノイズ比は $S/N > 10$ を満たした。また、本条件で検量線を作成した結果、 $R^2 > 0.999$ となり、良好な直線性が得られた。

7. 検出下限値

JIS K0136:2015 高速液体クロマトグラフィー質量分析通則に従い、検量線の最低濃度である 0.5 ng/mL を 10 回繰り返し測定し、検出下限値を求めた結果、0.12 ng/mL となった。

8. 添加回収試験

製品 N 0.4 g に 0.25 $\mu\text{g/g}$ となるようクワクリン標準液を添加し、5 併行で添加回収試験を行った結果、回収率の平均値は 83.0% となり、良好な結果が得られた。

結果

試料測定結果を表 2 に示す。なお、一日推奨摂取量及びプエラリア・ミリフィカ含有量はサプリメントに表示されている値を転記した。

各製品のクワクリン含有量にはバラツキがあったが、プエラリア・ミリフィカに対するクワクリンの比率は 0.77~4.0 $\times 10^{-4}$ % であった。

厚生労働省が実施したプエラリア・ミリフィカを含む健康食品 17 製品の分析調査²⁾では、8 製品から代表的なイソフラボン類と共に、プエラリア・ミリフィカに特徴的な成分とされるミロエストロール、デオキ

シミロエストロール、クワクリン、イソミロエストロールが検出された。また、8 製品の一日推奨摂取量あたりのクワクリンの検出範囲は ND~348.6 μg であった。

表 2 試料測定結果

	クワクリン含有量 ($\mu\text{g/g}$)	一日推奨摂取量あたり		プエラリア・ミリフィカ中のクワクリン比率 (%)
		クワクリン含有量 (μg)	プエラリア・ミリフィカ含有量 (mg)	
プエラリア・ミリフィカ粉末	2.13	—	—	2.1 $\times 10^{-4}$
製品 E	0.54	0.13	99	1.3 $\times 10^{-4}$
製品 K	1.68	4.3	1,080	4.0 $\times 10^{-4}$
製品 N	0.16	0.077	100	0.77 $\times 10^{-4}$

考察

現状では、プエラリア・ミリフィカを含む健康食品中のミロエストロール、デオキシミロエストロール、クワクリン等の含有量を定量検査することが困難であるため、事業者は製品中の含有量を明記して販売することが出来ない状況である。

また、今回当センターで入手したサプリメントについても、一日推奨摂取量あたりのプエラリア・ミリフィカ含有量には大きな差があり、クワクリン含有量についても同様であった。プエラリア・ミリフィカが天然物であることから、成分の含有量が安定していないことも一因であると考えられる。

本検討において、プエラリア・ミリフィカに特徴的な成分とされるクワクリンを検出することで、試料がプエラリア・ミリフィカであることの確認等が可能であることが示唆された。今後、県内で健康被害が生じた際に活用することを検討したい。

文献

- 1) 厚生労働省医薬・生活衛生局食品基準審査課長通知「食品衛生法第 8 条に規定する指定成分等の試験法について」、薬生食基発 0529 第 4 号 (2020)
- 2) 花尻瑠理, 厚生労働科学研究費補助金 (医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)「専ら医薬品として使用される成分本質 (原材料) の有効性及び安全性等の評価に関する研究」平成 17 年度 総括・分担研究報告書, 103-112 (2006)

奈良県内に流通する農産物中の残留農薬調査（2013-2022）

竹田依加・荒堀康史・倉井悠貴・上床知佐奈・中永絵理・桐山秀樹

Investigation of Pesticide Residues in Agricultural Products in Nara Prefecture (2013-2022)

Erika TAKEDA・Yasushi ARAHORI・Yuki KURAI・Chisana UWATOKO・Eri NAKAE
and Hideki KIRIYAMA

緒言

当センターでは、食品衛生法第24条に基づき、策定した奈良県食品衛生監視指導計画に従い、県内に流通する農産物について残留農薬検査を実施している。この農産物における残留農薬検査について、食品衛生法改正による残留農薬等のポジティブリスト制度（以下、制度とする）が2006年5月より施行された。これに伴い、従来は基準値がなく、食品衛生法による規

制が設定されていなかった農薬と農産物の組み合わせに対して、一律基準値等が設定された。

奈良県では本制度に対応するため、1998年度以降の残留農薬の検査結果を複数回に渡って集計し¹⁻⁵⁾、県内流通農産物の残留農薬の実態把握に努めてきた。また、各都道府県においても制度施行前後にかかわらず複数年間の残留農薬の検査結果をまとめることで各地域における残留農薬の実態の把握に努めている⁶⁻¹¹⁾。

表1 検査対象農薬

用途	農薬名	項目数
殺菌剤	アゾキシストロビン、イソプロチオラン、イプロバリカルブ、イプロベンホス、オキサジキシル、カルプロパミド、キノキシフェン、キントゼン、クレソキシムメチル、ジエトフェンカルブ、ジクロラン、ジニコナゾール、ジフェノコナゾール、シフルフェナミド、シプロジニル、シメコナゾール、チフルザミド、テトラコナゾール、テブコナゾール、トリアジメノール、トリアジメホン、トリフロキシストロビン、トルクロホスメチル、ニトタールイソプロピル、ピテルタノール、ピラクロストロビン、ピラゾホス、ピリフェノックス、ピリメタニル、ピロキロン、ピンクロゾリン、フェナリモル、フェンアミドン、フェンブコナゾール、フェンプロピモルフ、ブピリメート、フラメトビル、フルキンコナゾール、フルジオキソニル、フルシラゾール、フルトラニル、フルトリアホール、プロシミドン、プロピコナゾール、ヘキサコナゾール、ベナラキシル、ベンコナゾール、ペンシクロン、ボスカリド、マイクロブタニル、メブロニル	51
殺虫剤	EPN、イサゾホス、イソキサチオン、イソプロカルブ、イミダクロプリド、エチオン、エトキサゾール、エトフェンブロックス、エトプロホス、オキサミル、カズサホス、カルバリル、キナルホス、クロチアニジン、クロマフェノジド、クロルピリホス、クロルピリホスメチル、クロルフェナピル、クロルフェンピホス、シアノホス、シハロトリン、シベルメトリン、シラフルオフェン、ダイアジノン、チアクロプリド、チアメトキサム、チオメトン、テトラクロルピホス、テトラジホン、テブフェノジド、テブフェンピラド、テフルトリン、デメトン-S-メチル、トリアゾホス、トリアレート、トリフルムロン、トルフェンピラド、ノバルロン、パラチオン、パラチオンメチル、ピフェントリン、ピベロニルプトキシド、ピラクロホス、ピリダフェンチオン、ピリダベン、ピリプロキシフェン、ピリミカーブ、ピリミホスメチル、フェナミホス、フェニトロチオン、フェノキシカルブ、フェノチオカルブ、フェノトリン、フェンクロルホス、フェンスルホチオン、フェントエート、フェンバレレート、フェンプロパトリン、ブプロフェジン、フルアクリピリム、フルシトリネート、プロチオホス、プロパホス、プロフェノホス、プロモプロピレート、プロモホス、プロモホスエチル、ペルメトリン、ベンダイオカルブ、ベンディメタリン、ホキシム、ホサロン、ホスチアゼート、ホスファミドン、ホスメット、ホレート、マラチオン、メチダチオン、メトキシクロール、メトキシフェノジド、メビンホス	81
除草剤	アセトクロール、アトラジン、アニロホス、アメトリン、アラクロール、インダノファン、エスプロカルブ、エタルフルラリン、エトフメセート、オキサジアゾン、オキシフルオルフェン、オキサジクロメホン、カルフェンストロール、カルフェントラゾンエチル、クミルロン、クロマゾン、クロリダゾン、クロルタールジメチル、クロルプロファム、クロルブファム、クロロクスロン、シアナジン、ジウロン、ジクロホップメチル、ジチオビル、シニドンエチル、シハロホップブチル、ジフルフェニカン、シマジン、ジメタメトリン、ジメチピン、ジメテナミド、シメトリン、ターバシル、ダイムロン、チオベンカルブ、テニルクロール、テブチウロン、トリフルラリン、ナプロバミド、ノルフルラゾン、ピコリナフェン、ピラフルフェンエチル、ピリフタリド、ピリブチカルブ、ブタクロール、ブタフェナシル、ブタミホス、フラムプロップメチル、フルフェナセット、フルミオキサジン、フルリドン、プレチラクロール、プロバクローラ、プロバジン、プロピザミド、プロマシル、プロメトリン、ヘキサジノン、ペンゾフェナップ、ペントキサゾン、ベンフルラリン、ベンフレセート、メタベンズチアズロン、メフェナセット、モノリニューロン、リニューロン、レナシル	68
その他	クロキントセットメキシル、パクロブトラゾール、ベノキサコール、メフェンビルジエチル	4

今回、新たに2013年度から2022年度までの10年間の調査結果を集計し、直近10年間の検出農薬や検出農産物の傾向を把握することを目的とした。

方法

1. 使用データ

2013年4月から2023年3月までの10年間に奈良県内で収去された農産物1,984検体（国産品1,948検体 輸入品36検体）の残留農薬検査結果を集計した。

2. 検査対象農薬

2013年度から2019年度までの間は116項目、2020年度から2022年度までの間は150項目について適宜一部項目を入れ替えて検査を実施した。この間検査を実施したのべ204項目の検査対象農薬の内訳を表1に示した。

結果と考察

1. 残留農薬の検出率

2013年度から2022年度までの10年間に搬入された農産物1,984検体について農薬の検出率を表2に示した。10年間の総検出数は409で検出率は20.6%であった。また、各年度の検出率は14.4%から25.9%で推移し、ほぼ一定であった。また、10年間の検査項目数246,930項目に対し検出項目数は561、検出率は

1.14%であった。また、各年度の検出率は0.13%から0.31%で推移し、ほぼ一定であった。

2. 検出農薬の内訳

2013年度から2022年度までの10年間で検出した農薬の検出数内訳を調査し、表3に示した。検出農薬は55項目で、検査項目のべ204項目のうち27.0%を占めた。検出数上位5農薬はアゾキシストロビン（66検体）が最も多く、以下、ジフェノコナゾール（64検体）、プロシミドン（57検体）、クレソキシムメチル（46検体）、クロルフェナピル（39検体）と続いた。このうちクロルフェナピルは殺虫剤で他は全て殺菌剤であった。加えて、検出数上位5農薬の検出数272は総検出項目数の48.5%を占めており、特定の農薬が高頻度で検出された。

3. 検出農産物

1) 産地別の検査数と検出率

2013年度から2022年度までの10年間における検査農産物および検出農産物について産地別の検体数および検出率を表4に示した。検査農産物および検出農産物を産地について整理したところ、図1に示すように検査農産物の72.6%~83.4%、検出農産物の61.5%~86.5%が県内産農産物であった。

表2 検査農産物数および検査農薬数に対する検出率

年度	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	2022	計
総検査農産物数	193	217	212	220	213	213	215	195	138	168	1,984
総検出農産物数	39	37	37	57	52	49	38	28	34	38	409
検出率[%]	20.2	17.1	17.5	25.9	24.4	23.0	17.7	14.4	24.6	22.6	
総検査農薬数	22,388	25,172	24,592	25,520	24,708	24,708	24,940	29,250	20,700	25,200	247,178
総検出農薬数	48	52	52	80	76	69	49	38	44	53	561
検出率[%]	0.21	0.21	0.21	0.31	0.31	0.28	0.20	0.13	0.21	0.21	

