

愛知県衛生研究所報

第70号 令和2年3月

目次

調査研究

2016/17～2018/19 シーズンの愛知県におけるインフルエンザウイルスの動向と分子疫学的解析 齋藤友睦、齋藤典子、尾内彩乃、皆川洋子、伊藤雅、安井善宏、松本昌門	1
流入下水から検出されたノロウイルス及びサポウイルスの動態と遺伝子解析 (2014/15～2018/19 シーズン) 秦 眞美、伊藤 雅、中村範子、安井善宏、松本昌門	11
2009年から2018年に愛知県において分離された腸管出血性大腸菌の志賀毒素遺伝子サブタイプ 高橋佑太、山田和弘、青木美耶子、中根衣久美、四本信輔、續木洋一、 松本昌門	21
清涼飲料水中の重金属一斉分析における前処理法の検討 戸塚昌子、梅村優子、青山文生、渡邊美奈恵、小池恭子、棚橋高志	27
ICP-MS 多元素一斉分析による愛知県内の水道原水の地域特性調査 長谷川真照、尾内彩乃、渡邊美奈恵、棚橋高志	32
他誌掲載論文抄録	40

Report of Aichi Prefectural Institute of Public Health
(Aichi-ken Eisei Kenkyusyoho)

Volume 70, March 2020

Contents

Original Papers

Genetic epidemiological analysis of influenza virus detected in Aichi Prefecture during 2016/17 and 2018/19 seasons1

Tomochika Saito, Noriko Saito, Ayano Onouchi, Hiroko Minagawa, Miyabi Ito,
Yoshihiro Yasui, Masakado Matsumoto

Molecular detection and analysis of Noroviruses and Sapoviruses in sewage samples from 2014/15 to 2018/19 seasons 11

Mami Hata, Miyabi Ito, Noriko Nakamura, Yoshihiro Yasui, Masakado Matsumoto

Characterization of *shiga toxin* subtypes in enterohemorrhagic *Escherichia coli* isolated in Aichi Prefecture from 2009 to 201821

Yuta Takahashi, Kazuhiro Yamada, Miyako Aoki, Ikumi Nakane, Shinsuke
Yotsumoto, Hirokazu Tsuduki, Masakado Matsumoto

Development of Pretreatment Method for Simultaneous Analysis of Heavy Metal in Soft Drinks27

Masako Totsuka, Yuko Umemura, Fumio Aoyama, Minae Watanabe,
Yasuko Koike, Takashi Tanahashi

Study on the regional characteristics of raw water in Aichi Prefecture using simultaneous analysis of multi-elements with inductively coupled plasma mass spectrometry32

Masateru Hasegawa, Ayano Onouchi, Minae Watanabe, Takashi Tanahashi

Summaries of papers accepted to other journals40

調 査 研 究

2016/17～2018/19 シーズンの愛知県における インフルエンザウイルスの動向と分子疫学的解析

齋藤友睦、齋藤典子、尾内彩乃、皆川洋子、伊藤雅、安井善宏、松本昌門

要 旨

インフルエンザウイルス（FluV）は呼吸器系疾患を引き起こし、主に冬季に大きく流行する病原ウイルスのひとつである。2016/17 から 2018/19 までの 3 シーズンを調査期間とし、愛知県内の医療機関でインフルエンザまたはインフルエンザ様疾患と診断された患者より採取された 1,833 検体に対し FluV の分離を行い、得られた分離株の型・亜型・系統の同定を行った。また、感染症流行予測調査事業により測定した県内における年齢区分別の抗 FluV 抗体保有状況と FluV 分離状況との関連性を調べたが、両者に関連性は認められなかった。更に、A 型インフルエンザウイルスについてヘマグルチニン（HA）領域に対する遺伝子系統樹解析を行ったところ、AH1pdm09 亜型では遺伝子変異の蓄積が進み多様化傾向が認められた。AH3 亜型では多くの遺伝子群に分類され多様化が認められたが、2018/19 シーズンには主に一つの遺伝子群が検出された。また、ノイラミニダーゼ阻害薬への耐性変異（H275Y）の検索を行ったところ、2017/18、2018/19 シーズンでは、それぞれ 2 株ずつ検出されたが散発的であり、県内での流行は認められなかった。

キーワード：インフルエンザウイルス、分子疫学、サーベイランス、薬剤耐性

序 文

インフルエンザウイルス（FluV）はオルソミクソウイルス科に分類され、エンベロップを持つマイナス鎖 1 本鎖 RNA ウイルスである¹⁾。A 型インフルエンザウイルス（FluA）の遺伝子は 8 分節の RNA からなり、ウイルス表面にはヘマグルチニン（HA）とノイラミニダーゼ（NA）が存在し、その抗原性の違いにより H1～H17、N1～N9 の亜型に分類される。現在、ヒトの間で季節性インフルエンザとして流行しているウイルスは FluA の H1N1 亜型（AH1pdm09 亜型）と H3N2 亜型（AH3 亜型）及び B 型インフルエンザウイルス（FluB）のビクトリア系統、山形系統である。過去 5 シーズンでは、

2014/15（14/15）、17/18、18/19 シーズンに全国で比較的大きな流行が認められた^{2,3,4)}。その 5 シーズンの季節性インフルエンザの分離・検出報告数を比べてみると、FluA では 14/15～16/17 シーズンまでは AH1pdm09 亜型と AH3 亜型とが交互に流行を起こしていたが、直近 2 シーズンでは混合流行となっている^{5,6)}。また、FluB では 15/16、16/17 シーズンにビクトリア系統と山形系統が小規模流行を示し、17/18 シーズンに山形系統が大流行を示した。日本は世界最大の抗インフルエンザ薬の使用国の一つであり、採用されている薬剤は NA 阻害薬及びエンドヌクレアーゼ阻害薬である。両薬剤にそれぞれ耐性を示す遺伝子変異の存在が

知られており、それらのモニタリングが行われている。これらのことから、インフルエンザの制御には、流行亜型の分布、抗原性の変化、遺伝子変異に関する実態把握が重要である。そこで本稿では2016年9月から2019年8月までの3シーズンに、主に愛知県感染症発生動向調査事業の指定提出機関（名古屋市を除き中核市を含む）において採取されたインフルエンザ及びインフルエンザ様疾患検体からのFluV検出状況、型・亜型・系統別同定及び分子疫学的解析の結果を報告する。

材料・方法

1. 調査検体

2016年9月から2019年8月までの3シーズンに愛知県内の感染症発生動向調査の指定提出機関（名古屋市を除き豊橋市、岡崎市、豊田市を含む）32医療機関及び定点外医療機関、集団発生で採取されたインフルエンザ及びインフルエンザ様疾患（16/17シーズン：634検体、17/18：612、18/19：587）計1,833検体を調査対象とした。

2. ウイルス分離及び型・亜型・系統別の同定

咽頭ぬぐい液またはうがい液検体を3,000 rpm、15分間の遠心処理を行い、その上清100 μ LをMadin-Darby canine kidney (MDCK) 細胞 (5×10^5 cells/well) に接種し、34°C、5% CO₂ の条件下で1週間の培養を行った。経日的に観察を行い細胞変性効果 (CPE) が認められた場合を分離陽性とした。1週間を経過してもCPEが認められない場合は、新たに培養したMDCK細胞に培養上清50 μ Lを接種し、更に1週間観察・培養を行った。ウイルス分離陽性の場合、国立感染症研究所（感染研）によりシーズン毎に配布されたFluV同定用サーベイランスキットを用い、感染研インフルエンザ診断マニュアル（診断マニュアル）⁷⁾ に従い赤血球凝集阻止 (HI) 試験を行い、FluVの型・亜型・系統を同定した。赤血球凝集 (HA) 活性が低くHI試験が実施できない場合に

は、診断マニュアルに従い conventional RT-PCR (Reverse transcription polymerase chain reaction: 逆転写ポリメラーゼ連鎖反応) 法によりFluV遺伝子を検出して同定を行った。遺伝子検出に用いるRNAは分離株からHigh Pure Viral RNA Kit (Roche, Germany) を用いて抽出し、検出に使用するプライマーは診断マニュアルに掲載されたものを用いた。

3. 抗体価測定

感染症流行予測調査事業の一環として行った調査のデータを利用した。詳細は県内の小児医療機関（一宮市、大府市）及び愛知県赤十字血液センターの協力により当該シーズン流行入り前に採取した血清検体（各シーズン198検体）に対して感染症流行予測調査事業実施要領^{8,9,10)} に従い調査を行ったものである。感染防御能の指標とされるHI抗体価40以上を抗体保有とした。

4. 遺伝子解析

FluVのHA及びNA遺伝子解析は診断マニュアル⁷⁾ に従った。分離株より抽出したRNAからRT-PCR法によって各遺伝子を増幅し、PCR増幅産物をWizard SV Gel and PCR Clean-up System (Promega, USA) で精製後、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (ABI, USA) を用いたダイレクトシーケンシング法で塩基配列を決定した。更に既知のワクチン株及び標準株との相同性をMEGA7により解析し、近隣結合 (NJ) 法で系統樹解析を行った。

5. 薬剤耐性変異の検出

AH1pdm09亜型については、real-time PCR機器を用いたAllele-specific RT-PCR法⁷⁾ によりNA阻害薬に対する耐性変異であるNAの275番目のアミノ酸であるヒスチジン (H) からチロシン (Y) への変異 (H275Y) の有無を検出した。AH3亜型に関してはNA遺伝子塩基配列解析から既知の薬剤耐性変異に相当するアミノ酸変異 (E119V、R292K、N294S)¹¹⁾ を検索した。

結 果

1. FluV 分離・検出状況

図 1 にシーズン毎の型・亜型・系統別分離・検出割合を示した。16/17 シーズンは 634 検体中 517 検体から FluV を分離した。その内訳は AH1pdm09 亜型 14 検体(2.7%)、AH3 亜型 437 検体 (84.5%)、B 型ビクトリア系統 40 検体 (7.7%)、B 型山形系統 26 検体 (5.0%) であった。同様に 17/18 シーズンでは 612 検体中 507 検体から AH1pdm09 亜型 83 検体 (16.4%)、AH3 亜型 180 検体 (35.5%)、B 型ビクトリア系統 16 検体 (3.2%)、B 型山形系統 228 検体 (45.0%) を、18/19 シーズンは AH1pdm09 亜型 151 検体 (37.3%)、AH3 亜型 205 検体 (50.6%)、B 型ビクトリア系統 45 検体 (11.1%)、B 型山形系統 4 検体(1.0%) を分離・検出した。16/17 シーズンは AH3 亜型が流行の主であったが、17/18 シーズンは AH1pdm09 亜型、AH3 亜型、B 型山形系統の混合流行であり、18/19 シーズンは AH1pdm09 亜型、AH3 亜型の混合流行であった。A 型インフルエンザの流行は 14/15～16/17 シーズンでは AH1pdm09 亜型、AH3 亜型が交互に流行する傾向にあったが^{5,6)}、17/18、18/19 シーズンには双方の混合流行が確認された。B 型インフルエンザの流行はシーズン後半に認められることが多いが、17/18 シーズンの山形系統の流行では 12 月より流行を示し終盤まで継続した。また、県内を管轄保健所別に尾張西部（一宮、清須、江南、津島保健所）、尾張東部（半田、春日井、瀬戸、知多保健所）、西三河（衣浦東部、西尾、岡