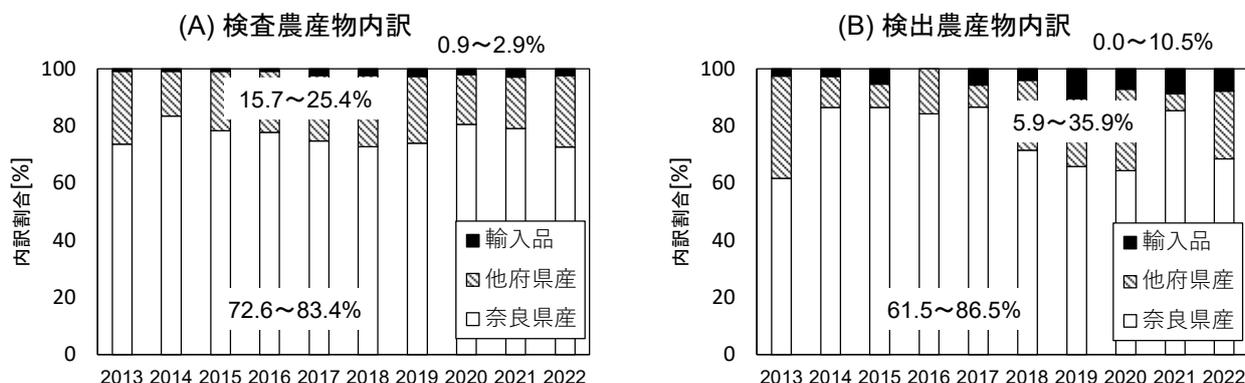


図1 検査農産物および検出農産物の産地内訳

表3 検出農薬の内訳（2013年度～2022年度）

用途	農薬名	総検出数	野菜			農産物	果実			農産物	
			奈良県産	他府県産	輸入		奈良県産	他府県産	輸入		
殺菌剤	アゾキシストロビン	66	26	12	1	いんげん(4)、オクラ(1)、きゅうり(6)、小松菜(3)、トマト(7)、なす(4)、ねぎ(9)、はくさい(1)、ピーマン(3)、モロヘイヤ(2)	24	1	2	いちご(14)、いちじく(6)、なし(1)、ぶどう(4)、レモン(2)	
	ジフェノコナゾール プロシמיד	64 57		1 15		トマト(1) いんげん(1)、キャベツ(2)、きゅうり(6)、じゃがいも(1)、 トマト(5)、なす(1)、ピーマン(5)、みつば(1)	63 35			かき(45)、うめ(17)、なし(1) いちご(35)	
	クレソキシムメチル	46	9	3		えんどう(1)、ししとう(1)、とうがん(1)、なす(6)、ニラ(1)	34			いちご(19)、うめ(10)、かき(2)、なし(2)、ぶどう(1)	
	ミクロブタニル	28	5	3		ししとう(1)、なす(4)、ねぎ(1)、ピーマン(2)	20			いちご(20)	
	ボスカリド	23	6	12	1	トマト(4)、はくさい(11)、ほうれんそう(2)、ラディキオ(1)、レタス(1)	4			いちご(3)、なし(1)	
	シメコナゾール シフルフェナミド	17 11		1		ねぎ(1) なす(3)	16 8			いちご(16) いちご(8)	
	テブコナゾール フルジオキソニル	9 9	3			トマト(3)	8 2	1	4	うめ(2)、かき(4)、ぶどう(3) いちご(2)、オレンジ(2)、レモン(2)	
	ジェットフェンカルブ ピテルタノール	6 5	2	3		きゅうり(2)、トマト(3)	1 5			いちご(1) うめ(5)	
	フェナリモル	4	1			なす(1)	3			いちご(3)	
	テトラコナゾール	2		1		かぼちゃ(1)	1			いちご(1)	
	ピラクrostロビン	2		1		はくさい(1)	1			なし(1)	
	オキサジキシル シプロジニル	1 1	1			チンゲン菜(1)	1			なし(1)	
	トリアジメノール	1		1		未成熟いんげん(1)					
	トリフロキシストロビン	1		1		きゅうり(1)					
	トルクロホスメチル	1		1		キャベツ(1)					
	ピリメタニル	1							1	オレンジ(1)	
	フルトラニル プロピコナゾール	1 1		1		さといも(1)			1	レモン(1)	
	小計	357	63	56	2		226	2	8		
	殺虫剤	クロルフェナビル	39	19	9		えんさい(1)、オクラ(1)、かぼちゃ(1)、キャベツ(2)、きゅうり(4)、しゅんぎく(1)、チンゲン菜(4)、トマト(4)、なす(8)、みつば(1)、モロヘイヤ(1)	11			いちじく(6)、かき(2)、なし(2)、ぶどう(1)
		エトフェンブロックス	23	20	3		赤しそ(1)、いんげん(3)、えだまめ(4)、オクラ(1)、きゅうり(2)、小松菜(1)、だいこん類の根(3)、なす(4)、はくさい(2)、モロヘイヤ(1)、大和まな(1)				
トルフェンピラド		17	12	4		えんさい(1)、えんどう(1)、トマト(1)、なす(6)、ねぎ(4)、はくさい(2)、レタス(1)	1			はっさく(1)	
ホステアゼート		10	4	6		小松菜(1)、だいこん類の根(5)、とうがん(1)、にんじん(2)、ピーマン(1)					
ベルメトリン		9	8			オクラ(3)、小松菜(1)、なす(2)、ねぎ(2)	1			ぶどう(1)	
フェンプロバトリン ダイアジノン		8 7	2 4			なす(2) 小松菜(1)、ごぼう(2)、しゅんぎく(1)、だいこん類の葉(1)、ねぎ(1)	5	1	1	オレンジ(1)、かき(5) ぶどう(1)	
ピリダベン		7	2	3		きゅうり(1)、とうがん(1)、トマト(2)、ピーマン(1)	1		1	かき(1)、レモン(1)	
ブプロフェジン		7	2	1		しゅんぎく(1)、トマト(2)	4			かき(4)	
クロルピリホス ピフェントリン		6 6		2		さつまいも(1)、だいこん類の根(1)	6			4 なし(6)	
フェンバレート エトキサゾール		6 5	3 1	2		キャベツ(1)、なす(1)、はくさい(2)、ロメインレタス(1) なす(1)	1 4			かき(1) いちご(4)	
クロチアニジン		5		1		はくさい(1)	2		2	オレンジ(2)、かき(1)、ぶどう(1)	
テブフェンピラド		5	2			なす(2)	3			いちご(2)、かき(1)	
フェントロチオン プロチオホス		5 5	5 5			えだまめ(2)、さといも(1)、モロヘイヤ(2)	5			うめ(1)、かき(4)	
シベルメトリン		4	3			ねぎ(1)、ほうれんそう(1)、みずな(1)	1			かき(1)	
シラフルオフェン メチダチオン		4 4					4 3	1		かき(4) うめ(2)、蒲見(1)、はっさく(1)	
イミダクロプリド チアクロプリド		3 3	2	1		なす(2)、はくさい(1)	3			いちご(3)	
ピリプロキシフェン マラチオン		3 3	2			えだまめ(1)、ねぎ(1)			3	オレンジ(2)、グレープフルーツ(1)	
チアメトキサム		2		1	1	かぼちゃ(1)、はくさい(1)			1	グレープフルーツ(1)	
テトラジホソ		2					2			いちご(2)	
クロマフェノジド シハロトリン		1 1	1			なす(1)			1	かき(1)	
テフルトリン	1	1			ほうれんそう(1)						
フェントエート	1	1			ねぎ(1)						
ベンディメタリン	1	1			ねぎ(1)						
小計	203	95	35	1		58	2	12			
除草剤	トリフルラリン	1	1	0	0	小松菜(1)	0	0	0		
小計	1	1	0	0		0	0	0			
合計	561	159	91	3		284	4	20			

表4 産地別の検出率内訳

項目	産地	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	2022	計
検査農産物数	奈良県産	142	181	166	171	159	155	159	157	109	122	1521
	他府県産	49	34	44	47	49	53	50	34	25	42	427
	輸入品	2	2	2	2	5	5	6	4	4	4	36
検出農産物数	奈良県産	24	32	32	48	45	35	25	18	29	26	314
	他府県産	14	4	3	9	4	12	9	8	2	9	74
	輸入品	1	1	2	0	3	2	4	2	3	3	21
検出率[%]	奈良県産	16.9	17.7	19.3	28.1	28.3	22.6	15.7	11.5	26.6	21.3	
	他府県産	28.6	11.8	6.8	19.1	8.2	22.6	18.0	23.5	8.0	21.4	
	輸入品	50.0	50.0	100.0	0.0	60.0	40.0	66.7	50.0	75.0	75.0	

表5 検出農産物の内訳(2013年度～2022年度)

種別	農産物名	検出検体数	検出項目数	殺虫剤			殺菌剤			除草剤			検出農薬
				奈良県	他府県	輸入	奈良県	他府県	輸入	奈良県	他府県	輸入	
野菜	なす	32	48	29			19						アゾキシストロビン(4)、イミダクロプリド(2)、エトキサゾール(1)、エトフェンプロックス(4)、クレゾキシムメチル(6)、クロマフェノジド(1)、クロルフェナビル(8)、シフルフェナミド(3)、テブフェンピラド(2)、トルフェンピラド(6)、フェナリモル(1)、フェンバレレート(1)、フェンプロバトリン(2)、プロシミドン(1)、ベルメトリン(2)、ミクロブタニル(4)
	トマト	23	32	6	3		19	4					アゾキシストロビン(7)、クロルフェナビル(4)、ジエトフェンカルブ(3)、ジフェノコナゾール(1)、トルフェンピラド(1)、ビリダベン(2)、フルジオキシニル(3)、プロシミドン(5)、プロフェジン(2)、ボスカリド(4)
	はくさい	18	22	6	3		1	12					アゾキシストロビン(1)、イミダクロプリド(1)、エトフェンプロックス(2)、クロチアニジン(1)、チアメトキサム(1)、トルフェンピラド(2)、ピラクロストロビン(1)、フェンバレレート(2)、ボスカリド(1)
	ねぎ	17	24	11			12	1					アゾキシストロビン(6)、クレゾキシムメチル(2)、シベルメトリン(1)、シメコナゾール(1)、ダイアジノン(1)、トルフェンピラド(4)、フェントエート(1)、ベルメトリン(1)、ペンディメタリン(1)、マラチオン(1)、ミクロブタニル(1)
	きゅうり	17	21	5	2		2	12					アゾキシストロビン(5)、エトフェンプロックス(2)、クロルフェナビル(4)、ジエトフェンカルブ(2)、トリフオキシストロビン(1)、ビリダベン(1)、プロシミドン(6)
	だいこん類の根	9	9	5	4								エトフェンプロックス(3)、クロルピリホス(1)、ホスチアゼート(5)
	いんげん	8	9		3			5	1				アゾキシストロビン(4)、エトフェンプロックス(3)、トリアジメノール(1)、プロシミドン(1)
	こまつな	7	8	4			3			1			アゾキシストロビン(3)、エトフェンプロックス(1)、ダイアジノン(1)、トリフルラン(1)、ベルメトリン(1)、ホスチアゼート(1)
	キャベツ	6	6		3			3					クロルフェナビル(2)、トルコホスメチル(1)、フェンバレレート(1)、プロシミドン(2)
	オクラ	6	6	5				1					アゾキシストロビン(1)、エトフェンプロックス(1)、クロルフェナビル(1)、ベルメトリン(3)
	えだまめ	6	7	7									エトフェンプロックス(4)、フェニトロチオン(2)、マラチオン(1)
	ピーマン	6	12		2		2	8					アゾキシストロビン(3)、ビリダベン(1)、プロシミドン(5)、ホスチアゼート(1)、ミクロブタニル(2)
	チンゲン菜	5	5		4		1						オキサジキシル(1)、クロルフェナビル(4)
	ほうれんそう	4	4	2			2						シベルメトリン(1)、テフルトリン(1)、ボスカリド(2)
	モロヘイヤ	4	6	4			2						アゾキシストロビン(2)、エトフェンプロックス(1)、クロルフェナビル(1)、フェニトロチオン(2)
	レタス	3	3		2			1					トルフェンピラド(1)、フェンバレレート(1)、ボスカリド(1)
	かぼちゃ	3	3	1		1		1					クロルフェナビル(1)、チアメトキサム(1)、テトラコナゾール(1)
	さといも	2	2	1				1					フェニトロチオン(1)、フルトラニル(1)
	ごぼう	2	2		2								ダイアジノン(2)
	にんじん	2	2	1	1								ホスチアゼート(2)
	えんさい	2	2	2									クロルフェナビル(1)、トルフェンピラド(1)
	みつば	2	2		1			1					クロルフェナビル(1)、プロシミドン(1)
	ししとう	1	1					1					ミクロブタニル(1)
	とうがん	1	3		2			1					クレゾキシムメチル(1)、ビリダベン(1)、ホスチアゼート(1)
	みずな	1	1	1									シベルメトリン(1)
甘とうがらし	1	1				1						クレゾキシムメチル(1)	
だいこん類の葉	1	1	1				1					ダイアジノン(1)	
じゃがいも	1	1					1					プロシミドン(1)	
大和まな	1	1	1									エトフェンプロックス(1)	
えんどう	1	2		1			1					クレゾキシムメチル(1)、トルフェンピラド(1)	
さつまいも	1	1		1								クロルピリホス(1)	
ラディキオ	1	1							1			ボスカリド(1)	
しゅんぎく	1	3	3									クロルフェナビル(1)、ダイアジノン(1)、プロフェジン	
ニラ	1	1					1					クレゾキシムメチル(1)	
赤しそ	1	1	1									エトフェンプロックス(1)	
小計	197	253	96	34	1	65	54	2	1	0	0		
果実	いちご	82	133	11			122						アゾキシストロビン(14)、エトキサゾール(4)、クレゾキシムメチル(19)、ジエトフェンカルブ(1)、シフルフェナミド(8)、シメコナゾール(16)、チアクロプリド(3)、テトラコナゾール(1)、テトラジホン(2)、テブフェンピラド(2)、フェナリモル(3)、フルジオキシニル(2)、プロシミドン(35)、ボスカリド(3)、ミクロブタニル(20)
	かき	57	76	25			51						クレゾキシムメチル(2)、クロチアニジン(1)、クロルフェナビル(2)、シハロトリン(1)、ジフェノコナゾール(45)、シベルメトリン(1)、シラフルオフェン(4)、テブコナゾール(4)、テブフェンピラド(1)、ビリダベン(1)、フェンバレレート(1)、フェンプロバトリン(5)、プロフェジン(4)、プロチオホス(4)
	うめ	31	37	3			34						クレゾキシムメチル(10)、ジフェノコナゾール(17)、テブコナゾール(2)、ピテルタノール(5)、プロチオホス(1)、メチダチオン(2)
	オレンジ	9	9			6			3				クロチアニジン(2)、クロルピリホス(1)、ビリプロキシフェン(2)、ビリメタニル(1)、フェンプロバトリン(1)、フルジオキシニル(2)
	いちじく	8	12	6			6						アゾキシストロビン(6)、クロルフェナビル(6)
	ぶどう	7	12	3	1		6	2					アゾキシストロビン(4)、クロチアニジン(1)、クロルフェナビル(1)、クレゾキシムメチル(1)、ダイアジノン(1)、テブコナゾール(3)、ベルメトリン(1)
	なし	7	15	8			7						アゾキシストロビン(1)、クレゾキシムメチル(2)、クロルフェナビル(2)、シプロジニル(1)、ジフェノコナゾール(1)、ピフェントリン(6)、ピラクロストロビン(1)、ボスカリド(1)
	レモン	5	7			2			5				アゾキシストロビン(2)、クロルピリホス(1)、ビリダベン(1)、フルジオキシニル(2)、プロピコナゾール(1)
	バナナ	2	2			2							クロルピリホス(2)
	グレープフルーツ	2	2			2							ビリプロキシフェン(1)、マラチオン(1)
	清見	1	1		1								メチダチオン(1)
	はっさく	1	2	2									トルフェンピラド(1)、メチダチオン(1)
	小計	212	308	58	2	12	226	2	8	0	0	0	
合計	409	561	154	36	13	291	56	10	1	0	0		

産地別に各年度の検出率を比較したところ、県内産では 11.5%～28.3%、他府県産では 6.8%～28.6%であった。他府県産に比べ県内産の検査農産物数は 3～4 倍程度多いが、検出率には大きな差は見られなかったことから、県内産農産物の安全性は他府県と同等程度であると考えられた。また、輸入品において検出率は 0%～100%であった。これは検査農産物数が少ないため、検出率に大きく幅が出てしまったと考えられる。

2) 検出農産物の内訳

2013 年度から 2022 年度までの 10 年間で検出があった農産物の内訳を調査し、表 5 に示した。検出農産物は 47 種であり、検出数上位 5 農産物はいちご (82 検体) が最も多く、以下、かき (57 検体)、なす (32 検体)、うめ (31 検体) およびトマト (23 検体) と続いた。検出数上位 5 農産物の検出数 225 は総検出農産物数の 55.0%を占めていた。

4. 検出頻度が高い農産物および農薬

10 年間における検出農産物数が 10 以上となる野菜類および果実類について表 6 に示した。ここで示す検出率は、当該農産物について検査した農産物数に対する検出した農産物数とした。また、検出割合については、対象とする作物から検出された延べ農薬数のうち対象とする農薬の検出数の割合として算出した。

検出農産物数が 10 以上である野菜類はなす (32 検体)、トマト (23 検体)、はくさい (18 検体)、ねぎ (17 検体) およびきゅうり (17 検体) の 5 種であり、野菜類の検出農産物数 197 のうち 54.3%を占めた。一方、果実類はいちご (82 検体)、かき (57 検体) およびうめ (31 検体) の 3 種であり、果実類の検出農産物数 212 のうち 80.2%を占めた。

検出農薬のうち、検出農産物数 10 以上の野菜類および果実類のいずれにおいても検出割合が 10%以上であった農薬はアゾキシストロビン、プロシミドンおよびクレソキシムメチルであった。内訳はアゾキシス

トロビンがトマト (7 検体)、ねぎ (9 検体)、きゅうり (5 検体) およびいちご (14 検体) で、プロシミドンがトマト (5 検体)、きゅうり (6 検体) およびいちご (35 検体) で、クレソキシムメチルがなす (6 検体)、いちご (19 検体) およびうめ (10 検体) であった。また、これらの農薬は 2. 検出農薬の内訳で示した検出農薬項目の検出数のうち、1 位、3 位および 4 位にそれぞれ該当した。