崎市、豊田市保健所）、東三河（豊川、新城、豊橋市保健所）の 4 地域に分類し各シーズンの分離・検出状況を比較したところ地域間差はなかった（データ非掲載）。

2. 亜型・系統・年齢階層別検出割合と当該シーズンの抗ワクチン株抗体保有率

図 2 に各シーズンで流行した亜型・系統についての結果を示した。なお、年齢階層による検体数の偏りを考慮し 100 検体あたりの検出数に補正を行った。また、抗体保有率の調査に用いた標準株は表 1 に示した。16/17 シーズンの AH3 亜型では各年齢階層から偏りなくウイルス株が分離された。抗体保有状況では 5～9 歳の層で 89% と高い値を示した（図 2A）。17/18 シーズンでは AH1pdm09 亜型は低年齢層からの分離が多い傾向にあり、抗体保有率においても 5～19 歳の層で 69～90% 高い保有率であった。AH3 亜型では 20 代以上の年齢層での分離が多い傾向があった。その年齢層での抗体保有率は 11～25% と低い数値であった。B 型山形系統での分離状況は低年齢層と高年齢層での二峰性を示した。抗体保有率は全年齢層において 13% 以下となっていた（図 2B）。18/19 シーズンは、AH1pdm09 亜型で 5～9 歳と 40～49 歳の層で分離が比較的多かった。抗体保有率は 5～29 歳の層で 56～70% であった。AH3 亜型では 5～9 歳と 15～19 歳の層で分離数が若干少なく、抗体保有率は 5～29 歳の層で 52～100% と高い数値を示していた（図 2C）。

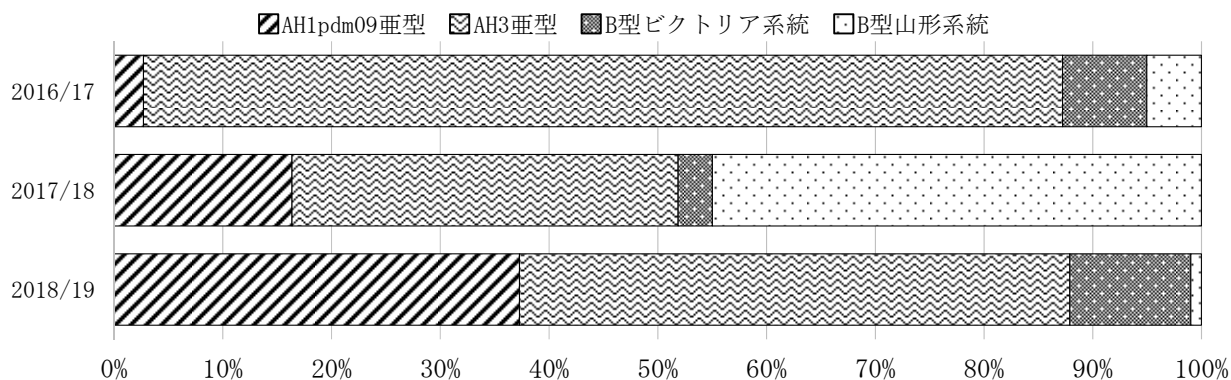


図1. シーズン別分離・検出割合

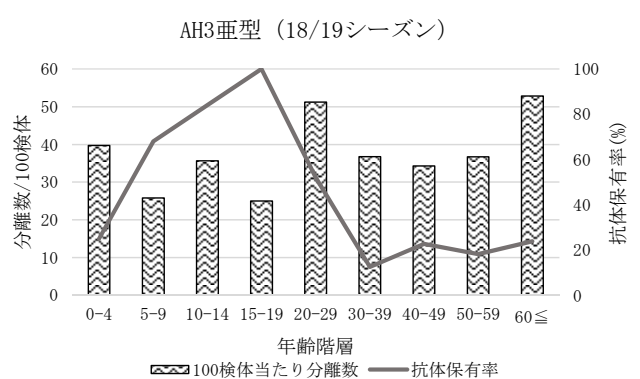
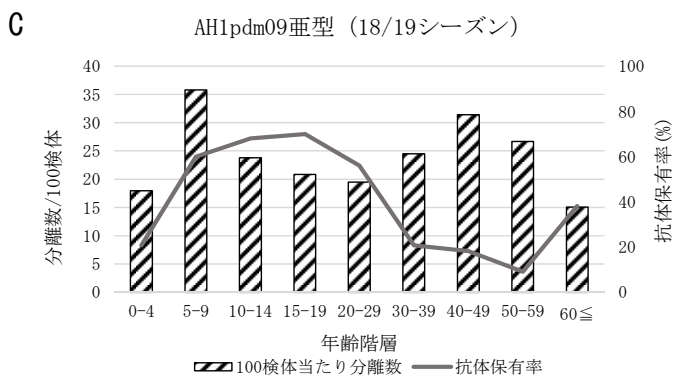
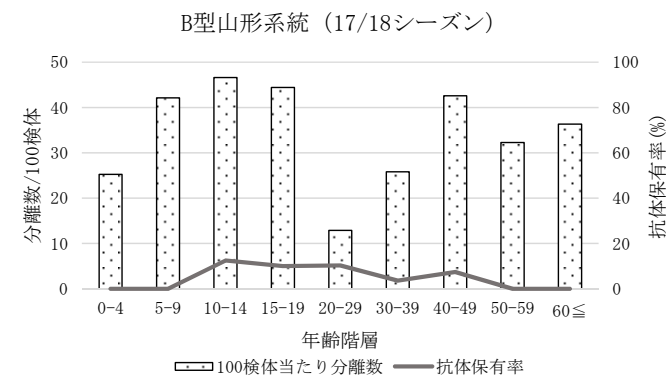
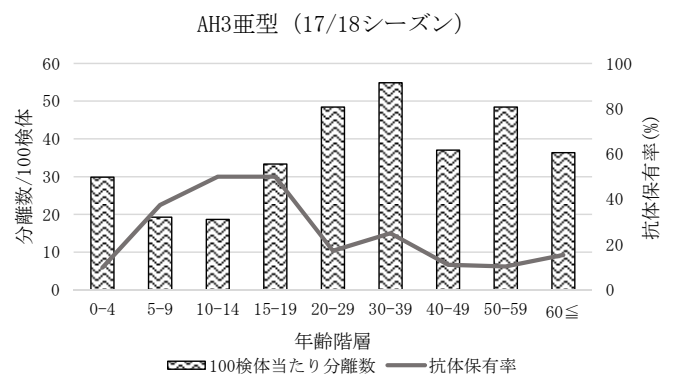
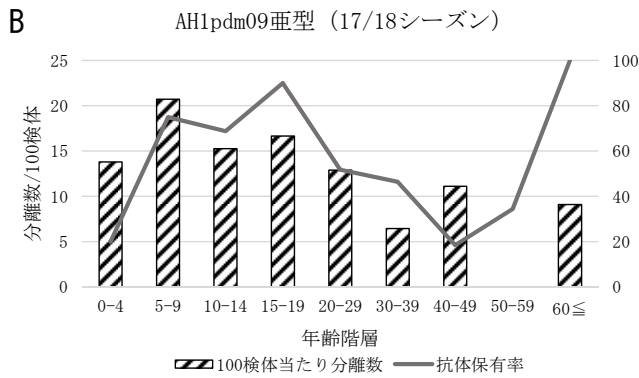
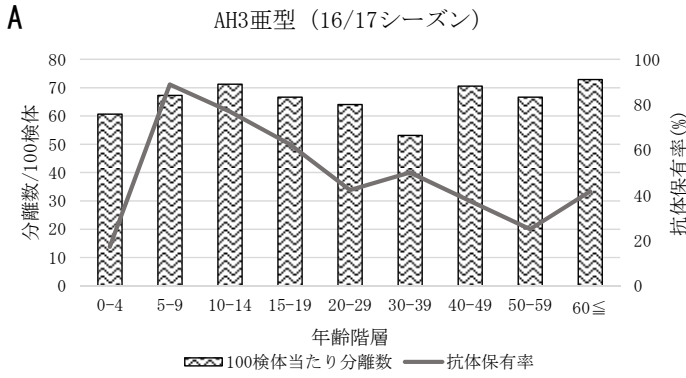


図2. 亜型・系統・年齢階層別検出割合と抗体保有率

3. FluV のシーズン別 HI 試験管差

感染研によりシーズン毎に配布された FluV 同定用サーベイランスキット (HI 試験用キット) を用い、HI 試験により亜型・系統の同定及びホモ価との差異を測定し、その結果を図 3 に示した。また、各シーズンに使用したキットの標準株 (ワクチン株) は表 1 に示した。なお、この項における株数は HI 試験実施可能株数とする。AH1pdm09 亜型では 3 管差 (8 倍) 以上の差を示す株が 16/17 シーズンで 14 株中 2 株 (14%)、

17/18 シーズンで 82 株中 0 株 (0%)、18/19 シーズンで 112 株中 20 株 (18%) と標準株を変更した 17/18 シーズンではホモ価との差異は小さくなったが、翌シーズンには再度拡大した。同様に AH3 亜型では 16/17 シーズンで 64 株中 22 株 (34%)、17/18 シーズンで HI 試験実施不可、18/19 シーズンで 25 株中 19 株 (76%) であり、HI 試験が実施可能な分離株においてホモ価との差異が大きい株が増加している。FluB では分離されたすべての株について HI 試験が実施でき、ホモ

表1. シーズン別標準株

亜型/系統	標準株名	16/17	17/18	18/19
AH1pdm09亜型	A/California/7/2009 (X-179A)	○		
	A/Singapore/GP1908/2015 (IVR-180)		○	○
AH3亜型	A/Hong Kong /4801/2014 (X-263)	○	○	
	A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016 (IVR-186)			○
B型ビクトリア系統	B/Texas/2/2013	○	○	
	B/Maryland/15/2016 (NYMC BX-69A)			○
B型山形系統	B/Phuket/3073/2013	○	○	○