アゾキシストロビン、プロシミドンおよびクレソキシムメチルはうどんこ病等の防除に用いられる。うどんこ病は最も重要な病害の一つで、葉裏の一部にうどん粉をまぶしたような白い粉状のカビが発生し、次第に株全体に広がるというものである。これは一度病気が広がると完全防除が困難であり、果実等に発生すると商品価値がなくなってしまうため、薬剤散布を中心とした防除が行われている¹²⁾。

5. 複数検出事例

同一検体から複数農薬を検出した農産物を表 7 に示した。また、野菜類および果実類の同一検体からの検出した農薬数と検出した農産物の割合を図 2 に示した。野菜類および果実類ともに、1 種類のみ農薬を検出した事例が多く、2 種類、3 種類検出した事例は少なくなる傾向にあった。一方、検出した農薬の種類数に関わらず果実類の方が 3 倍以上高い割合となった。

そこで、果実類の検出数上位 3 農産物 (いちご、かきおよびうめ) について同一検体からの同時検出項目数の検体数内訳を比較したものを図 3-1 から 3-3 に示した。いちごでは同一検体より 4 項目または 3 項目の同時検出が調査期間 10 年間のうち 7 年間でみられた。かきでは同一検体から 3 項目の同時検出が 10 年間のうち 3 年間みられた。一方、うめでは 3 項目以上の同時検出はなかった。

表 6 検出頻度が高い農産物および農薬内訳 (2013 年度～2022 年度)

作物名	検査農産物数	検出農産物数	検出率 [%]	検出農薬種数	検出項目数	検出割合				
						10%以上20%未満	20%以上30%未満	30%以上40%未満	40%以上50%未満	50%以上
なす	164	32	19.5	16	48	クレソキシムメチル クロルフェナビル トルフェンピラド				
トマト	99	23	23.2	10	32	クロルフェナビル プロシミドン ボスカリド	アゾキシストロビン			
はくさい	90	18	20.0	9	22					ボスカリド
ねぎ	49	17	34.7	11	24		アゾキシストロビン			
きゅうり	69	17	24.6	7	21	クロルフェナビル	アゾキシストロビン プロシミドン			
いちご	140	82	58.6	15	133	アゾキシストロビン クレソキシムメチル シメコナゾール ミクロブタニル	プロシミドン			
かき	182	57	31.3	14	76					ジフェノコナゾール
うめ	56	31	55.4	6	37	ピテルタノール	クリソキシムメチル			ジフェノコナゾール

表7 複数検出事例（2013年度～2022年度）

年度	農産物	農薬	検出濃度 [ppm]	年度	農産物	農薬	検出濃度 [ppm]	年度	農産物	農薬	検出濃度 [ppm]		
2013	いちご	ミクロブタニル	0.1	2017	いちご	クレソキシムメチル	0.01	2020	いちご	シメコナゾール	0.08		
		プロシミドン	0.35			いちご	プロシミドン		0.08		いちご	プロシミドン	0.17
	いちご	ミクロブタニル	0.04			いちご	クレソキシムメチル		0.11		いちご	クレソキシムメチル	0.02
		プロシミドン	0.49				シメコナゾール		0.04			プロシミドン	0.11
	うめ	クレソキシムメチル	0.53				テトラジホン		0.08		いちご	クレソキシムメチル	0.04
		ピテルタノール	0.12				プロシミドン		0.25			ミクロブタニル	0.04
	かき	ジフェノコナゾール	0.04			いちご	フェナリモル		0.01		いちご	クレソキシムメチル	0.03
		プロチオホス	0.02				プロシミドン		0.03			プロシミドン	0.37
	かき	ジフェノコナゾール	0.01			いちご	テブフェンピラド		0.08		いちじく	アゾキシストロビン	0.05
		シベルメトリン	0.03				プロシミドン		0.07			クロルフェナビル	0.01
	とうがん	クレソキシムメチル	0.02			いちご	シフルフェナミド		0.02		かき	シラルフオフェン	0.04
		ピリダベン	0.02				シメコナゾール		0.23			テブコナゾール	0.01
		ホスチアゼート	0.06			いちご	アゾキシストロビン		0.01		しゅんぎく	クロルフェナビル	0.09
	トマト	ジエトフェンカルブ	0.01				シメコナゾール		0.09			ダイアジノン	0.06
	トルフェンピラド	0.01			ミクロブタニル	0.02			プロブフェジン	0.03			
	シベルメトリン	0.07		いちご	アゾキシストロビン	0.06		ねぎ	アゾキシストロビン	0.18			
	トルフェンピラド	0.02			シフルフェナミド	0.02			クレソキシムメチル	0.33			
2014	いちご	クレソキシムメチル	0.07	2018	いちじく	アゾキシストロビン	0.1	2021	いちご	ジエトフェンカルブ	0.07		
		プロシミドン	0.05			いちご	クレソキシムメチル		0.04		いちご	ミクロブタニル	0.06
	いちご	クレソキシムメチル	0.2			かき	ジフェノコナゾール		0.02			クレソキシムメチル	0.11
		プロシミドン	0.03				プロブフェジン		0.02			シフルフェナミド	0.04
	いちご	クレソキシムメチル	0.22			かき	クレソキシムメチル		0.01			ミクロブタニル	0.02
		フェナリモル	0.02				ジフェノコナゾール		0.05		いちじく	アゾキシストロビン	0.11
		プロシミドン	0.06			なし	クロルフェナビル		0.01			クロルフェナビル	0.02
	かき	ミクロブタニル	0.11			なし	シプロジニル		0.01			アゾキシストロビン	0.11
		テブフェンピラド	0.01				クレソキシムメチル		0.06			クロルフェナビル	0.02
		プロチオホス	0.01				ジフェノコナゾール		0.04		かき	ジフェノコナゾール	0.02
	かき	フェンバレレート	0.01				ピフエントリン		0.01			テブコナゾール	0.01
		ジフェノコナゾール	0.01			きゅうり	アゾキシストロビン		0.01		小松菜	アゾキシストロビン	0.23
	ぶどう	アゾキシストロビン	0.04				クロルフェナビル		0.06			エトフェンプロックス	0.38
		ダイアジノン	0.01			トマト	アゾキシストロビン		0.11		トマト	プロシミドン	0.03
	テブコナゾール	0.02			プロブフェジン	0.02			フルジオキソニル	0.01			
えだまめ	フェニトロチオン	0.03		トマト	アゾキシストロビン	0.02			ボスカリド	0.04			
	マラチオン	0.02			クロルフェナビル	0.02		トマト	ジエトフェンカルブ	0.02			
きゅうり	トリフロキシストロビン	0.03			ジフェノコナゾール	0.02			フルジオキソニル	0.01			
	プロシミドン	0.01			エトフェンプロックス	0.02		なす	クレソキシムメチル	0.1			
なす	シフルフェナミド	0.01		なす	クレソキシムメチル	0.02			クロルフェナビル	0.04			
	ミクロブタニル	0.08		なす	クロマフェノジド	0.05		2022	いちご	クレソキシムメチル	0.2		
	シフルフェナミド	0.01			フェナリモル	0.02				シフルフェナミド	0.02		
なす	シフルフェナミド	0.01			フェナリモル	0.02				ミクロブタニル	0.03		
	エトキサゾール	0.01		なす	クレソキシムメチル	0.03				ジフェノコナゾール	0.02		
なす	トルフェンピラド	0.06			トルフェンピラド	0.02			かき	ジフェノコナゾール	0.02		
	フェンバレレート	0.01			トルフェンピラド	0.02				ピリダベン	0.03		
ねぎ	フェントエート	0.02		白菜	フェンバレレート	0.05				プロチオホス	0.03		
	マラチオン	0.01		2019	いちご	アゾキシストロビン	0.06			トマト	フルジオキソニル	0.02	
2015	いちご	アゾキシストロビン	0.04				エトキサゾール		0.05			ボスカリド	0.01
		シメコナゾール	0.03			いちご	シメコナゾール		0.01		なし	クロルフェナビル	0.01
		ミクロブタニル	0.06				シメコナゾール		0.04			ピフエントリン	0.01
	いちご	シメコナゾール	0.02			いちご	シメコナゾール		0.01			ピラクロストロビン	0.01
		プロシミドン	0.15				プロシミドン		0.02			ボスカリド	0.02
	いちご	シメコナゾール	0.03			いちご	シフルフェナミド		0.03		ねぎ	アゾキシストロビン	0.49
		ミクロブタニル	0.01				チアクロプリド	0.03			ダイアジノン	0.02	
	いちご	シメコナゾール	0.01			うめ	クレソキシムメチル	0.01		ねぎ	アゾキシストロビン	0.12	
		シフルフェナミド	0.01				テブコナゾール	0.02			ベルメトリン	0.09	
		プロシミドン	0.04			うめ	クレソキシムメチル	0.12		白菜	ピラクロストロビ	0.02	
		クレソキシムメチル	0.07				テブコナゾール	0.06			ボスカリド	0.07	
	いちご	エトキサゾール	0.05			かき	ジフェノコナゾール	0.02		ピーマン	プロシミドン	0.01	
		チアクロプリド	0.3				フェンプロバトリン	0.07			ミクロブタニル	0.02	
	いちご	アゾキシストロビン	0.07		かき	ジフェノコナゾール	0.03		ぶどう	テブコナゾール	0.04		
	プロシミドン	0.12			テブコナゾール	0.06			ベルメトリン	0.04			
いちご	クレソキシムメチル	0.02		かき	ジフェノコナゾール	0.03		レモン	アゾキシストロビン	1.8			
	プロシミドン	0.12			フェンプロバトリン	0.04			フルジオキソニル	0.7			
うめ	ジフェノコナゾール	0.01		かき	クロルフェナビル	0.01			プロビコナゾール	0.32			
	ピテルタノール	0.03			ジフェノコナゾール	0.01							
かき	プロブフェジン	0.01			プロブフェジン	0.02							
	プロチオホス	0.01		なし	アゾキシストロビン	0.01							
なす	エトフェンプロックス	0.01			クレソキシムメチル	0.03							
	トルフェンピラド	0.01			ピフエントリン	0.02							
ねぎ	アゾキシストロビン	0.02		はっさく	トルフェンピラド	0.05							
	トルフェンピラド	0.06			メチダチオン	0.35							
	ベルメトリン	0.04		きゅうり	ジエトフェンカルブ	0.02							
2016	いちご	シフルフェナミド	0.02			プロシミドン	0.19						
		プロシミドン	0.3		なし	クロルフェナビル	0.12						
		ミクロブタニル	0.09			フェンプロバトリン	0.05						
	いちご	エトキサゾール	0.41		ピーマン	ピリダベン	0.08						
		シメコナゾール	0.09			プロシミドン	0.08						
		フェナリモル	0.06			ホスチアゼート	0.01						
		ミクロブタニル	0.02		未成熟えんどう	クレソキシムメチル	0.01						
	いちご	シメコナゾール	0.02			トルフェンピラド	0.03						
		ミクロブタニル	0.04		2019	いちご	アゾキシストロビン	0.31					
	いちご	アゾキシストロビン	0.04				プロシミドン	0.13					
		クレソキシムメチル	0.01			いちご	シフルフェナミド	0.01					
		アゾキシストロビン	0.06				プロシミドン	0.32					
	いちじく	クロルフェナビル	0.02			いちご	クレソキシムメチル	0.17					
		うめ	クレソキシムメチル	0.23				プロシミドン	0.56				
	メチダチオン	0.01		ぶどう		クレソキシムメチル	0.14						
うめ	クレソキシムメチル	0.01				デブコナゾール	0.07						
	プロチオホス	0.03				クロチアニジン	0.15						
かき	クロルフェナビル	0.01		きゅうり		ジエトフェンカルブ	0.07						
	ジフェノコナゾール	0.01				プロシミドン	0.53						
	プロブフェジン	0.02		なし		クレソキシムメチル	0.02						
かき	ジフェノコナゾール	0.03				ミクロブタニル	0.01						
	フェンプロバトリン	0.04		白菜		アゾキシストロビン	0.01						
トマト	ジエトフェンカルブ	0.01			イミダクロプリド	0.03							
	プロシミドン	0.02		白菜	チアメトキサム	0.03							
	ベルメトリン	0.02			ボスカリド	0.04							
	ミクロブタニル	0.01		ピーマン	アゾキシストロビン	0.02							
なす	クレソキシムメチル	0.01			プロシミドン	0.05							
	クロルフェナビル	0.01		ピーマン	アゾキシストロビン	0.18							
なす	エトフェンプロックス	0.04			プロシミドン	0.01							
	クレソキシムメチル	0.01											
なす	アゾキシストロビン	0.11											
	クロルフェナビル	0.06											
	シフルフェナミド	0.02											
	トルフェンピラド	0.01											
ピーマン	アゾキシストロビン	0.01											
	プロシミドン	0.06											
モロヘイヤ	アゾキシストロビン	0.02											
	フェニトロチオン	0.02											
未成熟いんげん	エトフェンプロックス	0.01											
	プロシミドン	0.38											

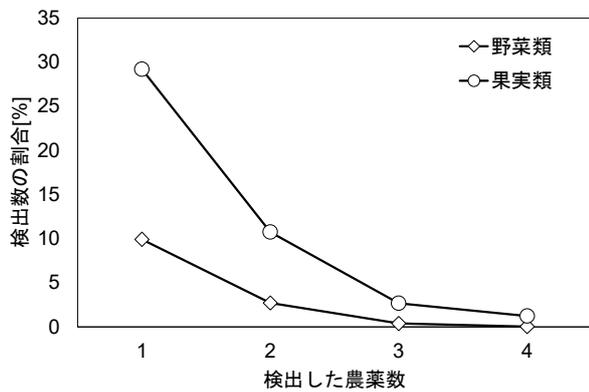


図2 複数の農薬を検出した農産物の割合

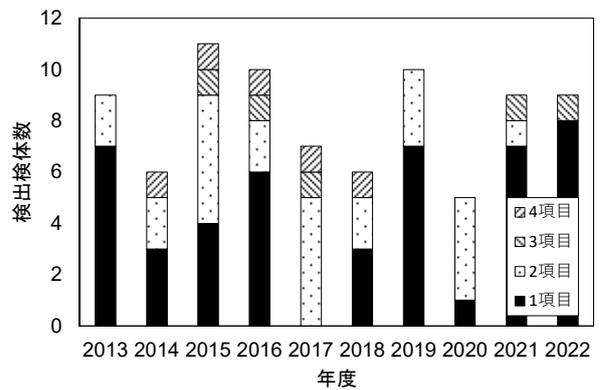


図3-1 いちごから検出した農薬数の推移

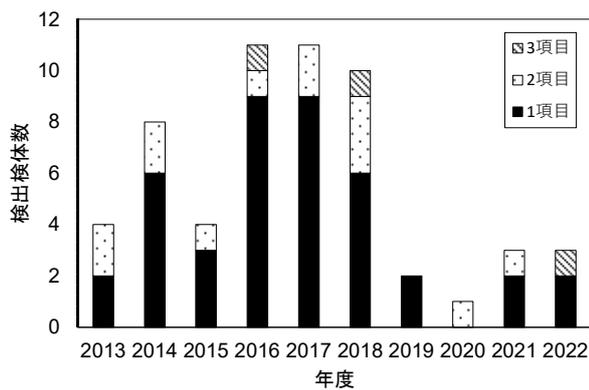


図3-2 かきから検出した農薬数の推移

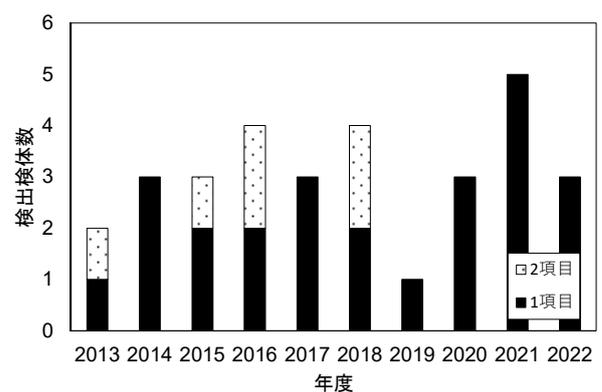


図3-3 うめから検出した農薬数の推移

表8 基準値超過事例

年度	品名	農薬	検出濃度 [ppm]	基準値 [ppm]
2013	さといも	フルトラニル	0.06	0.01
2016	うめ	プロチオホス	0.03	0.01
2017	えんさい	トルフェンピラド	0.10	0.01
2020	しゅんぎく	ダイアジノン プロプロフェジン	0.06 0.03	0.01
2021	小松菜	エトフェンプロックス	0.38	0.01