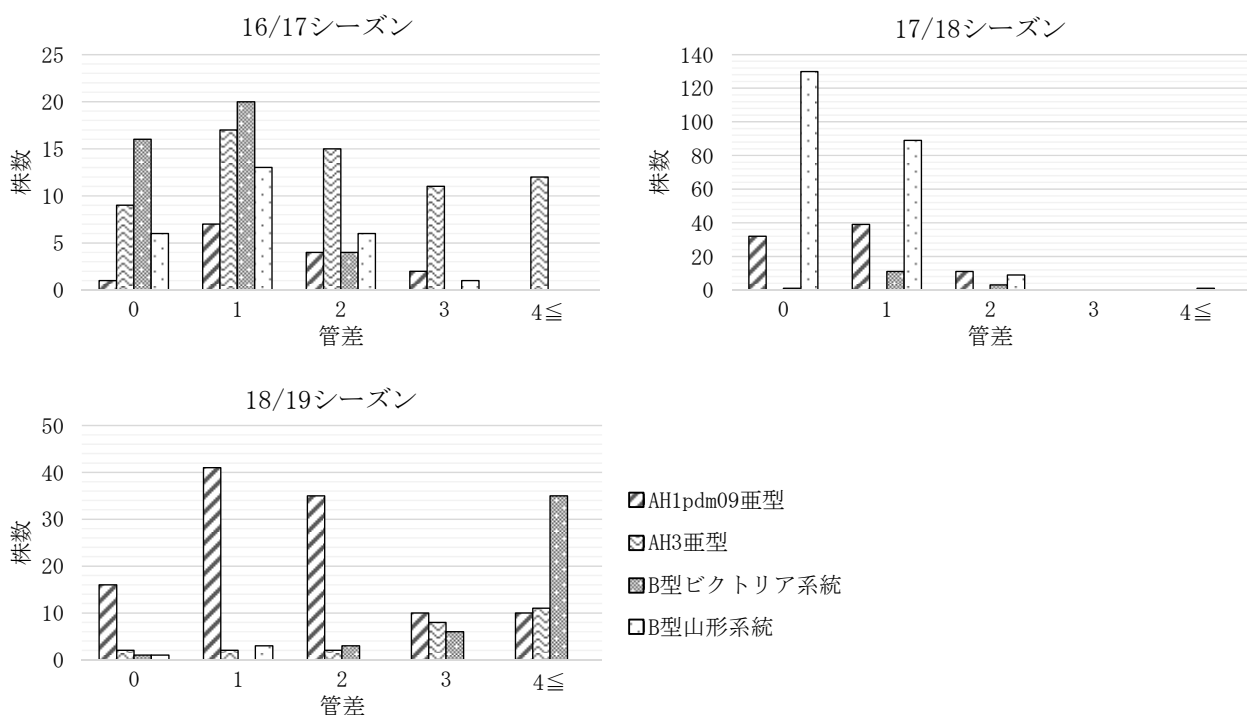


図3. シーズン別HI試験での管差 (ホモ価比)

価との差が3管差(8倍)以上となった株はビクトリア系統で17/18シーズンの16株中1株(6%)、18/19シーズンの45株中41株(91%)、山形系統で16/17シーズンの26株中1株(4%)であった。

4. FluA の HA 遺伝子系統樹解析と分子疫学的解析

調査期間内に検出された FluA の一部について HA 遺伝子塩基配列に基づいた系統

樹解析を行った。AH1pdm09の結果を図4Aに示した。調査該当シーズンの分離株63株はすべてクレード6B.1に分類された。16/17シーズンの分離株は1株を除き13株が6B.1に分類されたが、シーズン最終盤である8月に分離されたA/Aichi/338/17(シンガポール渡航歴あり)のみサブクレード6B.1Aに分類された。17/18シーズンではすべての分離株23株が6B.1Aに分類され、そのうちの3株が183P-2群に属していた。

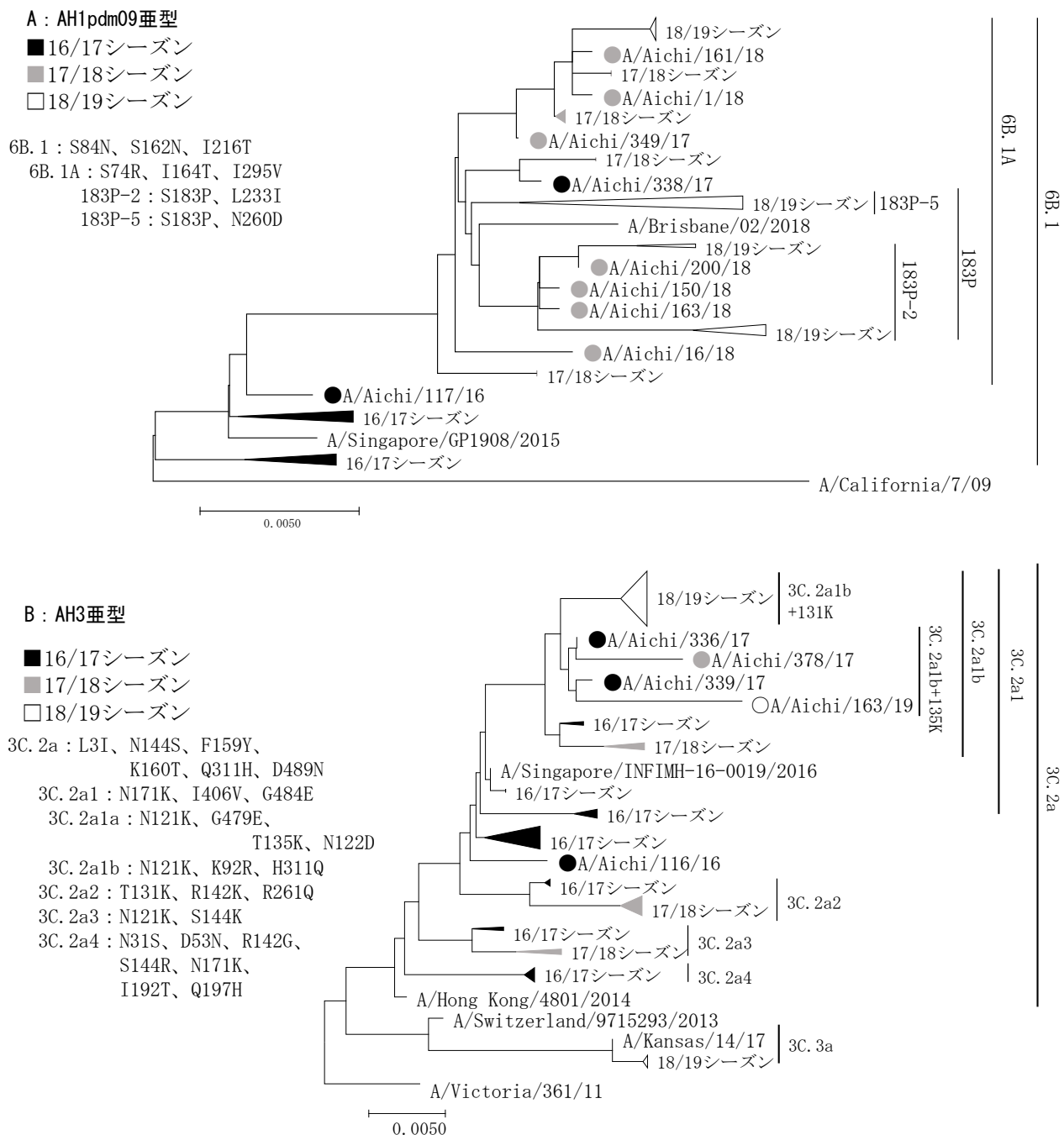


図4. FluAのHA遺伝子系統樹

18/19 シーズン株 26 株もすべて 6B. 1A に分類されたが、その中でも 183P-2 群や 183P-5 群などのクラスターを形成するなど遺伝的多様性が見られた。AH3 亜型の結果を図 4B に示した。16/17 シーズンの分離株 47 株はクレード 3C. 2a に分類されたが、その内部で 3C. 2a1、3C. 2a1b、3C. 2a2、3C. 2a3、3C. 2a4 の複数のサブクレードを形成していた。17/18 シーズンにおいても前シーズンと同様に 21 株が 3C. 2a1b、3C. 2a2、3C. 2a3 などの複数のサブクレードに属していた。18/19 シーズンでは解析した 26 株が 3C. 2a1b+131K に、1 株が 3C. 2a1b+135K に、1 株が 3C. 2a2 に分類された。また、2019 年 3 月～4 月に分離された 7 株が 3C. 3a に分類された。

5. NA 阻害薬に対する薬剤耐性変異の検出状況

世界的にも NA 阻害薬を含む抗インフルエンザ薬の使用量が多い我が国においては耐性株の出現状況を把握することは必要不可欠である。AH1pdm09 亜型 248 株について real-time PCR 機器による Allele-specific RT-PCR 法により耐性変異 (H275Y) の有無を検索した。その結果 16/17 シーズンでは未検出、17/18 シーズンでは 2 株 (2.4%)、18/19 シーズンでは 2 株 (1.3%) が検出された。全国における検索ではそれぞれ 1.1%、1.7%、0.9% であった^{12,13,14)}。AH3 亜型での NA 遺伝子の塩基配列解析では既知の薬剤耐性変異は認められなかった。

考 察

2016 年 4 月に改正感染症法が施行されインフルエンザサーベイランス体制が強化されたことに伴い当所に搬入される検体も増加している。2016 年 9 月から 2019 年 8 月までに名古屋市を除く愛知県内の感染症発生动向調査指定提出機関等で採取された、インフルエンザ及びインフルエンザ様疾患の咽頭ぬぐい液・うがい液 1,833 検体中 1,429 検体から Fluv が検出された。各シーズンの亜型・系統の検出割合は全国の数値^{12,13,14)}と近似していた。

AH1pdm09 亜型は 16/17 シーズンでの流行

は見られなかったが、17/18、18/19 シーズンと続けてシーズン前半に流行を示した。17/18 シーズン以降はクレード 6B. 1A 内で複数のクラスターの形成が認められるなど変異の蓄積による遺伝的多様化が進んできており、抗原性の変化等への注視が必要である。

AH3 亜型は 16/17 シーズンから 3 シーズン続けての流行となった。16/17、17/18 シーズンと 3C. 2a1、3C. 2a1b、3C. 2a2、3C. 2a3、3C. 2a4 のような複数のサブクレードが派生するなど遺伝的多様化が進んでいたものが 18/19 シーズンでは大部分がサブクレード 3C. 2a1b 株に属した。一方で欧米では 3C. 3a 株の流行が見られ¹⁵⁾、愛知県においても一時期ではあるが 3C. 3a 株が検出された。国内では他に 3C. 3a 株は検出されておらず¹⁴⁾、国民の抗体保有率は低いと推定される。19/20 シーズンのワクチン株にはこのクレードのウイルス株が選定されていること、更にこの亜型は遺伝的多様化と収束を繰り返していることから、19/20 シーズン以降、どのクレードに属する株が優位となるのか、今後も追跡を続けていく必要がある。

B 型ビクトリア系統では 18/19 シーズンでの HI 試験において 45 株中 41 株でホモ価との差が 8～32 倍と大きかった。これはワクチン株に設定された株が HA 遺伝子の 162、163 番目のアミノ酸が欠損した株であったのに対し、主として分離された株がアミノ酸欠損のない従来株と近縁であった可能性が考えられた。

B 型山形系統は 17/18 シーズンに大流行を起こした。11 月採取検体から分離され始め、5 月初頭まで継続的に分離された。HI 試験でのホモ価との差異も 16/17 シーズンの 1 株が 8 倍であった他はすべて 4 倍以下であった。感染研での抗原性解析においてもほぼすべての株で変異は確認されていない^{12,13,14)}。

年齢階層別の検出状況では、小児検体が多くなる傾向にあることから 100 検体あたりの分離・検出数へと補正を行って比較した。各亜型・系統をシーズン毎に比較すると特定の年齢層で検出数に特徴が出ること

はなかった。日本における AH1pdm09 亜型の基本再生産数は 1.45 とされており¹⁶⁾、この値を基にインフルエンザの集団免疫率を求めると 31%となる。しかしながら、本研究において抗体保有率が 31%を超える年齢層においても、それ以外の年齢層よりも検出率が低いとは言えなかった。これは、感染症発生動向調査事業と感染症流行予測調査事業の検体採取対象の違いによるバイアス、抗体保有率調査の対象人数が各年齢層で 22 名程度と限られていること、標準株と野生株との抗原性の差異によるものと考えられた。

抗インフルエンザ薬耐性変異の検索では AH1pdm09 亜型が流行を示した 17/18、18/19 シーズンで 2 株ずつ NA 阻害薬耐性変異である H275Y 変異を検出した。それぞれ散発的であり県内における耐性株の流行は見られていない。現在主流となっている NA 阻害薬とは作用機序の異なるエンドヌクレアーゼ阻害薬であるバロキサビルマルボキシルが 17/18 シーズン途中より使用が開始された。インフルエンザウイルスの遺伝子 RNA polymerase α (PA) の 38 番目のアミノ酸がイソロイシン (I) からトレオニン (T)、メチオニン (M) またはフェニルアラニン (F) に変異することで、この薬剤への耐性を獲得することが知られている¹⁷⁾。これらの変異についても検索することが重要と考えられるが、2019 年時点で感染研より推奨されている real-time PCR によるスクリーニング検査 (マニュアルは検査実施機関に感染研より配布) では I38T のみの検出系であり、詳細な検索にはダイレクトシーケンス法による塩基配列の決定が必要である。新規薬剤への耐性ウイルスの分散状況を把握するためにも迅速かつ簡便な検査方法の早期確立が望まれる。

謝 辞

愛知県内の定点医療機関、愛知県、豊橋市、岡崎市及び豊田市の各保健所、愛知県保健医療局健康医務部健康対策課、国立感染症研究所インフルエンザウイルス研究センターの皆様に深謝致します。

文 献

- 1) Shaw ML, Palese P: Orthomyxoviridae. Fields Virology Sixth edition (Knipe DM, Howley PM eds), 1151-1185, 2013, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- 2) 中村一哉、岸田典子、藤崎誠一郎ら：2014/15 シーズンのインフルエンザ分離株の解析．病原微生物検出情報 (IASR) 36(11):202-207, 2015.
- 3) 中村一哉、藤崎誠一郎、高下恵美ら：2017/18 シーズンのインフルエンザ分離株の解析．病原微生物検出情報 (IASR) 39(11):184-189, 2018.
- 4) 岸田典子、中村一哉、藤崎誠一郎ら：2018/19 シーズンのインフルエンザ分離株の解析．病原微生物検出情報 (IASR) 40(11):180-185, 2019.
- 5) 国立感染症研究所：病原微生物検出情報 (IASR) 週別インフルエンザウイルス分離・検出報告数 2012/13～2016/17 シーズン <https://www.niid.go.jp/niid/images/iasr/arc/gv/1617/data1617.2j.pdf>
- 6) 国立感染症研究所：病原微生物検出情報 (IASR) 週別インフルエンザウイルス分離・検出報告数 2015/16～2019/20 シーズン <https://nesid4g.mhlw.go.jp/Byogentai/Pdf/data2j.pdf>
- 7) 国立感染症研究所：病原体検出マニュアル：インフルエンザ診断マニュアル(第4版), 2018. <https://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/influenza20190116.pdf>
- 8) 厚生労働省健康局結核感染症課：平成 28 年度感染症流行予測調査実施要領, 2016 <https://www.niid.go.jp/niid/images/eipi/yosoku/AnnReport/2016-99.pdf>
- 9) 厚生労働省健康局結核感染症課：平成 29 年度感染症流行予測調査実施要領, 2017 <https://www.niid.go.jp/niid/images/eipi/yosoku/AnnReport/2017-99.pdf>
- 10) 厚生労働省健康局結核感染症課：平成 30 年度感染症流行予測調査実施要領, 2018 <https://www.niid.go.jp/niid/images/eipi/yosoku/AnnReport/2018-99.pdf>

- 11) Abed Y, Baz M, Boivin G: Impact of neuraminidase mutations conferring influenza resistance to neuraminidase inhibitors in the N1 and N2 genetic backgrounds. *Antiviral therapy* 11(8): 971-976, 2006.
- 12) 国立感染症研究所: 病原微生物検出情報 (IASR) <特集> インフルエンザ 2016/17 シーズン. 病原微生物検出情報 (IASR) 38(11):209-211, 2017.
- 13) 国立感染症研究所: 病原微生物検出情報 (IASR) <特集> インフルエンザ 2017/18 シーズン. 病原微生物検出情報 (IASR) 39(11):181-183, 2018.
- 14) 国立感染症研究所: 病原微生物検出情報 (IASR) <特集> インフルエンザ 2018/19 シーズン. 病原微生物検出情報 (IASR) 40(11):177-179, 2019.
- 15) Daniels R, Ermetal B, Rattigan A, McCauley J: Influenza virus characterisation, summary Europe, February 2019, 1-34, 2019, European Centre for Disease Prevention and Control, Stockholm.
- 16) Munasinghe L, Asai Y, Nishiura H: Quantifying heterogeneous contact patterns in Japan: a social contact survey. *Theoretical Biology and Medical Modelling* 16(6), 2019.
- 17) Uehara T, Hayden FG, Kawaguchi, et al.: *Journal of Infectious Disease pii: jiz244*, 2019, doi: 10.1093/infdis/jiz244

Genetic epidemiological analysis of influenza virus detected in Aichi Prefecture during 2016/17 and 2018/19 seasons

Tomochika Saito, Noriko Saito, Ayano Onouchi, Hiroko Minagawa, Miyabi Ito,
Yoshihiro Yasui, Masakado Matsumoto

Influenza virus is commonly known as causing respiratory illness mainly in winter seasons. A total of 1,833 throat swab samples were collected from patients with influenza and influenza-like illness in the sentinel hospitals in Aichi Prefecture during 2016/17 and 2018/19 seasons, and were undertaken to isolate influenza viruses using MDCK cell culture. The isolated viruses were identified by haemagglutination inhibition test or conventional reverse transcriptional PCR. The relationship between seroprotection of anti-influenza virus and the isolated viruses was investigated, however, we found no relevance. We analyzed phylogenetic trees of haemagglutinin gene of influenza A viruses. AH1pdm09 isolates showed genetic heterogeneity caused by accumulated mutations. On the other hand, AH3 isolates also showed genetic heterogeneity in 2016/17 and 2017/18 seasons, while in 2018/19 season these isolates were grouped mainly into one clade. Additionally, the surveillance for H275Y mutation of neuraminidase gene which causes oseltamivir-resistant was performed. Although 4 AH1pdm09 isolates had this mutation during research terms, no evidence of sustained spread of oseltamivir-resistant AH1pdm09 isolates was found in Aichi Prefecture.

Key words: influenza virus, genetic epidemiology, surveillance, drug resistance

調 査 研 究

流入下水から検出されたノロウイルス及びサポウイルスの 動態と遺伝子解析 (2014/15－2018/19 シーズン)

秦 眞美、伊藤 雅、中村範子、安井善宏、松本昌門

要 旨

2014年9月から2019年8月(2014/15～2018/19シーズン)までに県内の下水処理場で採水された流入下水259件について、ノロウイルス(NoV)およびサポウイルス(SaV)の有無を遺伝子検出法により調査した。その結果、103件(39.8%)からNoV GI、185件(71.4%)からNoV GII、27件(10.4%)からSaVを検出した。遺伝子解析により検出ウイルスの遺伝子型を決定したところ、NoV GIは8遺伝子型が検出され、そのうちGI.2及びGI.3が多数を占めた(72.5%)。NoV GIは2014/15-2015/16シーズンでは多く検出されたが、その後のシーズンの検出率は低かった。NoV GIIは7遺伝子型が検出された。調査した期間を通じてGII.4の検出率が高かったが、2014/15-2015/16シーズンはGII.3及びGII.17が、2016/17シーズン以降はGII.2が優勢であった。SaVは3遺伝子型が検出された。それぞれのウイルス株の系統樹解析の結果、下水から検出された株は食中毒事例の患者から検出された株と検出時期や遺伝子配列が良く類似しており、市中での流行株の推移と特徴を反映していた。

キーワード：下水、ノロウイルス、サポウイルス

序 文

ノロウイルス(Norovirus: NoV)、サポウイルス(Sapovirus: SaV)は冬季に流行する感染性胃腸炎及びウイルス性食中毒の主要な病原ウイルスである。NoVは全長約7.5kbのプラス1本鎖RNAウイルスで、カリシウイルス科ノロウイルス属に分類される。NoVゲノムには3つの蛋白質コード領域(open reading frame; ORF)が存在しており、ORF1は非構造蛋白質、ORF2は構造蛋白質1(VP1)、ORF3は構造蛋白質2(VP2)をコードしている。NoVは遺伝子配列の相同性に基づきGI～GVIIの遺伝子グループに分類さ

れ、このうちGIとGIIが主にヒトに感染する。さらにGIは9種類(GI.1-9)、GIIは22種類(GII.1-22)の遺伝子型に分類されている¹⁾。SaVもカリシウイルス科に属すが、サポウイルス1種である。7.1～7.7kbのプラス1本鎖RNAウイルスで、ORF1に非構造蛋白質及びVP1がコードされている。遺伝子型はヒトに感染するGI、GII、GIV、GV及びブタに感染するGIIIがあり、GI、GIIはさらに複数の遺伝子型に分かれる²⁾。現在、NoV及びSaVの遺伝子検出は上述のVP1領域を用い、その遺伝子配列を調べることにより遺伝子型分類が行われている^{3,4)}。