表9 違反率の比較

年度	総検査 検体数	総検査 項目数	基準値超過 検体数	基準値超過 項目数	違反率[%]	
					vs.検体数	vs.項目数
2005年度～2012年度	923	101933	5	6	0.54	0.0059
2013年度～2022年度	1984	246930	5	6	0.25	0.0024

6. 基準値超過事例

調査期間 10 年間に残留基準値を超過した事例を表 8 に示した。10 年間で 5 検体の基準値超過があった。基準値超過検体の中で果実類は 2016 年度のうめ 1 検体のみであり、複数項目の基準値超過は 2020 年度のしゅんぎく 1 検体のみであった。また、すべての検体において一律基準値 0.01 ppm に対する超過であった。

2013 年度から 2022 年度までの 10 年間の違反率と 2013 年度以前のポジティブリスト制度施行期間にあ

たる 2006 年度から 2012 年度までの 7 年間の違反率を表 9 に示した。制度施行直後の 7 年間でさらにその後 10 年間について比較したところ、違反率は低下しており、農薬の適正使用遵守が継続されていると考えられる。

まとめ

2013 年度から 2022 年度までの 10 年間に収去され、当センターで残留農薬検査を実施した農産物の検査結

果より、奈良県内における農薬検出状況を比較・調査したことで以下のことが明らかになった。

1. 各年度の残留農薬の検出率を比較したところ、調査期間の10年間で大きな変化はなかった。
2. 検出農薬上位5農薬（アゾキシストロビン、ジフェノコナゾール、プロシミドン、クレソキシムメチルおよびクロルフェナピル）が農薬検出数の約50%を占めた。
3. 果実類の検出農産物は主に奈良県の特産品であるいちご、かきおよびうめであった。
4. 検査検体数および検査項目数に対する違反率に極端な増加はなかったことから、県内での適切な農薬の使用遵守が継続されていることが示唆された。

文 献

- 1) 伊吹幸代, 植田直隆, 宇野正清: 奈良県保健環境研究センター年報, 40, 77-81 (2005)
- 2) 山下浩一: 奈良県保健環境研究センター年報, 46, 58-61 (2011)
- 3) 山下浩一, 西山隆之, 北岡洋平, 他: 奈良県保健研究センター年報, 49, 35-37 (2013)
- 4) 米田正樹, 南浦茉奈, 北岡洋平, 他: 奈良県保健研究センター年報, 53, 53-56 (2018)
- 5) 竹田依加, 米田正樹, 南浦茉奈, 他: 奈良県保健研究センター年報, 55, 47-55 (2020)
- 6) 花岡良信, 石原祐治, 清水修二, 他: 長野県環境保全研究所年報, 12, 35-42 (2010)
- 7) 大垣有紀, 川合啓之, 林克弘, 他: 三重県保健環境研究所年報, 12, 35-42 (2010)
- 8) 垣田雅史, 日比和美, 林孝子, 他: 神奈川県衛生研究所研究報告, 46, 53-56 (2016)
- 9) 萬年美穂子, 佐田厚史: 山形県衛生研究所報, 50, 6-9 (2017)
- 10) 中山隆, 小山和志, 丸山起人, 他: 長野県環境保全研究所研究報告, 14, 43-48 (2018)
- 11) 立原幹子, 海老根佐智子, 山形明広, 他: 茨城県衛生研究所年報, 57, 52-56 (2019)
- 12) 芳田侃大: 奈良県農業研究開発センターニュース, 156, 3 (2019)

奈良県における腸管出血性大腸菌検出状況：2023年

築山結衣・井ノ上美紅・足立有彩・佐伯美由紀・田邊純子

Prevalence of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Detected in Nara Prefecture, 2023

Yui TSUKIYAMA・Miku INOUE・Arisa ADACHI・Miyuki SAEKI and Sumiko TANABE

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分子疫学解析を実施し、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、2023年1月から2023年12月の間に奈良県で届出され搬入された EHEC 感染症患者由来株と、当センターで分離した 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。

方法

1. 材料

2023年1月から2023年12月の間に奈良県で報告された EHEC 感染者は30例あり、内6例は当センターの接触者検便で菌を検出した。保健所等から搬入された24株と合わせて EHEC 30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. 血清型別及び志賀毒素 (Stx) 型別

血清型別は、病原大腸菌免疫血清「生研」(デンカ)を使用した。また、市販製品で同定できなかった菌株の血清型別については、感染研に依頼した。

Stx 型別は、Cebula ら¹⁾のプライマーによる PCR で遺伝子を確認し、また Scheutz ら²⁾のプライマーによる PCR で *stx* サブタイプ遺伝子 (*stx1a*, *stx1c*, *stx1d*, *stx2a*, *stx2b*, *stx2c*, *stx2d*, *stx2e*, *stx2f* 及び *stx2g*) の保有状況を調査した。

3. 薬剤感受性試験

CLSI 法に準拠し、ディスク拡散法による薬剤感受性試験を実施した。供試薬剤は、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薬剤とした。CPDXを除く11薬剤については、センシ・ディスク (BD) を用い、CPDX は KB ディスク (栄研化学) を用いた。

4. 分子疫学解析

O26, O103 及び O157 株については、感染研に反復配列多型解析 (MLVA) 法による解析を依頼し、結果の情報提供をうけた。他の株については、感染研に PFGE 法による解析を依頼した。

結果

1. 腸管出血性大腸菌の検出状況

月別では、6月、8月、9月の各7株 (23.3%) が最も多く、6~9月に23株 (76.7%) と例年同様、夏期に多かった (図1)。年齢は1歳から91歳までと幅広く、性別で見ると男性16人、女性14人であった (図2)。

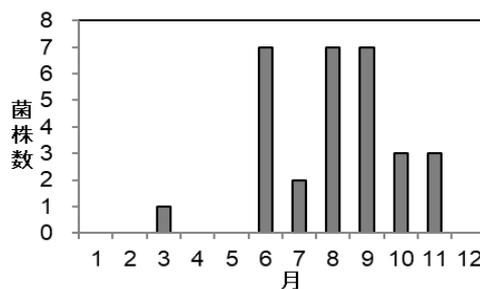


図1 月別検出状況

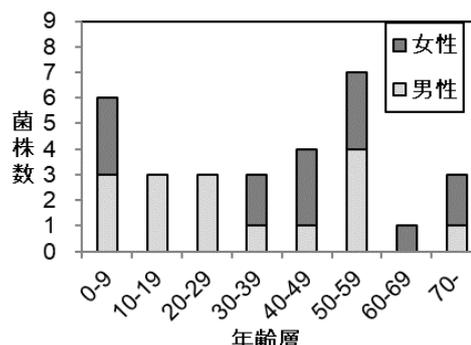


図2 年齢別・性別検出状況

2. 臨床症状

対象とした EHEC 30 株における感染者の臨床症状を見ると、O157 感染者 18 例中 13 例が有症で、下痢 (13 例)、血便 (13 例) が多く、他は腹痛 (12 例)、発熱 (4 例)、嘔吐または嘔気 (1 例) であった。O26 感染者 6 例中 3 例と O186 感染者 1 例はいずれも有症で血便が見られた。O81 感染者 2 例中 1 例が有症で、血便は見られなかった。O63 感染者 1 例と O103 感染者 1 例、O115 感染者 1 例は無症状病原体保有者であった。溶血性尿毒症候群 (HUS) 発症例はなかった。

3. 血清型・毒素型

O 血清群は 7 種類あり、O157 が 18 株 (60.0%) と最も多く、全て O157:H7 であった。O26 は 6 株 (20.0%) あり、5 株が O26:H11、1 株が O26:H- であった。他に O81:H31 が 2 株あり、O63:H6、O103:H2、O115:H10 及び O186:H2 が各 1 株あった。

毒素型は、O157 は Stx1&2 が 4 株、Stx2 単独が 14 株であった。O26、O103 及び O115 は全ての株が Stx1 単独であり、O63、O81 及び O186 は全ての株が Stx2 単独であった。stx サブタイプ遺伝子は、O157 は 13 株が *stx2a+stx2c*、4 株が *stx1a+stx2c*、1 株が *stx2c* を保有しており、O26、O103 及び O115 は全て *stx1a* を保有していた。また、O63 は *stx2f* を保有、O81 は *stx2d* を保有、O186 は *stx2a* を保有していた。*stx1c*、*stx1d*、*stx2b*、*stx2e* 及び *stx2g* は検出されなかった (表 1)。

4. 薬剤感受性試験

1 剤以上に耐性の菌株は 10 株あり、5 剤耐性が O157 に 1 株、4 剤耐性が O157 に 5 株、3 剤耐性が O157 に 1 株、2 剤耐性が O26 に 3 株見られた。O63、O81、O103、O115 及び O186 の菌株は 12 薬剤に感受性を

表 2 薬剤感受性試験

O血清群	耐性	耐性薬剤名	菌株数
O157	5剤	ABPC, SM, TC, ST, CP	1
	4剤	SM, TC, ST, CP	5
	3剤	SM, TC, ST	1
	なし	-	11
O26	2剤	SM, TC	3
	なし	-	3
O63	なし	-	1
O81	なし	-	2
O103	なし	-	1
O115	なし	-	1
O186	なし	-	1

示した (表 2)。

5. 分子疫学解析

MLVA 法の結果、O157 の 18 株は 10 種類の MLVA type に分類され、2 株以上で一致した MLVA type は 3 種類あった。そのうち 2 種類の MLVA type ではそれぞれ疫学的関連性があり、1 種類の MLVA type は一部の菌株間で疫学的関連性が見られた。

また、O26 菌株 6 株は 3 種類の MLVA type に分類され、2 株以上で一致した MLVA type は 2 種類あり、これらはいずれも同居家族など疫学的に関連性のある菌株であった。

考 察

全国における 2023 年 1 月から 12 月までの EHEC 感染症報告数は 3,822 例あった³⁾。奈良県においては 2023 年 1 月から 2023 年 12 月の間に 30 例の報告があり、前年の 28 例より増加した。

分子疫学解析の結果より、関連性が疑われた株の集積が 2 事例あった。1 つは、初発患者が小規模保育事

表 1 血清型と毒素型

血清型	Stx型	菌株数	stxサブタイプ						
			1a	1a + 2a	2a	2c	2d	2f	2a + 2c
O157 : H7	Stx2	14				1			13
O157 : H7	Stx1&2	4		4					
O26 : H11	Stx1	5	5						
O26 : H-	Stx1	1	1						
O63 : H6	Stx2	1						1	
O81 : H31	Stx2	2					2		
O103 : H2	Stx1	1	1						
O115 : H10	Stx1	1	1						
O186 : H2	Stx2	1			1				
合計		30	8	4	1	1	2	1	13

業所の園児であり、接触者 45 名の検便検査によって、同じ施設の園児 1 名及びその同居家族 2 名からそれぞれ O157 を検出した。MLVA 法の結果、全て同じ MLVA type であり、分離株の遺伝学的類似性が高く、感染源は同一であると示唆された。もう 1 つの事例は、6 月から 7 月にかけて 5 名から O157 が検出された事例で、分離した 5 株の MLVA type は 23m0077 で全て一致した。5 名は疫学的関連性から 3 グループに分けられ、1 グループは焼肉店を利用していたが、その他のグループは保健所による患者調査情報では焼肉店の利用歴は不明であり、グループ間での関連性は見られなかったため、感染原因の特定には至らなかった。23m0077 は、2023 年に複数の自治体で検出された広域株であるが³⁾、未だ感染原因は特定されていない。EHEC は MLVA 法による分子疫学サーベイランスが実施されており、MLVA 法による遺伝子解析結果を一覧化し、MLVA リストとして全国で共有している。広域的な感染症や食中毒事例の早期探知、広域株の感染源や感染経路の解明のためには、分子疫学解析結果と疫学情報を併せた解析が必須であり、MLVA リストを活用して他の自治体や保健所等の関係機関と情報共有を行うことが重要である。

EHEC 感染は、患者調査情報によると、焼肉等肉料理を喫食した事例が 6 例 (20.0%) あったが、EHEC 感染者減少のためには、引き続き食肉の適切な加熱と、調理時の二次汚染防止の徹底が重要である。また、保育事業所や家庭内で二次感染した事例が 9 例 (30.0%) あった。保育事業所など乳幼児の集団生活施設では、接触感染による感染拡大が起きやすいため注意が必要であり、さらに、家庭内での二次感染を予防することも重要である。

2023 年は、O63 や O81, O186 の全国でも検出報告が稀な血清群³⁾が 4 株 (13.3%) 検出され、その中にはヒト由来株からの検出が珍しい *stx2d* や *stx2f* 保有株があった。近年、検出される O 血清群が多様化しているため、これらの性状等情報を収集・蓄積していき、今後も様々な検査に対応できるように努めていきたい。また、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医療機関等と保健所関係者の皆様、そして分子疫学解析の結果を還元して頂いた国立感染症研究所の皆様に深くお礼申し上げます。

文 献

- 1) Cebula TA, Payne WL, Feng P, *et al.* : *J. Clin. Microbiol.*, 33, 248-250 (1995)
- 2) Scheutz F, Teel LD, Beutin L, *et al.* : *J. Clin. Microbiol.*, 50, 2951-2963 (2012)
- 3) 病原微生物検出情報, 45, 71-84 (2024)

奈良県における薬剤耐性菌の遺伝子検出状況（2022～2023年）

井ノ上美紅・築山結衣・佐伯美由紀・田邊純子

Detection of the Antimicrobial-Resistant Genes in Nara Prefecture (2022-2023)

Miku INOUE・Yui TSUKIYAMA・Miyuki SAEKI and Sumiko TANABE

緒言

薬剤耐性菌とは、高濃度の抗菌薬存在下でも増殖が可能となった細菌で、近年、薬剤耐性菌による感染症が拡大している。薬剤耐性菌感染症が直接の原因となった死者数は約127万人（2019年）と推計され、関連死も含めると495万人に上り、世界的に重要な社会問題となっている¹⁾。