NoV、SaV等を含む腸管系ウイルスは、感染者の腸内で増殖し糞便中に排泄され、下水や河川水などの環境中に存在する。環境水中のウイルス汚染状況については海外を含め各地で調査されている^{5,6)}。当所では、愛知県内の下水処理場から採取された流入下水から検出される腸管系ウイルスの調査研究を2001年より継続して行ってきており、これまでに下水から検出した腸管系ウイルスについての解析結果を報告してきた^{7,8,9)}。本稿では、2014/15-2018/19の5シーズンに検出した下水中のNoV、SaVについて、流行ウイルス株の動態を調査し、遺伝子解析を試みた結果を報告する。

材料と方法

1. 下水検体

愛知県中央部を流域とする境川浄化センターに流入する下水から毎週1回採水された流入下水検体のうち、2014年9月から2019年8月までの259検体を用いた。下水検体は5000g、20分遠心分離した上清にポリエチレングリコール6000(10%)、塩化ナトリウム(3%)を加え、4℃、一晚静置後、再び遠心して沈査を精製水で溶解し10倍に濃縮した検体を用いた。さらに、毎週採水された下水検体を合わせた1ヶ月の下水500mLを陰電荷膜法⁶⁾にて50倍濃縮し、定量PCRの検体として用いた。

2. 遺伝子検出及び遺伝子解析

High Pure Viral RNA Kit (Roche)により下水濃縮液からRNA抽出を行った。得られたRNAからSemi-nested RT-PCR法にてNoV GI、GII及びSaV遺伝子のVP1領域を既報¹⁰⁻¹²⁾に記載の方法で増幅し、それぞれのウイルスについて遺伝子の検出を行った。RT-PCR法陽性検体はWizard Plus SV Miniprep DNA Purification System (Promega)にて精製後、pGEM-T (Promega)にクローニングし、複数個のコロニーを釣菌してプラスミドDNAを抽出し、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies)-ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)にて塩基配列を決定した。得られた塩基配列はMEGA ver. 7.0により近隣

結合法(NJ法)により解析を行った。なお、NoVの遺伝子型は2015年に改訂された記載法(<https://www.niid.go.jp/niid/ja/norovirus-m/norovirus-iasrs/5913-pr4274.html>)に従い、2015年版の標準株を用いて遺伝子解析を行った。SaVの標準株は文献²⁾に記載の株を用いた。

3. 定量PCR

2016/17シーズンの検体については、さらに上述の50倍濃縮液を用いてNoV GI、GII及びSaVの定量PCR^{13,14)}を行った。

結果と考察

1. 下水からのウイルス検出

下水259検体を調査した結果、103検体(39.8%)からNoV GI、185検体(71.4%)からNoV GII遺伝子が検出され、SaV遺伝子は27検体(10.4%)から検出された。それぞれのウイルス遺伝子型と検出時期を図1にまとめた。

下水検体は同一検体から複数のウイルス、遺伝子型が検出される場合がある。NoV GIが検出された103検体には複数の遺伝子型を検出した検体もあるため、ウイルス株数としては137株検出された。遺伝子型はGI.1、GI.2、GI.3、GI.4、GI.5、GI.6、GI.7、GI.9の8種であった。NoV GIの検出率は2014/15-2015/16シーズンは高かったが、他のシーズンでは低かった。遺伝子型ではGI.2(48株)とGI.3(51株)が全体の7割を占め、他の遺伝子型は5シーズンを合わせてもそれぞれ数株までであった。

NoV GIIは185検体から266株検出され、遺伝子型はGII.1、GII.2、GII.3、GII.4、GII.13、GII.14、GII.17の7種であった。NoV GIIは冬季の検出率が高いものの、年間を通じ下水中から高い確率で検出された。5年の調査期間を通じてGII.4(90株)の出現率が最も高かったものの、2014/15~2015/16シーズンではGII.3(55株)とGII.17(37株)が多く検出されており、2016/17シーズン以降はGII.2(72株)の出現率が高かった。

SaVは27検体から28株、GI.1、GI.2、GV.1の3種が検出され、このうちGI.1(17株)が

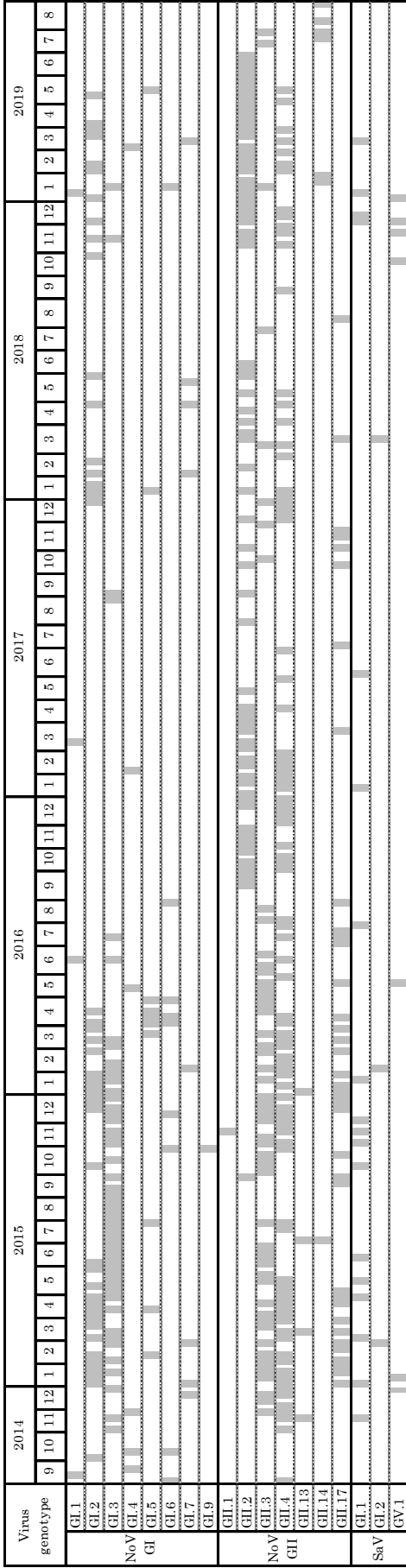


図 1. 下水中のノロウイルス GI, GII 及びサポウイルスの検出状況と遺伝子型

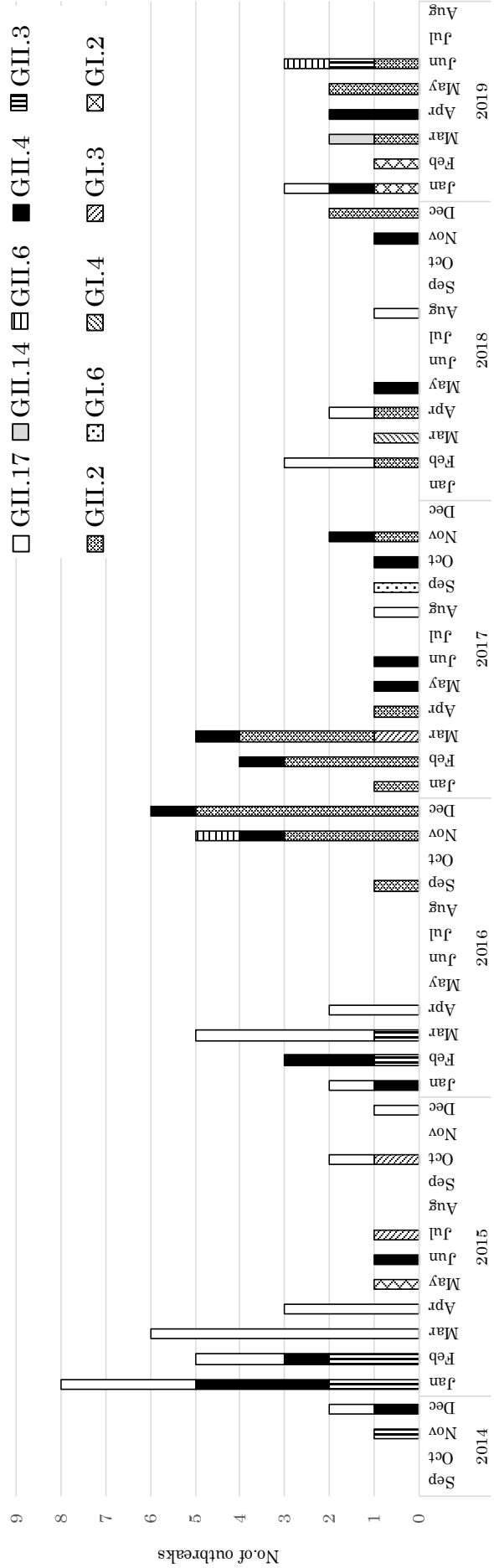


図 2. 食中毒集団事例から検出されたノロウイルスの遺伝子型

最も多く、6割を占めた。

NoV, SaVはウイルス性食中毒の主な原因ウイルスである。調査期間中に愛知県内で発生した食中毒事例から検出されたヒト糞便由来のNoV GI, GIIの遺伝子型を図2にまとめた。なお、調査期間中にSaVによる食中毒の発生事例はなかった。下水から検出されたウイルスの遺伝子型と検出時期を比較すると、食中毒の発生時期はGI, GIIとも下水からの検出件数が多かった時期とほぼ一致していた。NoV GIの食中毒事例は少ないものの、下水からの検出頻度が高かったGI.2やGI.3の事例が複数発生していた。NoV GIIではGII.4, GII.2, GII.17, GII.3が検出された事例が多数発生しており、これらの遺伝子型は下水からの検出件数も多かった。一方、GII.6は2件の食中毒事例が認められたが、下水からはこの遺伝子型は検出されなかった。

2. 遺伝子解析

検出ウイルスはすべてVP1遺伝子の系統樹解析により遺伝子型別を行ったが、本稿では同一配列を除いた主な株を解析した結果のみを示す。解析には、食中毒の集団事例から検出したヒト由来ウイルス株（食中毒由来株）も参照株として加えた。解析した下水由来株は検体番号__採水年月日で、食中毒由来株は検体番号 F〇〇__採取年月日で表記した。NoV GI株はGI.2とGI.3の検出件数が多かったが、検出時期は2014-2015年に偏っており、他の遺伝子型の検出数はわずかでシーズンによる変化等を解析するには至らなかった(図3)。食中毒由来株の参照株と下水由来株はGI.6を除き、同じclusterに含まれていた。GI.2はほぼ均一な集団を形成していたが、GI.3はsubclusterを複数形成していたため、標準株を複数含めて解析した。GI.3は同一遺伝子型でも遺伝子配列が多様であり、今後の動向に注意すべき遺伝子型と思われた。