カルバペネム耐性腸内細菌目細菌（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目細菌の総称である。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。

バンコマイシン耐性腸球菌（vancomycin-resistant Enterococci：VRE）はバンコマイシンに対して耐性を示す腸球菌である。セフェム系薬剤やカルバペネム系薬剤、アミノグリコシド系薬剤に自然耐性を示す腸球菌による感染症において、バンコマイシンは極めて重要な抗菌薬とされている。

CRE感染症及びVRE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²⁾により、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、CRE感染症については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、VRE感染症については耐性遺伝子の検出を実施している。

今回、2022年1月から2023年12月に、奈良県で届出され搬入されたCRE感染症及びVRE感染症の菌株について、検査を実施し、結果をまとめたので報告する。

方法

1. 材料

2022年1月から2023年12月までの間に、奈良県

内の医療機関においてCRE感染症またはVRE感染症として届出され、当センターに搬入されたCRE 51株、VRE 9株について検査を実施した。なお、患者情報等は発生届に基づく。

2. CRE

1) 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（日本BD）上に、メロペネム（MEPM）とセフトアジジム（CAZ）のセンシ・ディスク（日本BD）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）を配置した。ディスク拡散法により、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³⁾。

また、KPC型カルバペネマーゼ産生性確認試験として、MEPMとセフメタゾール（CMZ）のセンシ・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³⁾。

基質特異性拡張型β-ラクタマーゼ（Extended Spectrum β-Lactamase：ESBL）産生性確認試験として、セフトアキシム（CTX）とCAZのセンシ・ディスクの間に、アモキシシリン・クラブラン酸（AMPC/CVA）及びアンピシリン・スルバクタム（ABPC/SBT）のセンシ・ディスクを配置し、CTXとCAZの阻止円径の比較と、CVA及びSBTによる阻害効果を確認した。結果については、国立感染症研究所による薬剤耐性菌研修会資料に記載の判定基準に基づき、CTX-M型、TEM型、SHV型、判定保留の判定を行った⁴⁾。

AmpC β-ラクタマーゼ（AmpC）産生性確認試験として、CMZのセンシ・ディスクとセフミノクス（CMNX）のKBディスク（栄研化学）及びAmpC活性阻害剤であるAPB 500μgを添加したCMZとCMNX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 5 mm 以上ある場合を陽性と判定した⁴⁾。

2) 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 (IMP 型, NDM 型, KPC 型, OXA-48 型), ESBL 遺伝子 (TEM 型, SHV 型, CTX-M-1 group (G), CTX-M-2 group (G), CTX-M-9 group (G)), AmpC 遺伝子 (MOX 型, CIT 型, DHA 型, ACC 型, EBC 型, FOX 型) の保有の有無を確認した^{3,6)}。

3) 薬剤耐性遺伝子の同定

カルバペネマーゼ遺伝子のうち IMP 型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を用い、ダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定し³⁾、参照配列 (GenBank Accession No. リスト: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens/refgene/#>) と比較し、薬剤耐性遺伝子を同定した。

3. VRE

1) ディスク拡散法による耐性型の推定

ミューラー-ヒントン寒天培地上に、バンコマイシン (VCM) 及びテイコプラニン (TEIC) のセンシ・ディスクを配置し、ディスク拡散法により、各薬剤ディスクの阻止円径を測定し、Clinical and Laboratory Standards Institute の判定基準に基づき、耐性 (R)、中間型 (I)、感性 (S) を判定した⁷⁾。

2) 耐性遺伝子の検出

PCR 法によりバンコマイシン耐性遺伝子 (*vanA*, *vanB*, *vanC1*, *vanC2/3*) の保有の有無を確認した^{3,8)}。

3) 菌種同定

PCR 法により *ddl* genes を確認し、*Enterococcus faecium* 及び *Enterococcus faecalis* を同定した^{3,8)}。

4) MLST 型別

菌種同定により、*E. faecium* と同定された株について、Multilocus Sequence Typing (MLST) を実施した。*E. faecium* の 7 つのハウスキーピング遺伝子 (*adh*, *atpA*, *ddl*, *gdh*, *gyd*, *purK*, *pstS*) の塩基配列をダイレクトシーケンスにより判読し⁹⁾、各遺伝子の Allele Number を決定した。7 領域の Allele Number の組み合わせにより、各株の sequence type (ST 型) を特定した。Allele Number 及び ST 型の決定には、pubMLST のデータベースを参照した (https://pubmlst.org/bigdb?db=pubmlst_efaecium_seqdef)。

結 果

1. CRE

1) 菌株の由来

供試した 51 株の由来は、性別では、男性 33 株、女

性 18 株であった。年齢は、70~79 歳が最も多く、70 歳以上の高齢者が約 70% を占めた (図 1)。

検出部位は、尿が 19 株と多かった。次いで、血液 13 株、喀痰 8 株で、その他は胆汁、腹水、膿などであった (図 2)。

菌種は、*Klebsiella aerogenes* が 18 株で最も多く、次いで *Klebsiella pneumoniae* が 9 株、*Escherichia coli* が 7 株、*Enterobacter cloacae* complex が 6 株などであった (図 3)。

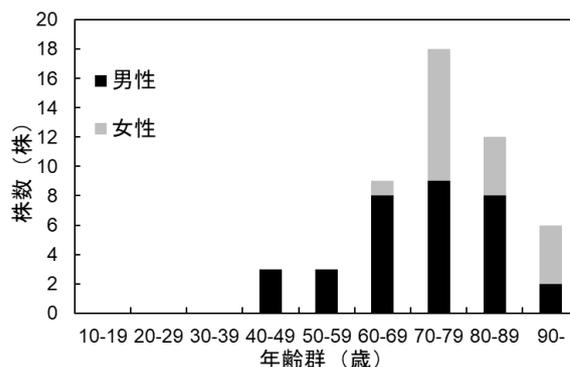


図 1 CRE の性別年齢分布

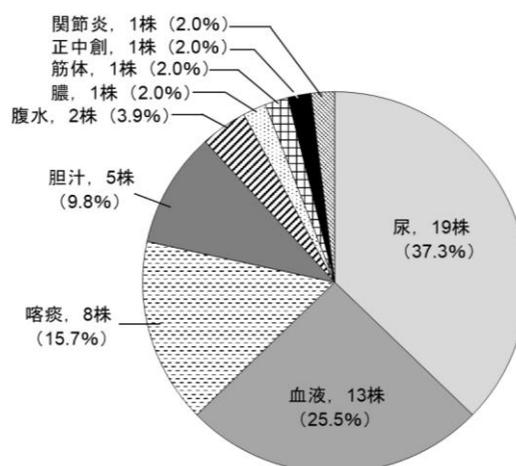


図 2 CRE の検出部位別内訳

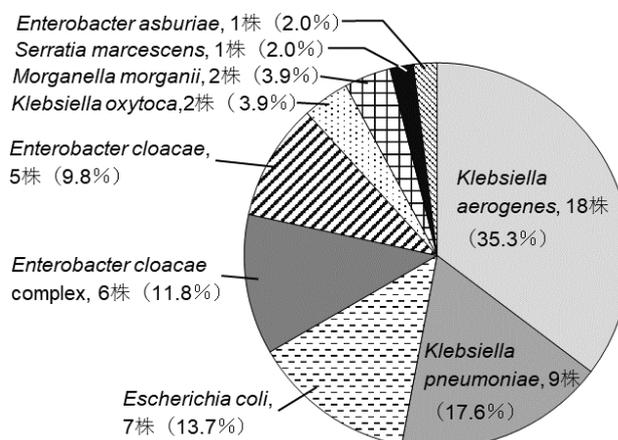


図 3 CRE の菌種別内訳

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

検査結果を表 1 に示す。メタロ-β-ラクタマーゼ産生性確認試験では、阻止円径の拡張が確認できたのは 18 株で、その菌種は *E. coli* が 7 株、*K. pneumoniae* が 5 株、*Klebsiella oxytoca* が 2 株、*Morganella morganii* が 2 株、*E. cloacae* complex が 1 株、*E. cloacae* が 1 株であった。

KPC 型カルバペネマーゼ産生性の確認試験では、7 株が陽性で、*K. aerogenes* が 3 株、*E. cloacae* が 2 株、*E. cloacae* complex が 1 株、*Serratia marcescens* が 1 株であった。

ESBL 産生性の確認試験では、CTX-M 型と判定し

たのは 10 株で、判定保留が 2 株あった。

AmpC 産生性の確認試験では 27 株が陽性であった。

3) β-ラクタマーゼ遺伝子型確認試験

PCR 法の結果、全 51 株のうち、カルバペネマーゼ遺伝子では、IMP 型を 18 株検出した。菌種は *E. coli* が 7 株、*K. pneumoniae* が 5 株、*K. oxytoca* が 2 株、*M. morganii* が 2 株、*E. cloacae* complex が 1 株、*E. cloacae* が 1 株であった。

ESBL 遺伝子では、TEM 型を検出した菌株が 9 株、SHV 型を検出した菌株が 5 株、CTX-M-1G を検出した菌株が 6 株、CTX-M-2G を検出した菌株が 16 株、CTX-M-9G を検出した菌株が 1 株あった。CTX-M 型を検出したが、CTX-M-1G、M-2G、M-9G のいずれも

表 1 CRE の検査結果

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	ESBL	AmpC	カルバペネマーゼ	ESBL	AmpC	
1		-	+	-	-	-	-	-	
2		-	-	-	+	-	-	-	
3		-	-	-	+	-	-	-	
4		-	-	-	+	-	-	-	
5		-	-	-	+	-	-	-	
6		-	-	-	+	-	-	-	
7		-	-	-	+	-	-	-	
8		-	-	判定保留	+	-	TEM型,CTX-M1G	-	
9	<i>Klebsiella aerogenes</i>	-	-	-	+	-	-	-	
10		-	-	-	+	-	-	-	
11		-	-	-	+	-	-	-	
12		-	-	-	+	-	-	-	
13		-	-	-	+	-	-	-	
14		-	-	-	+	-	-	-	
15		-	+	-	-	-	-	-	
16		-	-	-	+	-	-	-	
17		-	+	-	+	-	-	-	
18	-	-	-	+	-	-	-		
19		+	-	-	-	IMP型	SHV型	DHA型	<i>bla</i> _{IMP-6}
20		-	-	-	-	-	TEM型,SHV型,CTX-M1G	-	
21		-	-	CTX-M型	-	-	TEM型,SHV型,CTX-M1G	-	
22		+	-	CTX-M型	-	IMP型	SHV型,CTX-M2G	-	<i>bla</i> _{IMP-6}
23	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	-	+	-	TEM型,CTX-M1G	-	
24		-	-	-	-	-	TEM型,CTX-M1G	CIT型,DHA型	
25		+	-	-	-	IMP型	SHV型,CTX-M2G	-	<i>bla</i> _{IMP-6}
26		+	-	-	-	IMP型	CTX-M2G	-	<i>bla</i> _{IMP-6}
27		+	-	-	-	IMP型	CTX-M2G	-	<i>bla</i> _{IMP-6}
28		+	-	CTX-M型	-	IMP型	TEM型,CTX-M2G	-	<i>bla</i> _{IMP-6}
29		+	-	-	-	IMP型	CTX-M2G	-	<i>bla</i> _{IMP-6}
30	+	-	-	-	IMP型	TEM型,CTX-M2G	-	<i>bla</i> _{IMP-6}	
31	<i>Escherichia coli</i>	+	-	-	-	IMP型	CTX-M2G	-	<i>bla</i> _{IMP-6}
32		+	-	CTX-M型	-	IMP型	CTX-M2G,CTX-M9G	-	<i>bla</i> _{IMP-6}
33		+	-	CTX-M型	-	IMP型	TEM型,CTX-M2G	-	<i>bla</i> _{IMP-6}
34		+	-	CTX-M型	-	IMP型	TEM型,CTX-M1G,CTX-M2G	-	<i>bla</i> _{IMP-6}
35		-	-	-	+	-	-	EBC型	
36		-	-	-	+	-	-	EBC型	
37	<i>Enterobacter cloacae</i> complex	-	-	-	+	-	-	EBC型	
38		-	-	-	+	-	-	EBC型	
39		+	-	CTX-M型	-	IMP型	CTX-M2G	EBC型	<i>bla</i> _{IMP-6}
40		-	+	-	+	-	-	-	
41		-	+	-	-	-	-	EBC型	
42		-	+	-	+	-	-	-	
43	<i>Enterobacter cloacae</i>	+	-	CTX-M型	-	IMP型	CTX-M2G	-	<i>bla</i> _{IMP-6}
44		-	-	-	+	-	-	-	
45		-	-	-	+	-	-	-	
46	<i>Klebsiella oxytoca</i>	+	-	-	-	IMP型	CTX-M2G	DHA型	<i>bla</i> _{IMP-6}
47		+	-	CTX-M型	-	IMP型	CTX-M型	-	<i>bla</i> _{IMP-1}
48	<i>Morganella morganii</i>	+	-	-	-	IMP型	CTX-M2G	DHA型	<i>bla</i> _{IMP-6}
49		+	-	CTX-M型	-	IMP型	CTX-M2G	DHA型	<i>bla</i> _{IMP-6}
50	<i>Serratia marcescens</i>	-	+	判定保留	+	-	-	-	
51	<i>Enterobacter asburiae</i>	-	-	-	+	-	-	EBC型	

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

保有していない菌株が1株あった。なお、ESBL 遺伝子を重複して保有する菌株が12株あった。

AmpC 遺伝子では、EBC 型を検出した菌株が7株、DHA 型を検出した菌株が5株、CIT 型を検出した菌株が1株あった。なお、AmpC 遺伝子を重複して保有する菌株が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22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、薬剤耐性遺伝子を同定した。その結果、17株が *bla*_{IMP-6} と、1株が *bla*_{IMP-1} と一致した。

2. VRE

検査結果を表2に示す。

1) 菌株の由来

供試した9株の由来は、性別では男性5株、女性4株であった。検出部位は血液が4株、尿が3株、腹水が1株、便が1株であった。

2) ディスク拡散法による耐性型の推定

9株すべてが VCM 及び TEIC に対して耐性を示した。このことから、耐性遺伝子は *vanA* を保有することが推定された。

3) 耐性遺伝子の検出

9株すべてが *vanA* 遺伝子を保有していた。

4) 菌種同定

9株すべてが *E. faecium* であった。

5) MLST 型別

ST78 が4株、ST17 が3株、ST612 が1株、ST117 が1株であった。

考 察

CRE 51 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 (35.3%) であった。菌種別に見ると、*E. coli* は7株すべて、*K. pneumoniae* は9株のうち5株が IMP 型遺伝子を保有していた。奈良県では、例年この2菌種において IMP 型遺伝子の検出が多く、傾向に変化はなかった。また、IMP 型遺伝子を保有する菌株は、他にも ESBL 遺伝子や AmpC 遺伝子を合わせて保有していることが分かった。IMP 型遺伝子の同定の結果、*bla*_{IMP-6} が17株検出された。IMP 型には地域特性があり、*bla*_{IMP-6} は西日本で多く検出されている¹⁰⁾。当センターにおいても例年 *bla*_{IMP-6} の検出が多く¹¹⁾、今回の結果はこれまでの傾向と同様であった。

一方、カルバペネマーゼ遺伝子を保有していない菌株は、33株 (64.7%) であった。これらの菌株のうち、ディスク拡散法による AmpC 産生性の確認試験で陽性となった株が27株存在し、菌種別に見ると *K. aerogenes*, *Enterobacter* 属菌に多かった。これらの菌種は AmpC 遺伝子を染色体にコードするとされている¹²⁾。AmpC 産生性陽性株のうち、AmpC 遺伝子を保有しない株については、今回確認した6つの AmpC 遺伝子以外を保有している可能性が考えられた。その他6株は、KPC 型カルバペネマーゼ産生性の確認試験で陽性となった株や ESBL 遺伝子を保有する株であった。

CRE の増加は、臨床上重大な問題であるが、現在の届出基準では、カルバペネマーゼ遺伝子を保有していない菌株も届出対象になる。感染対策上、カルバペネマーゼ遺伝子の保有の有無の鑑別が重要であるため、今後も詳細な検査を実施し、関係機関等への情報還元を行っていく必要がある。

表2 VRE の検査結果

番号	性別	年齢	検出部位	耐性型の推定		耐性遺伝子の検出	菌種同定	MLST型別
				VCM	TEIC			
1	男	68	血液	R	R	<i>vanA</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	ST78
2	男	51	腹水	R	R	<i>vanA</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	ST78
3	男	92	尿	R	R	<i>vanA</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	ST78
4	女	98	便	R	R	<i>vanA</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	ST17
5	男	83	血液	R	R	<i>vanA</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	ST78
6	女	86	血液	R	R	<i>vanA</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	ST17
7	男	73	血液	R	R	<i>vanA</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	ST612
8	女	90	尿	R	R	<i>vanA</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	ST117
9	女	83	尿	R	R	<i>vanA</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	ST17

VRE は近年、全国的に届出数が増加しており、奈良県でも毎年数例報告されている。当センターに搬入された9株はすべて *vanA* 遺伝子を保有する *E. faecium* であった。全国で VRE 感染症として届出されているほとんどが *E. faecium* であり、奈良県は全国と同様の傾向を示した。

MLST 型別の結果、ST 型にはバリエーションがみられたが、すべての型で5つ以上の Allele Number が共通しており、世界流行株とされる Clonal Complex 17 に分類された。より詳細な解析は令和4年度奈良県保健研究センター年報¹³⁾ で報告している。

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、並びに保健所の皆様に深く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Antimicrobial Resistance Collaborators: *Lancet*, 399 (10325), 629-655 (2022)
- 2) 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)
- 3) 国立感染症研究所「病原体検出マニュアル 薬剤耐性菌 Ver2.1」(2024年3月)
- 4) 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 Ver.3」(2016年9月)
- 5) Xu. L, Ensor. V, Gossain. S, *et al.*: *J. Medical Microbiology*, 54, 1183-1187 (2005)
- 6) Monstein. H, Ostholm-Balkhed. A, Nilsson. M, *et al.*: *APMIS*, 115, 1400-1408 (2007)
- 7) CLSI M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 34 (2024)
- 8) 国立感染症研究所「薬剤耐性菌解析機能強化技術研修会 資料」(2009)
- 9) H Billström: *Karolnska Institutet.*, 1-61 (2008)
- 10) 国立感染症研究所: 病原微生物検出情報, 44, 130-131 (2023)
- 11) 井上健太郎, 井ノ上美紅, 築山結衣, 他: 奈良県保健研究センター年報, 56, 55-57 (2021)
- 12) 原田壮平: 日本臨床微生物学会雑誌, 31 (4), 1-10 (2021)
- 13) 井ノ上美紅, 築山結衣, 井上健太郎, 他: 奈良県保健研究センター年報, 57, 44-49 (2022)

奈良県における *bla*_{IMP-6} 保有カルバペネム耐性腸内細菌目細菌 (*Klebsiella pneumoniae*) のパルスフィールドゲル電気泳動による解析

井ノ上美紅, 築山結衣, 佐伯美由紀, 田邊純子

Analysis of *bla*_{IMP-6} mediated carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Nara Prefecture by Pulsed-field Gel Electrophoresis

Miku INOUE, Yui TSUKIYAMA, Miyuki SAEKI, Sumiko TANABE

緒言

カルバペネム耐性腸内細菌目細菌 (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目細菌の総称である。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。

当センターでの検査の結果、カルバペネマーゼ遺伝子である *bla*_{IMP-6} を保有する *Klebsiella pneumoniae* が経年的に検出されていることが分かった。*bla*_{IMP-6} は、西日本で多く検出されており²⁾、さらなる拡散に注意が必要である。

そこで、今回、2018年1月から2023年10月の間に CRE 感染症と診断され、当センターでの検査の結果、*bla*_{IMP-6} 保有 *K. pneumoniae* と判明した株を対象としたパルスフィールドゲル電気泳動法 (Pulsed-Field Gel Electrophoresis: PFGE) を確立し、分子疫学的解析を実施したので報告する。

方法

1. 材料

2018年1月から2023年10月までの間に、奈良県内の医療機関において CRE 感染症と診断され、当センターに搬入された菌株のうち、*bla*_{IMP-6} 保有 *K. pneumoniae* 30株について解析を実施した。医療機関の内訳は医療機関 a が10株、b が8株、c 及び d が4株、e が3株、f~k が1株ずつであった。医療機関及

び診断年月等の患者情報は発生届に基づく。

2. パルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE)

普通寒天培地 (島津ダイアグノスティクス) 上で 37°C、一晩培養した菌をかき取り、Trypticase Soy Broth (BD) 2 mL に接種し、37°C で一晩培養した。サイズマーカーとして *Salmonella* Braenderup H9812 株を同様に培養した。培養液 150 μL を 13,000 rpm で3分間遠心分離し、上清を除き、沈渣に生理食塩水を 150 μL 加え、菌液とした。菌液 150 μL と、滅菌水で 1% に調製した SeaKem Gold agarose (Lonza) 150 μL を混合し、サンプルプラグキャスター 0.7 mm 厚 (Bio-Rad) に注入し、室温で 15 分間静置し、固化した。次に、Protenase K (Invitrogen) 溶液を調製した。0.5 M エチレンジアミン四酢酸 (pH 8.0) (ニッポン・ジーン) で 1% に調製した N-ラウロイルサルコシン (東京化成工業) 溶液を作製し、作製した溶液で 1 mg/mL Protenase K 溶液を調製した。Protenase K 溶液 1.2 mL に、固化したプラグを入れ、50°C の水浴中で振とうしながら 2 時間処理した。Protenase K 処理をしたプラグを 4 mm 角のブロックに切り出した。滅菌水で 4 mM に調製した Pefabloc SC (Roche) 溶液 500 μL に、切り出したブロックを入れ、50°C の水浴中で振とうしながら 20 分間処理し、Protenase K を失活させた。その後、Pefabloc SC 溶液を新しく入れかえ、同様に処理した。処理後に Pefabloc SC 溶液を取り除き、Tris-Ethylene diamine tetra acetic acid 緩衝液 (pH 8.0) (TE Buffer, ナカライテスク) 1 mL を加え、氷上で 20 分間静置した。TE Buffer からブロックを取り出し、H Buffer (酵素処理 Buffer, Roche) 100 μL に入れ、氷上で振とうしながら 20 分間処理した。H Buffer で希釈し、30 units/100 μL に調製した制限酵素 XbaI (Roche) 溶液 100 μL に処理したブロックを入れ、37°C の水浴中で振とうしながら 2 時間処理した。酵素処理したブロックを 0.5 倍濃度 Tris-borate Buffer (0.5×TBE, Invitrogen) 400 μL に入

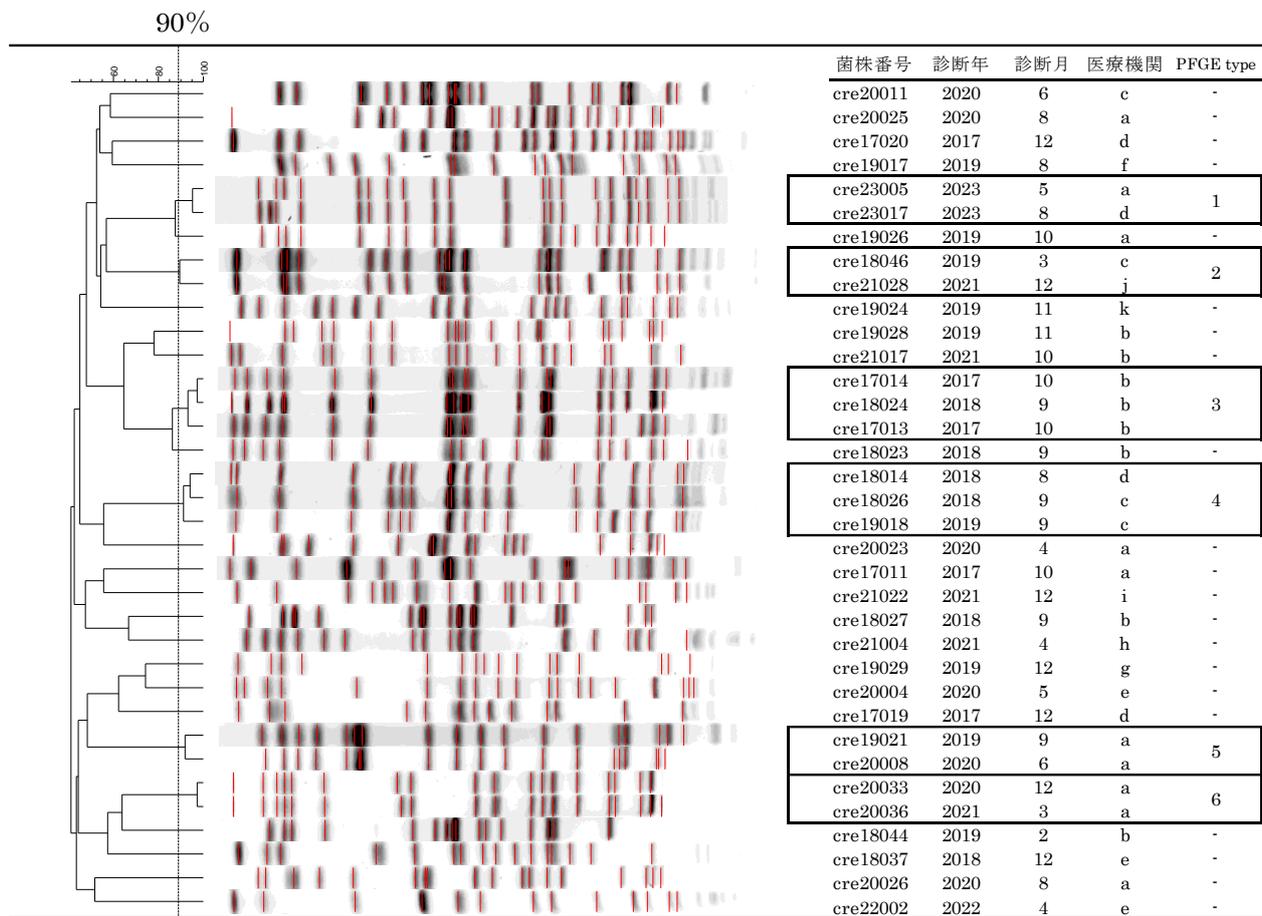


図 PFGE の結果

れ、氷上で1時間程度静置した。その後、ブロックをコームに貼り付けて20分程度静置した。0.5×TBEで1%に調製したSeaKem Gold agarose 100 mLをゲル作製台に流し込み、ブロックを貼り付けたコームをセットし、室温で10分間、5°Cで5分間静置し、ゲルを固化させた。固化後、コームを引き抜いてブロックをゲルに埋め込み、CHEF Mapper (Bio-Rad) を用いて泳動を実施した。泳動条件は、次のように設定した。Initial time : 6 s, Final time : 36 s, Voltage : 6 V/cm, Run time : 18.5 h³⁾, 泳動 Buffer : 0.5×TBE, Buffer 温度 : 14°C

泳動後、エチジウムブロマイド (Invitrogen) で1時間染色した後、30分ごとに滅菌水を交換し、振とうしながら合計1.5時間脱色を行った。染色及び脱色の作業は遮光して行った。つづいてゲルを撮影した。撮影にはGelDoc Go (Bio-Rad) を使用し、露光時間を2~3秒間に設定した。

3. PFGE 画像の解析

Fingerprint types データ解析ソフトウェア (BIONUMERICS) を使用して、撮影した画像からバンドを読み取り、系統樹解析を実施した。類似度は、共有するバンドの割合から相似値を見積もる Dice 係

数によって表した。得られたすべてのパターンは、非荷重結合法によってクラスタリングを実施し、系統樹を作成した。

結果

解析結果を図に示す。系統樹解析により、類似度90%以上で菌株をグループ化したところ、6つのPFGE typeを形成した。PFGE type 3, 5及び6は同一医療機関からの分離例で、医療機関a及びbの株であった。診断月の差は同月~11ヶ月であった。PFGE type 1, 2及び4は異なる医療機関からの分離例も含んでいた。診断月の差は、同一医療機関内では1年、異なる医療機関では1ヶ月~1年9ヶ月であった。同一医療機関から複数分離されている株間の関連性をみると、医療機関aの10株は8パターン、bの8株は6パターン、cの4株は3パターンに分かれた。d及びeの株はすべて別パターンであった。

考察

調査期間内で、医療機関aからは *bla*_{AMP-6} 保有 *K. pneumoniae* が10株検出されており、同一クローンによる感染が危惧されたが、10株は系統樹解析の類

似度からみると8パターンに分かれた。同一パターンとなったのはPFGE type 5及び6の2株ずつであり、10株中6株は類似度の低い株であった。よって、同一クローンによる感染拡大があったわけではないことが示唆された。PFGE type 5については、診断月の差は9ヶ月であった。後で分離された患者(cre20008)の推定感染原因は以前からの保菌であり、患者間の接触がない限り、これら2株は異なる由来ではないかと考えられた。PFGE type 6については、診断月の差は3ヶ月であり、初診から診断の間に重複している期間があった。これら2株は類似度が95%を超えており、同数のバンドをもち、バンドサイズの違いもほぼなく、同一由来株の可能性が示唆された。

医療機関bはaに次ぐ株数で、8株は6パターンに分かれた。同一パターンとなったのは3株で、PFGE type 3に分類された。3株のうち2株は診断月が同月で、もう1株とは1年の差があった。しかし、同月の株(cre17013・cre17014)よりも、1年差の株(cre17014・cre18024)の類似度のほうが高かった。cre17014及びcre18024の推定感染原因は医療器具関連感染で、cre17013の感染原因は不明であった。これら3株が同一由来であるとする、cre17013・cre17014間で伝播する際に、多少の変異が起こったことが考えられる。

異なる医療機関で同一パターンとなったPFGE type 2については、患者情報からは関連性は不明であるが、診断月の差が1年9ヶ月ある株間で類似のバンドパターンをもつことが明らかになった。