図4(A)にNoV GII株から同定された7種の遺伝子型の結果を示す。検出件数の多かったGII.4, GII.2についてはpolymerase遺伝子型を考慮し、さらに詳しく解析した。GII.4には多くの亜型(Sydney_2012, New

Orleans_2009, Den Haag_2006bなど)が存在するが、図4(A)(B)に示すように下水由来株はすべてSydney 2012亜型であった。下水由来株は2つのcluster aとbを形成し、さらにcluster aから枝分かれしたcluster cを形成していた。近年のNoVはORF1にコードされるpolymerase領域とORF2にコードされるVP1領域との境界領域で組み換えを起こした組み換え型ウイルスが主流となっているため、食中毒由来株についてはVP1遺伝子の他にpolymerase遺伝子の解析も行っている。著者らは既報¹⁰⁾でpolymerase遺伝子型がGII.P16である新たなGII.4_sydney2012 (polymerase遺伝子型及びVP1遺伝子型を併記してGII.P16-GII.4と記す)を報告した。以前から存在していたpolymerase遺伝子型がGII.PeであるGII.4_sydney2012 (GII.Pe-GII.4)とはVP1遺伝子の配列に変化が認められたことを報告している。そのため食中毒由来株の配列を参照株として解析に加え、下水由来株のpolymerase領域の遺伝子型を類推した。その結果、食中毒由来株(GII.P16-GII.4)のVP1配列:F156_20190108、F18_20190413、F24_20170531、F104_20161106はcluster cに分類され、下水由来株についても、cluster cに含まれるGII.4株:G2R45-2_20190207、G2P28-2_20161005、G2Q3-2_20170419が認められた。これら下水由来株のpolymerase遺伝子型はGII.P16である可能性が考えられた。これらcluster cに分類される下水由来株には、食中毒由来株と同様に2016/17シーズン以降の株が含まれており、新たな遺伝子型(組み換え型)GII.P16-GII.4は少なくとも2016/17シーズンから出現していたと考えられた。GII.Pe株は2つのcluster a, bに分かれているものの、2017/18シーズン以降はcluster bに含まれる株が増えている傾向が見られた。

GII.2は2014/15-2015/16シーズンにはほとんど検出されなかったが、2016/17シーズン以降、GII.2の検出件数が増えている。同シーズンの食中毒事例から検出したGII.2株はpolymerase遺伝子型がGII.P16

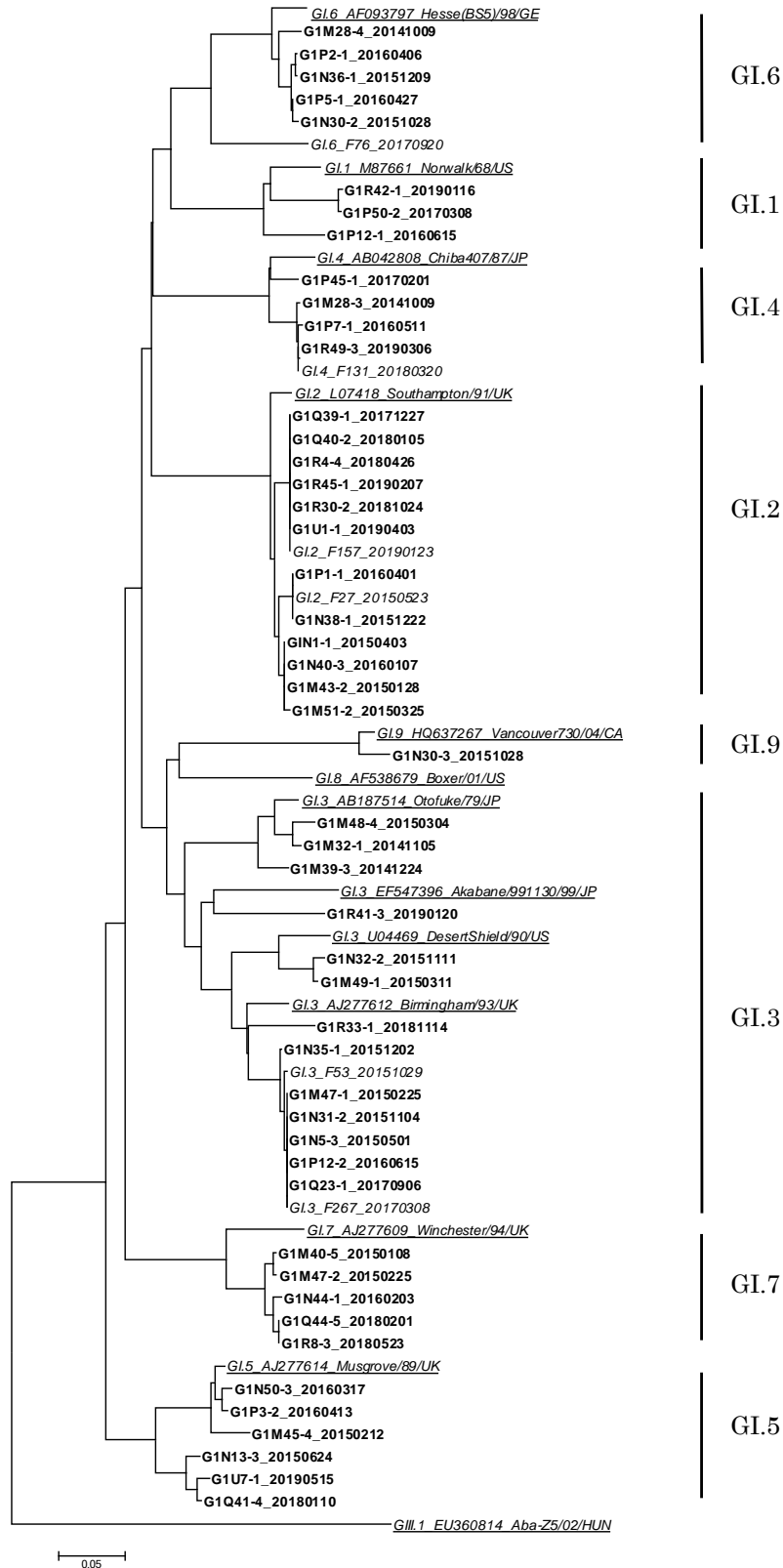


図 3. 下水から検出されたノロウイルス GI の系統樹解析 (VP1 遺伝子)

下線付き斜体は標準株、斜体は食中毒由来参照株
 検体：検体番号__採水年月日で表記

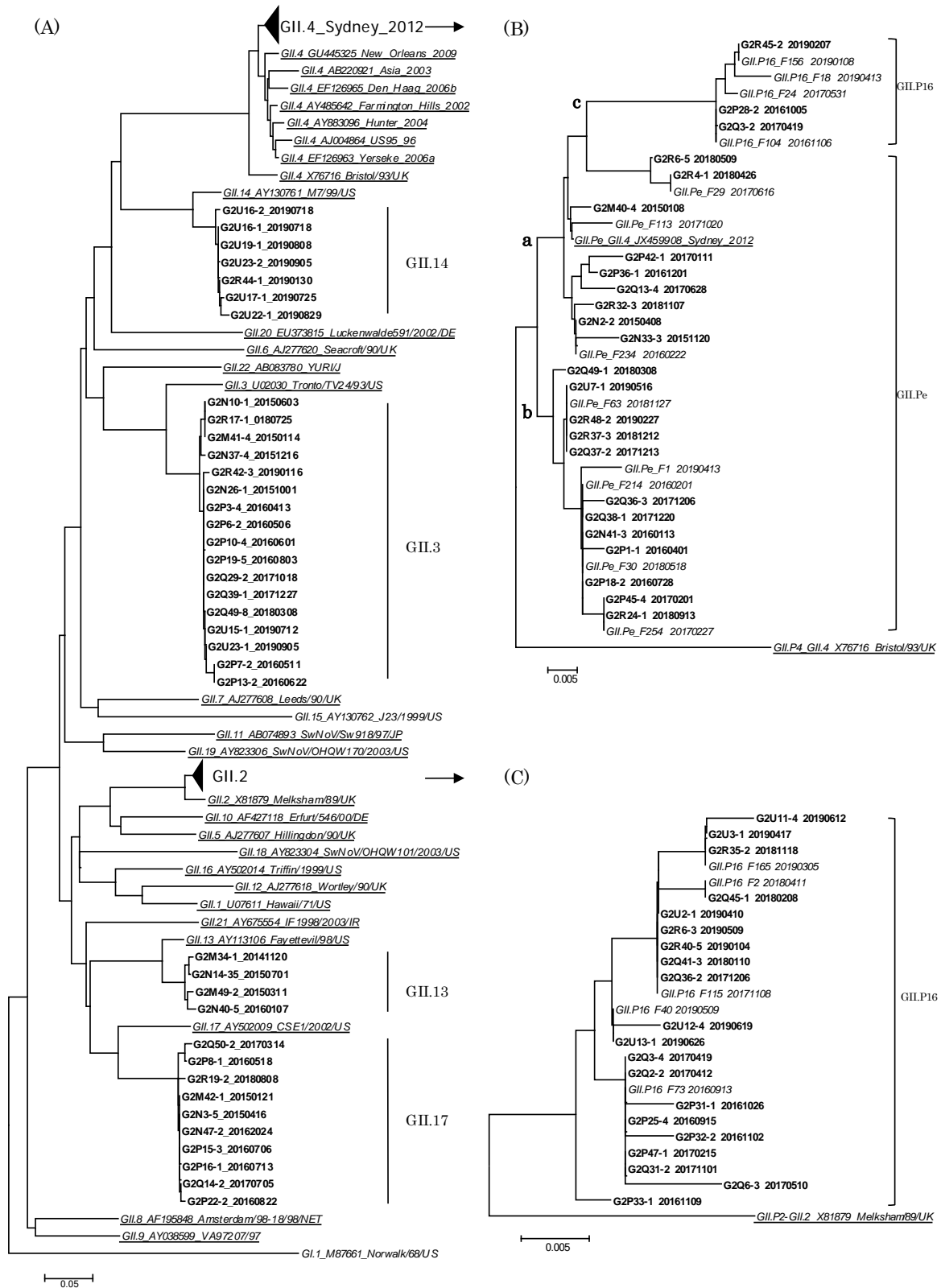


図 4. 下水から検出されたノロウイルス GII の系統樹解析 (VP1 遺伝子)

(A): 検出された全遺伝子型を示す。検出株数の多かった GII.4 と GII.2 は polymerase 遺伝子型既知 (GII.Pe または GII.P16) の参照株と共に解析し、それぞれ (B) と (C) に示した。下線付き斜体は標準株、斜体は食中毒由来参照株