今回の解析でPFGEのバンドパターンが同一ではなかった株も、カルバペネマーゼ遺伝子を含む共通のプラスミドを保有している可能性があり、また、変異が蓄積し、バンドパターンが多様化することがあるため、関連性は否定できない。さらに、時期や医療機関が異なり、関連性のない株が同一パターンとなる事例があったが、疫学情報もふまえて解釈することで、院内感染の確認手法として、PFGE法による解析は有用であるとされている⁴⁾。解析対象としたbla_{IMP-6}のようなカルバペネマーゼ遺伝子を保有するCRE感染症は、院内感染対策上、重要であるため、今後も動向を注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、並びに保健所の皆様に深く御礼申し上げます。

文 献

- 1) 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：病原微生物検出情報, 44, 130-131 (2023)
- 3) Patricia A. Bradford, Simona B, John Q, *et al.*: CID, 39, 55-60 (2004)
- 4) 国立感染症研究所「薬剤耐性菌の検査に関する研修資料」(2022)

奈良県におけるエムポックスウイルスの初検出について

松浦侑輝・吉川采也加・山本紗也・美並衣織・井上ゆみ子・山崎聖子

First Detection of Mpox virus in Nara Prefecture

Yuki MATSUURA・Sayaka YOSHIKAWA・Saya YAMAMOTO
Iori MINAMI・Yumiko INOUE and Seiko YAMAZAKI

緒言

エムポックスは、オルソポックスウイルス属のエムポックスウイルス感染による急性発疹性疾患で、げっ歯類やサル・ウサギなどのウイルスを保有する動物との接触により感染する。また、感染したヒトの皮膚の病変・体液・血液との接触（性的接触を含む）、患者との接近した対面での飛沫の長時間の暴露、患者が使用した寝具等との接触等によっても感染することが知られており、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に基づく全数把握対象疾患の4類感染症に位置づけられている。

2022年以前は主にアフリカ中央部から西部にかけて発生していたが、2022年5月7日に英国でナイジェリアに渡航歴のあるエムポックス患者の発生が報告されて以降、欧米を中心に常在国への渡航歴のない症例が報告されており、2022年7月23日に世界保健機構（WHO）事務局長はエムポックスの流行が「国際的に懸念される公衆衛生上の緊急事態（PHEIC）に該当する」と宣言した。その後、2022年8月をピークに世界全体での報告数は減少し、2023年5月11日にWHO事務局長がPHEICに該当しないことを宣言したものの、全世界的な報告は続いており、2024年1月31日時点で93,000例以上の患者の報告がある。日本国内では、2022年7月25日に一例目の患者が報告され、2024年2月25日時点で、240例の症例が確認されている（<https://www.niid.go.jp/niid/ja/monkeypox-m/2596-cepr/12570-mpox-ra-0321.html>）。

潜伏期間は1~3週間程度で、臨床症状は主に発熱、頭痛、リンパ節腫脹である。特徴的な症状として全身性の皮膚病変が知られてきたが、2022年5月以降の感染拡大では病変が会陰部・肛門周辺や口腔などの局所に集中し全身性の皮疹が見られないなど、以前の典型的なエムポックスの臨床像とは異なっていたことが報告されている。また、この感染拡大で報告されている症例の多くは男性であり、感染経路の判明しているもののうち、大半は性的接触による感染であった¹⁾。

エムポックスの発疹のような所見はオルソポックスウイルス属の他のウイルスや水痘帯状疱疹ウイルスの感染などでも認められており、迅速な鑑別のため、これら複数の病原体を標的とした検査を平行して進めることが推奨されている²⁾。

当センターでは、PHEICが宣言されたことを受け、2022年7月にリアルタイムPCRによる遺伝子検査系を確立していたが、奈良県でのエムポックス疑い例がなく、2023年5月まで遺伝子検出事例はなかった。

今回、当センターのリアルタイムPCR法において、奈良県で初めてエムポックスウイルスを検出したため報告する。

方法

1. 検査対象

2023年5月に採取された、発病から14日目の患者水疱液1検体について検査を実施した。

2. 検査方法

水疱液検体200 µLを検体前処理用の2.0 mLスクリーキャップチューブに移し、3000 rpm, 3 minで遠心して得られた上清をQIAamp DNA Mini Kit（QIAGEN）を用い、キットに添付のプロトコルに従ってDNAを抽出した。得られたDNA抽出液をサンプルとし、国立感染症研究所病原体検出マニュアル³⁾に従い、オルソポックスウイルス属ウイルス全般のA3L遺伝子およびH2R遺伝子をターゲットとするインターカレーター法を用いたリアルタイムPCR法（SYBR Green法）と、エムポックスウイルスのF3L遺伝子と水痘帯状疱疹ウイルスのORF38遺伝子をターゲットとする二種の蛍光標識プローブを用いたリアルタイムPCR法（Taqman Probe法）の二つの試験法について、同一検体を2 wellに分けて検査を実施した。陽性対照には、国立感染症研究所より配布されたStandard DNAを 1.0×10^5 コピー/3 µLから 1.0×10^1 コピー/3 µLまで10倍ずつ段階希釈を行ったものを使用した。

結果と考察

リアルタイム PCR の結果について、表 1 に示す。

オルソポックスウイルス属ウイルス全般を検出する SYBR Green 法において、陽性対照のうち、 1.0×10^1 コピーの 1 well を除き全ての well において 40 サイクル以内にシグナルの立ち上がりが見られ、検出系は成立していると判定された。サンプルについてみると、A3L, H2R の両方の遺伝子について 1.0×10^4 よりも立ち上がりが早く、Ct 値も小さくなっており、A3L 遺伝子、H2R 遺伝子のいずれも陽性と判定された。さらに、SYBR Green 法における特異性の評価のため、解離解析を実施したところ、図のような融解曲線と表 2 のとおりの Tm 値が得られた。陰性対照と立ち上がりのなかった陽性対照 1 well を除いて同様の Tm 値・形状でピーク幅が狭くなっており、反応系が正常に動作していることが確認できた。さらに、A3L 遺伝子と H2R 遺伝子の両方で、サンプルの Tm 値・形状は陽性対照と一致しており、非特異反応を疑う根拠は見られなかった。以上から、検体中のオルソポックスウイルス属ウイルス遺伝子の存在が示された。

また、Taqman Probe 法についてみると、陽性対照の段階希釈系列では全ての well で反応サイクル中のシグナルの立ち上がりが見られ、検査系は正常に動作していることが確認できた。サンプルについてみると、エムポックスウイルスの F3L 遺伝子は 1.0×10^4 コピー/ $3 \mu\text{L}$ の陽性対照と同様の立ち上がり及び Ct 値となっており、陽性と判定された。また、水痘帯状疱疹ウイルスの ORF38 遺伝子については立ち上がりが見られず、陰性と判定された。これにより、検体中のエムポックスウイルス遺伝子の存在が示され、水痘帯状疱疹ウイルス遺伝子の存在は否定された。

上記二つの検査結果から、エムポックスウイルス遺伝子が陽性であると判断した。

2023 年 5 月にエムポックスの陽性患者が報告されて以降、当県では 2024 年 4 月現在までエムポックス患者の報告はなく、疑い例の届出もなかった。一方で、全国の報告数では、ピーク時よりも報告数は少ないものの、継続して患者の報告が続いており (https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou/kekaku-kansenshou19/monkeypox_00001.html)、従前のウイルスの性質との違いも考慮して、今後も動向に注視する必要がある。ヒトからヒトへの感染連鎖を予防し、アウトブレイクの発生を未然に防ぐためには、迅速な検査に基づくサーベイランスの継続が必要であり、今後も検査体制を維持していくことが重要であると考えらる。

謝 辞

感染症発生動向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深く御礼申し上げます。

表 1 リアルタイム PCR により得られた各遺伝子の Ct 値 (平均)

サンプル		陽性対照(コピー/ $3 \mu\text{L}$)			
		10^4	10^3	10^2	10^1
A3L	16.289	22.791	26.479	30.219	33.688
H2R	15.786	23.443	26.840	30.906	**35.995
F3L	25.785	25.784	29.537	33.631	39.236
ORF38	*ND	25.752	29.408	33.484	36.844

*ND=Not Detected 検出無し

**2wellのうち、1wellのみ検出

表 2 SYBR Green 法により得られた各遺伝子の Tm 値 ($^{\circ}\text{C}$)

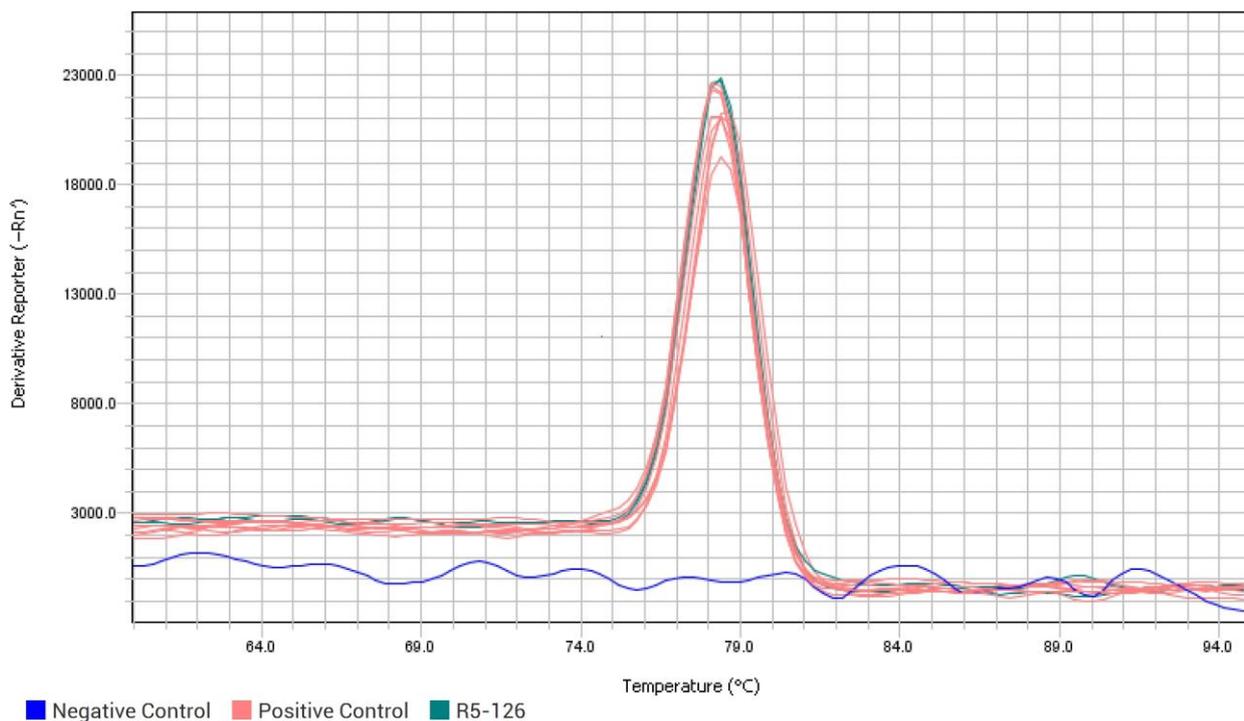
サンプル		陽性対照(コピー/ $3 \mu\text{L}$)			
		1.0×10^4	1.0×10^3	1.0×10^2	1.0×10^1
A3L	78.392	78.536	78.244	78.244	78.390
	78.246	78.390	78.244	78.244	78.536
H2R	77.662	77.780	77.635	77.489	77.926
	77.662	77.780	77.489	77.489	*ND

*ND=Not Detected 検出無し

文 献

- 1) 国立感染症研究所: 病原微生物検出情報, **44**, 83-95 (2023)
- 2) 厚生労働省: エムポックス診断の手引き第 2.0 版
- 3) 国立感染症研究所: 「病原体検出マニュアル サル痘ウイルス第 2 版」(令和 4 年 8 月)

A3L



H2R

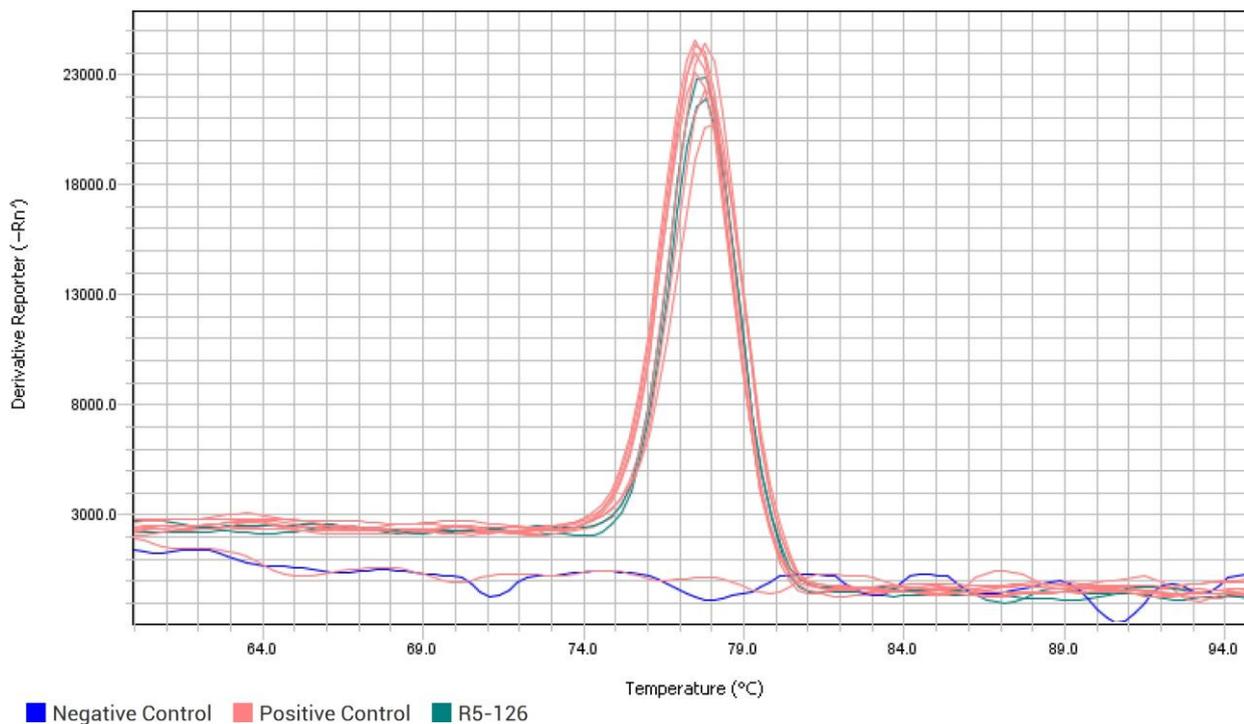


図 SYBR Green 法により得られた融解曲線

奈良県における流入下水中新型コロナウイルスの検出法の検討

山本紗也・千葉翔子*・松浦侑輝・中野 守・山崎聖子

Investigation for Extraction Method of SARS-CoV-2 in Inflow Sewage in Nara Prefecture