である新たな遺伝子型（組み換え型）GII.P16-GII.2であった¹⁰⁾。その後に出検された食中毒由来 GII.2 株もすべて同遺伝子型であった。これらの株を参照株として下水由来株を解析すると標準株 Melksham_89 (GII.P2-GII.2) とは異なり、食中毒由来株の GII.P16-GII.2 に近縁であることから polymerase 遺伝子型は GII.P16 と推察された（図 4(C)）。

GII.3 も検出件数が多い株であったが、検出株に大きな変化は認められなかった。

なお、これらの GII.3 株の polymerase 領域は同様に参照株から GII.P12-GII.3 と推定された（データ示さず）。同様に GII.14 株は GII.P7-GII.14、GII.17 株は 2014/15 シーズンに新たに出現したウイルス株であり、GII.P17-GII.17 と推定された（データ示さず）。

SaV の検出株は GI.1、GI.2 及び GV.1 の 3 遺伝子型であったが、調査期間中の検出株はほぼ同様で、変化は認められなかった（図 5）。

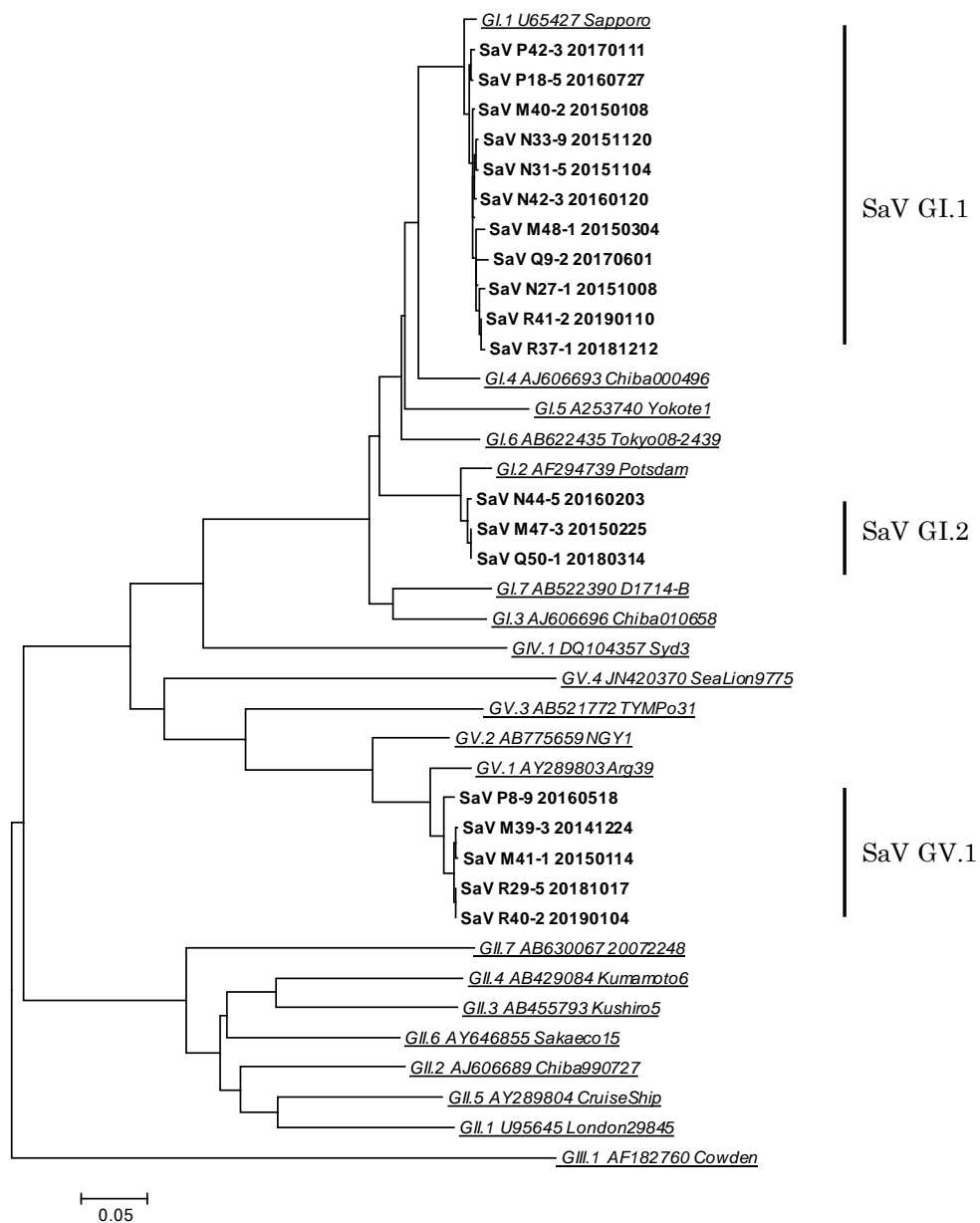


図 5. 下水から検出されたサポウイルスの系統樹解析（VP1 遺伝子）

3. 定量 PCR

定性 PCR による遺伝子検出では検体中のウイルス量は不明であるため、2016/17 シーズンについてはさらに定量 PCR を試みた。図 6 に結果を示す。下水 1L あたり $10^{2\sim5}$ コピーのウイルスが検出された。定性 PCR の結果で検出数の少なかった NoV GI は定量 PCR の結果でも低い値を示した。GII はほぼ恒常的に検出されていたが、冬季に高い値を示した。同シーズンは GII.2 の検出率が高く、ヒト糞便からの検出も最も優勢な遺伝子型であった¹⁰⁾。今回は 1 シーズンだけの試みであったが、他のシーズンも同様に定量 PCR を行うことにより、各シーズンの流行規模を比較できると考えられ、流行状況をモニターするためには有効な手段と思われる。

NoV GI、GII の検出状況は定性 PCR の結果とほぼ対応していたが、SaV については定性 PCR の検出件数は少なかったのに対し、定量 PCR の検出率は高かった。SaV の定性 PCR 法では比較的長い遺伝子断片を増幅するため、濃度が低い下水中のウイルスは検出し難いと考えられる。流行ウイルスの遺伝子型を調べるためには定性 PCR による検出が必須であるため、現行の検出法の見直し等、検討が必要と考えられた。

まとめ

ウイルス性食中毒の原因ウイルスとなる NoV の下水からの検出動向は、愛知県内の食中毒集団事例の患者から検出されたウイルス株と検出時期や遺伝子型、遺伝子配列が良く類似していた。SaV も食中毒の原因ウイルスであるが、調査期間中の集団事例の発生はなく、下水からの検出件数も少なかった。下水中のウイルスは市中での流行状況を反映しており、下水中ウイルスの調査結果は流行ウイルスの把握や対策に有用な知見となると考えられた。

NoV GII の下水からの検出率は、シーズンによる違いは大きくはなかったが、食中毒事例からは 2016 年冬季に突出して検出率が高くなっている。これは当時全国的に流行した GII.P16-GII.2 という新たな組み換え型ウイルスの株であり、本研究の遺伝子解析から下水中のウイルスも同型であることが示唆された。本研究の定量 PCR の結果でも同年冬季に下水中の NoV GII の増加が認められた。定量 PCR で下水中の NoV、SaV の濃度を常時モニターしていれば、濃度の高いシーズンには注意喚起するなど食中毒発生予防に有用な情報を提供できると思われた。