Saya YAMAMOTO・Shoko CHIBA・Yuki MATSUURA・Mamoru NAKANO and Seiko YAMAZAKI

緒言

新型コロナウイルス感染症（COVID-19）は新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）を原因とする呼吸器疾患であり、未処理の生活排水中からウイルス RNA が検出されること、また不顕性感染例も検出できる可能性があることから、下水中のウイルス遺伝子の検出および変異株の検出による地域の感染状況の把握、感染者数推計等の研究が行われている¹⁻³⁾。

わが国では、感染症流行予測調査事業におけるポリオ環境水サーベイランスにて、下水中のポリオウイルスの監視を行っており、本県でも2014年7月から県内の下水処理場の流入下水調査を実施している。その既存のネットワークを活用し、2020年8月に、国立感染症研究所、大学、国土交通省国土技術政策総合研究所、地方衛生研究所で構成された研究班が立ち上がり、下水中のSARS-CoV-2調査プロジェクト（NIJIs（New Integrated Japanese Sewage Investigation for COVID-19）プロジェクト）が開始された。本県はNIJIsの一環である分担研究（2020年度：環境水を用いた新型コロナウイルス監視体制を構築するための研究、2021～2022年度：環境水を用いた新型コロナウイルス監視体制の構築に関する研究、2023年度：環境水に含まれる新型コロナウイルス等病原体ゲノム情報の活用に関する研究）に2021年4月から参加し、下水中SARS-CoV-2のモニタリングを行ってきた。

今回、県内1カ所の下水処理場より流入下水を採水し、上清、沈渣、未処理下水に分けてウイルス RNA を抽出、その後リアルタイム PCR 検査にてウイルス RNA 量の測定を行い抽出法の検討を行った。また、ウイルス RNA 量のモニタリング結果と市中でのCOVID-19全数把握新規感染者報告数・定点当たり報告数（以下、報告数）との相関関係から流行状況を探知できるかを検討したので報告する。

対象と方法

1. 調査対象

2021年4月から2023年12月の期間に、県内に位置する1カ所の下水処理場Aで毎月1回、流入下水の採水を行い、計33検体を試料とした。

2. 試薬等

1) 下水試料の前処理

採水した下水試料を500 mLはかり取り、遠心分離（3,000 rpm, 1時間, 4℃）の後、上清および沈渣をそれぞれ全量回収した。

また、下水残試料から40 mLをはかり取り、未処理下水試料とした。

2) 陰電荷膜法/誘出法による上清の濃縮

ポリオウイルス感染症の実験室診断マニュアル⁴⁾および千葉ら⁵⁾の報告を参考に1)で回収した上清から濃縮物5 mLを得た。

3) ウイルス RNA の抽出

1), 2)で得られた上清濃縮物、沈渣、未処理下水について、下記の通りそれぞれのキットの添付プロトコルに従いウイルス RNA の抽出を行った。

(1) 抽出法1（上清）

2)で得られた上清濃縮物1 mLについて、QIAamp UltraSens Virus Kit (QIAGEN)を用いてRNA抽出を行い、抽出液60 μLを得た。

(2) 抽出法2（沈渣）

1)で得られた沈渣全量について、RNeasy PowerSoil Total RNA Kit (QIAGEN)を用いてRNA抽出を行い、抽出液100 μLを得た。

(3) 抽出法3（未処理下水）

1)の未処理下水試料40 mLについて、Wizard Enviro Total Nucleic Acid Kit (Promega)を用いてRNA抽出を行い、抽出液40 μLを得た。

4) ウイルス RNA の検出

下水中の新型コロナウイルス検出マニュアル ver 1.1⁶⁾を参考にSARS-CoV-2 Direct Detection RT-qPCR Kit (Takara)を使用し、蛍光標識プローブを用いたリアルタイム PCR 検査による定量検査を実

*現、産業振興総合センター

施し、得られたウイルスゲノムコピー数 (GC) から、最終的な濃縮倍率等を考慮した上で、流入下水 1 L 当たりに含まれるウイルス濃度 (GC/L) に換算した。

陽性コントロールには SARS-CoV-2 Direct Detection RT-qPCR Kit (タカラバイオ) 付属の Positive Control RNA (1.0×10⁷ GC/μL) を 10 倍ずつ段階希釈し、1.0×10⁶ GC/μL から 1.0×10⁰ GC/μL までの希釈系列を作製、そのうち 1.0×10³ GC/μL から 1.0×10⁰ GC/μL を用いた。

結果

下水処理場 A における流入下水のウイルス検出結果は表に示す。

抽出法 1 (上清) について、2021 年 4 月から 2023 年 12 月までの 33 検体の検査を行い、うち 31 検体からウイルス RNA を検出 (検出率 93.9%), 最大濃度は、2023 年 1 月の 4.6×10⁴ GC/L であった。

抽出法 2 (沈渣) については 2021 年 4 月から 2023 年 1 月までの 22 検体の検査を行い、19 検体からウイルス RNA が検出され (検出率 86.4%), 最大濃度は 2021 年 9 月の 1.8×10⁴ GC/L であった。

抽出法 3 (未処理下水) については、2023 年 7 月から 2023 年 12 月までの 6 検体について検査を行い、すべての検体からウイルス RNA が検出され (検出率 100%), 最大濃度は 2023 年 11 月の 1.2×10⁵ GC/L であった。

考察

1. 検出ウイルス RNA 量の比較

下水からの SARS-CoV-2 の濃縮・RNA 抽出方法は、様々な方法が試みられており、疎遠心後の沈渣と上清を比較した場合、多くの地域において沈渣から抽出した RNA を用いた PCR で、より多くのウイルス RNA を検出できることが確認されている⁷⁾。一方、一部の

地域では上清から抽出した RNA を用いた方が良好な結果が得られるという報告もある⁸⁾。今回対象とした下水処理場 A の流入下水での調査で 2021 年 4 月から 2023 年 1 月の抽出法 1 (上清) と抽出法 2 (沈渣) のウイルス RNA 量を比較すると、2021 年 4 月、6 月、9 月、11 月および 2022 年 3 月に採水した検体を除く 17 検体で抽出法 1 (上清) の方が多く検出された。また、未処理下水から抽出を行った抽出法 3 は他の抽出法に比べ多くのウイルス RNA 量が検出され、抽出法 1 (上清) と抽出法 3 (未処理下水) の検出ウイルス RNA 量を比較すると、すべての月において抽出法 3 (未処理下水) の方が多い結果となった。以上の結果から、今回調査を行った下水処理場 A での下水中 SARS-CoV-2 の探知には上清を RNeasy PowerSoil Total RNA Kit (QIAGEN) 用いて抽出する方法 (抽出法 1) または未処理下水を Wizard Enviro Total Nucleic Acid Kit (Promega) を用いて抽出する方法 (抽出法 3) が適していると考えられる。

今回の調査では遠心後の上清から抽出した検体に多くのウイルス RNA が含まれている理由の究明には至らなかったため、今後さらに調査を続けていく必要があると思われる。

2. ウイルス RNA 量と報告数について

COVID-19 が全数把握対象疾患であった 2021 年 4 月 5 日から 2023 年 5 月 7 日までの報告数と下水中のウイルス RNA 量の推移を図 1 に示す。なお、報告数について、2021 年 4 月 5 日から 2022 年 9 月 26 日は処理区における週ごとの報告数の推移を表し、2022 年 9 月 27 日から 2023 年 5 月 7 日は発生届の取り扱い変更に伴い市町村別の集計が不可能となったため、県全体の報告数を記載している。COVID-19 が定点把握に移行後の 2023 年 5 月 8 日から 2023 年 12 月 31 日における処理区に該当する保健所管内の

表 下水処理場 A における下水中のウイルス RNA 濃度

		検出ウイルス RNA 量 (GC/L)											
		1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月
2021年	抽出法1				6.2E+02	9.0E+02	ND	2.2E+02	1.1E+03	1.4E+03	1.2E+02	ND	2.5E+03
	抽出法2				9.5E+02	7.1E+01	7.7E+02	ND	7.5E+02	1.8E+04	3.8E+01	4.7E+02	2.1E+01
	抽出法3				—	—	—	—	—	—	—	—	—
2022年	抽出法1	3.6E+02	1.3E+04	3.2E+02	8.4E+03	6.1E+03	2.2E+03	2.0E+04	3.7E+04	1.1E+04	1.1E+04	8.0E+03	1.9E+04
	抽出法2	1.3E+02	5.0E+02	8.2E+02	5.5E+02	5.4E+02	6.5E+02	3.3E+02	ND	ND	2.8E+02	4.0E+02	4.2E+02
	抽出法3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2023年	抽出法1	4.6E+04	6.9E+03	1.2E+04	1.3E+03	1.0E+03	2.3E+03	1.6E+04	9.4E+03	1.6E+04	3.2E+03	3.8E+03	1.1E+04
	抽出法2	3.4E+03	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	抽出法3	—	—	—	—	—	—	3.6E+04	6.6E+04	5.3E+04	5.1E+04	1.2E+05	7.6E+04

— : 検査未実施

ND : not detected (検出されず)

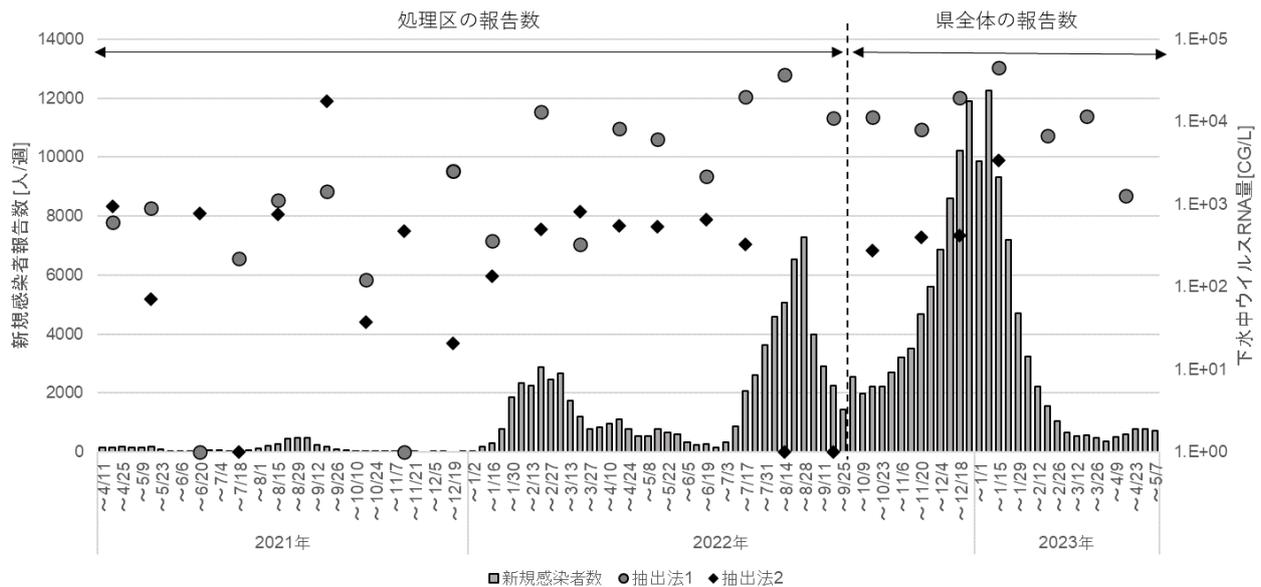


図1 処理区における週ごとの新規感染者報告数の推移と検出状況

COVID-19 定点当たり報告数の推移とウイルス RNA 量の推移は図2に示すとおりであった。報告数と抽出法1（上清）の下水中ウイルス RNA 量について、COVID-19の報告数がピークとなった2022年2月や8月、2023年1月にウイルス RNA 量が多くなり、その後報告数の減少とともにウイルス RNA 量も減少する結果となった。抽出法2（沈渣）については、おおよそ報告数の増加とともにウイルス RNA 量が増加していたが、他の月と比べると報告数が少ない2021年9月に採水した検体で最も多くのウイルス RNA 量を検出し、2022年の8月や9月では報告数が多いにもかかわらずウイルス RNA 量が検出されない等、相関の見られない事例も確認された。抽出法2（沈渣）は抽出法1（上清）に比べウイルス RNA 量と報告数の相関が弱く、検出ウイルス RNA 量も少ないことから、2023年1月を最後に調査を終了した。抽出法3（未処理下水）については、報告数の増減にかかわらずどの期間においても概ね一定のウイルス量を検出していた。

下水のモニタリングは、流行状況を把握する補助的な手段として有用であると知られている⁹⁾。本県においても抽出法1（上清）の結果から、報告数の増減に伴いウイルス RNA 量も増減することが確認できた。これにより、下水中のSARS-CoV-2のウイルス RNA 量をモニタリングすることで流行状況を把握できる可能性が示唆された。なお、抽出法3については調査期間が短く流行のトレンドを把握できているかが不明であったため、今後も調査を続け評価していきたい。

引き続き下水中ウイルス RNA 量のモニタリングと報告数の評価を行い、県内の流行状況の把握・解析を

行うことで、感染症の流行予測や感染拡大予防の一助となるよう努めたい。

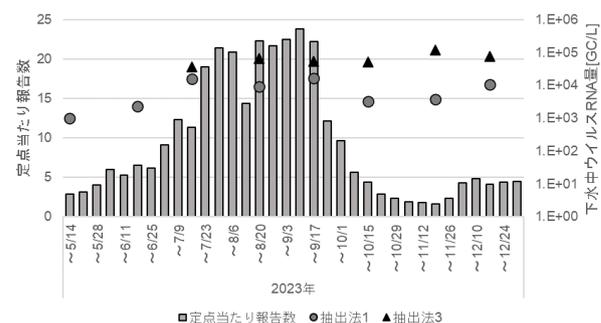


図2 定点当たり報告数の推移と検出状況

謝辞

下水サーベイランスに支援を頂きました研究班の諸先生方に深謝いたします。

流行予測調査において検体を提供していただきました下水処理場等の関係各位にお礼申し上げます。

文献

- 1) Haramoto, M., Malla, B., Thakali, O., et al.: *Sci Total Environ*, 737, 140405 (2020)
- 2) Westhaus, S., Weber, FA., Schiwy, S., et al.: *Sci Total Environ*, 751, 141750 (2021)
- 3) Rimoldi, G. S., Stefani, F., Gigantiello, A., et al.: *Sci Total Environ*, 744, 140911 (2020)
- 4) 国立感染症研究所「ポリオウイルス感染症の実験室診断マニュアル」2012年10月版

- 5) 千葉翔子, 松本朋子, 尾西美咲, 他: 奈良県保健研究センター年報, 53, 68-70 (2020)
- 6) 国立感染症研究所「下水中の新型コロナウイルス検出マニュアル ver 1.1」
- 7) Kim, S., Kennedy, LC., Wolfe, MK., *et al.*: *Environ Sci Water Res Technol.*, 8, 757-770 (2022)
- 8) 吉田弘: 厚生労働科学研究費補助金研究総括研究報告書 (2020)
- 9) Kitakawa K., Kitamura K., Yoshida H., *et al.*: *Appl Environ Microbiol*, 89, e01853-22 (2023)