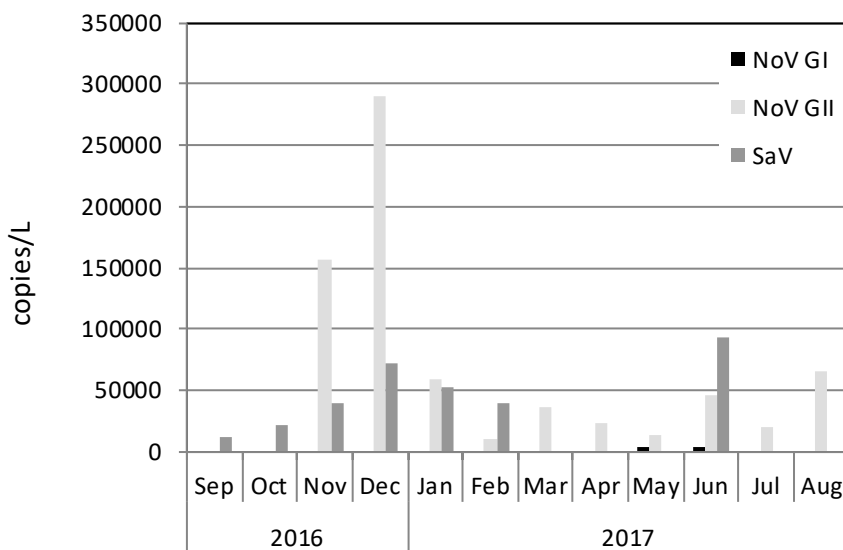


図 6. 定量 PCR 法による下水からのノロウイルス、サポウイルスの検出

謝 辞

流入下水の採水にご協力いただきました境川浄化センター並びに衣浦東部保健所の皆様に深謝いたします。

文 献

- 1) Vinjé J: Advances in laboratory methods for detection and typing of norovirus. *Journal of Clinical Microbiology* 53(2):373-381, 2015.
- 2) Oka T, Wang Q, Katayama K, Saif LJ: Comprehensive review of Human Sapoviruses. *Clinical Microbiology Reviews* 28(1):32-53, 2015.
- 3) Katayama K, Shirato HH, Kojima S, Kageyama T, Oka T, Hoshino FB, Fukushi S, Shinohara M, Uchida K, Suzuki Y, et al: Phylogenetic analysis of the complete genome of 18 Norwalk-like viruses. *Virology* 299(2):225-239, 2002.
- 4) Okada M, Yamashita Y, Oseto M, Shinozaki K: The detection of human sapoviruses with universal and genogroup specific primers. *Archives of Virology* 151(12):2503-2509, 2006.
- 5) Tao Z, Xu M, Lin X, Wang H, Song L, Sang U, Zhou N, Zang D, Xu A: Environmental surveillance of genogroup I and II noroviruses in Shandong Province, China in 2013. *Scientific Reports* 5:17444. doi: 10.1038/srep17444, 2015.
- 6) Iwai M, Hasegawa S, Obara M, Nakamura K, Horimoto E, Takizawa T, Kurata T, Sogen S, Shiraki K: Continuous presence of noroviruses and sapoviruses in raw sewage reflects infections among inhabitants of Toyama, Japan (2006 to 2008). *Applied Environmental Microbiology* 75(5):1264-1270, 2009.
- 7) 藤浦 明、小林慎一、山下昭夫、椛島由佳、伊藤 雅、榮 賢司: 矢作川浄化センターに流入する下水からのウイルス分離について. *愛知県衛生研究所報* 53:21-26, 2003.
- 8) 水谷絵美、安達啓一、藤原範子、伊藤雅、山下照夫、藤浦 明、皆川洋子: 2006年から2010年に流入下水から分離されたエンテロウイルスの消長. *愛知県衛生研究所報* 61:11-18, 2011.
- 9) 山下昭夫、安達啓一、伊藤 雅、廣瀬絵美、中村範子、尾内彩乃、安井善宏、小林慎一、皆川洋子: 下水及びイヌから検出されるコブウイルスの遺伝子解析. *愛知県衛生研究所報* 66:10-19, 2016.
- 10) Hata M, Nakamura N, Kobayashi S, Onouchi A, Saito T, Hirose E, Adachi H, Saito N, Ito M, Yasui Y, Matsumoto M, Minagawa H: Emergence of new recombinant noroviruses GII.P16-GII.2 and GII.P16-GII.4 in Aichi, Japan, during 2016/17 season. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 71(4):319-322, 2018.
- 11) Nakamura N, Kobayashi S, Minagawa H, Matsushita T, Sugiura W, Iwatani Y: Molecular epidemiology of enteric viruses in patients with acute gastroenteritis in Aichi prefecture, Japan, 2008/09-2013/14. *Journal of medical virology* 88(7):1180-1186, 2016.
- 12) Kobayashi S, Fujiwara N, Yasui Y, Yamashita T, Hiramatsu R, Minagawa H: A foodborne outbreak of sapovirus linked to catered box lunches in Japan. *Achieve of Virology* 157(10):1995-1997, 2012.
- 13) Kageyama T, Kojima S, Shinohara M, Uchida K, Fukushi S, Hoshino FB, Takeda N, Katayama K: Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 41:1548-1557, 2003.
- 14) Oka T, Katayama K, Hansman GS, Kageyama T, Ogawa S, Wu FT, White PA, Takeda N: Detection of human sapovirus by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. *Journal of Medical Virology* 78(10):1346-1353, 2006

Molecular detection and analysis of Noroviruses and Sapoviruses in sewage samples from 2014/15 to 2018/19 seasons

Mami Hata, Miyabi Ito, Noriko Nakamura, Yoshihiro Yasui, Masakado Matsumoto

From September 2014 to August 2019, we conducted environmental surveillance of Norovirus GI (NoV GI), Norovirus GII (NoV GII) and Sapovirus (SaV) on 259 samples of raw sewage waters collected every week at the inflow of a sewage treatment plant in Aichi Prefecture, Japan. Of the 259 sewage samples, 103 (39.8%) were found to be positive for NoV GI with RT-PCR, 185 (71.4%) were positive for NoV GII and 27 (10.4%) were positive for SaV. Eight genotypes of NoV GI were detected, of which GI.2 and GI.3 accounted for the majority (72.5%). NoV GI was frequently detected in the 2014/15 to 2015/16 season, while few was detected in subsequent seasons. As for NoV GII, 7 genotypes were detected. Although the detection rate of GII.4 was high throughout the survey period, GII.3 and GII.17 were dominant in the 2014/15 to 2015/16 seasons, and GII.2 was dominant after the 2016/17 season. As for SaV, 3 genotypes were detected. The phylogenetic analysis showed that the virus strains detected in sewage were similar to the strains detected in patients with food poisoning cases in terms of detection time and gene sequence. It suggested that the viruses in sewage reflect the epidemic strains circulating in the community.

Key words: sewage, Norovirus GI, Norovirus GII, Sapovirus

調 査 研 究

2009年から2018年に愛知県において分離された 腸管出血性大腸菌の志賀毒素遺伝子サブタイプ

高橋佑太、山田和弘、青木美耶子、中根衣久美、四本信輔、
續木洋一、松本昌門

要 約

腸管出血性大腸菌 (*Enterohemorrhagic Escherichia coli*: EHEC) 感染症は、年間約 4,000 例報告されており、重症化すると溶血性尿毒症症候群 (HUS) や脳症を引き起こし、死に至ることもある。近年、EHEC が保有している志賀毒素 (Shiga toxin: Stx) 遺伝子サブタイプの種類が重症化に関連していると報告されている。そこで今回 2009 年から 2018 年に愛知県において分離された EHEC の血清型及び *stx* 遺伝子サブタイプの保有状況調査を実施した。EHEC 255 株の血清型は O157 が 181 株 (71.0%) と最も多く、次いで O26 が 40 株 (15.7%) であった。*stx* 遺伝子及び *stx* 遺伝子サブタイプの保有状況は、*stx1* 遺伝子を単独で保有していたのは 56 株 (22.0%) で、そのサブタイプは全て *stx1a* であった。また、検出された *stx2* 遺伝子サブタイプは *stx2a* 及び *stx2c* であった。O157 において最も多く検出された *stx* 遺伝子サブタイプの組み合わせは *stx1a+stx2a* が 101 株 (57.1%) で、次いで *stx1a+stx2c* が 28 株 (15.8%) であった。また、重症化患者から分離されることが多い *stx2a*、*stx2a+stx2c*、*stx1a+stx2a* の合計保有率が 71.2% と高率であった。愛知県における EHEC の血清型の分布や *stx* 遺伝子サブタイプの保有状況は患者の重症度や予後の推察の一助になる可能性があることから、今後も継続的に調査していくことが重要である。

キーワード：腸管出血性大腸菌、志賀毒素、*stx* 遺伝子サブタイプ

序 文

腸管出血性大腸菌 (*Enterohemorrhagic Escherichia coli*: EHEC) 感染症は、「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」において三類感染症であり、診断した医師は全数届出する義務がある。EHEC 感染症は志賀毒素 (Shiga toxin: Stx または Vero toxin: VT) を産生する、または *stx* 遺伝子を保有する EHEC の感染により成立する。EHEC 感染症の主症状は腹痛、水様性下痢及び血便等の消化器症状である

が、重症化して溶血性尿毒症症候群 (HUS) や脳症を引き起こし、死に至ることもある¹⁾。日本では年間 3,000~4,000 例程度が届出されており、愛知県でも 100~200 例程度の届出がある²⁾。EHEC が保有する *stx* 遺伝子には *stx1* 遺伝子と *stx2* 遺伝子があり、さらに遺伝子サブタイプとして *stx1* 遺伝子には *stx1a*、*stx1c* 及び *stx1d* が、*stx2* 遺伝子には *stx2a*、*stx2b*、*stx2c*、*stx2d*、*stx2e*、*stx2f* 及び *stx2g* が存在する。これまでに Stx1 より Stx2 の方が重症化に関与してい

ること、及び保有する遺伝子サブタイプの種類によっても病原性に違いがあることが疫学的に示されている^{3,4)}。血便患者やHUS患者等の重症化患者から分離される *stx* 遺伝子のサブタイプは、*stx2a*、*stx2a+stx2c* 及び *stx1a+stx2a* の報告が多い^{5,6)}。そこで今回、愛知県内で分離された EHEC の *stx* 遺伝子サブタイプの分布状況を把握するため、2009 年から 2018 年の間に当所に搬入された EHEC の血清型及び *stx* 遺伝子サブタイプ保有状況調査を実施した。

材料と方法

供試菌株：2009 年から 2018 年の間に当所に搬入された EHEC 255 株 (diffuse outbreak 及び家族内感染の株はまとめて 1 株として集計) を用いた。

血清型別：病原性大腸菌免疫血清 (デンカ生研) を用いて、0 群血清型別を行った。

DNA 抽出：供試菌を tris-EDTA Buffer (pH 8.0) 100 μ L に少量懸濁し、95°C で 10 分間加熱した。その後、12,000 rpm で 2 分間遠心分離し、その上清をテンプレートとした。

stx 遺伝子検出 PCR：TaKaRa Ex Taq® Hot Start Version (タカラバイオ) を用い、TaKaRa Ex Taq HS 0.06 μ L、10×Ex Taq Buffer 2 μ L、dNTP 混合液 1.6 μ L (最終濃度各 0.2 mM)、プライマーミックス 0.2 μ L (最終濃度各 0.2 μ M)、蒸留水 14.2 μ L を混合し、テンプレートを 2 μ L 加え、94°C 30 秒、64°C 30 秒、72°C 60 秒のサイクルを 35 回繰り返して行った。プライマーは文献 7 に従った。PCR 反応終了後、Agarose L03 「TAKARA」(タカラバイオ) (2%) を用いて電気泳動を行い、増幅産物の有無を確認することで判定した。

stx 遺伝子サブタイプ PCR：KAPA2G HotStart ReadyMix with dye (2×) (KAPA BIOSYSTEMS, USA) を用い、PCR マスターミックス 7.5 μ L、プライマーミックス 0.3 μ L (最終濃度 *stx1a*: 0.2 μ M、他: 0.4 μ M)、蒸留水 5.2 μ L を混合し、95°C 2 分間ののち、95°C 15 秒、62°C 15 秒、72°C 5 秒のサイクルを 30 回繰り返し、最後に 72°C 2 分の伸長反応を行った。プライマーは文献 8 に従った。PCR 反応終

了後、キャピラリー電気泳動装置 (QIAxcel Advanced System, Qiagen, Germany) を用いて、増幅産物の有無を確認することで判定した。

結果

血清型別：供試菌株 255 株の 0 群血清型の内訳は、0157 が 181 株 (71.0%)、026 が 40 株 (15.7%)、0111 が 9 株 (3.5%)、0103 が 11 株 (4.3%)、0121 が 4 株 (1.6%)、0145 が 6 株 (2.4%)、0165 が 1 株 (0.4%)、091 が 1 株 (0.4%)、0166 が 1 株 (0.4%)、0 型別不能が 1 株 (0.4%) であった (表 1)。

表 1 0 群血清型の割合

血清型	株数 (%)
0157	181 (71.0)
026	40 (15.7)
0111	9 (3.5)
0103	11 (4.3)
0121	4 (1.6)
0145	6 (2.4)
0165	1 (0.4)
091	1 (0.4)
0166	1 (0.4)
型別不能	1 (0.4)
total	255

表 2 *stx* 遺伝子検出結果

	株数 (%)
<i>stx1</i>	56 (22.0)
<i>stx2</i>	58 (22.7)
<i>stx1 + stx2</i>	141 (55.3)
total	255

stx 遺伝子及び *stx* 遺伝子サブタイプの保有状況：*stx1* 遺伝子を単独保有していたのは 56 株 (22.0%)、*stx2* 遺伝子を単独保有していたのは 58 株 (22.7%)、*stx1* 遺伝子及び *stx2* 遺伝子の両方を保有していたのは 141 株 (55.3%) であった (表 2)。*stx* 遺伝子サブタイプの保有状況は *stx1a* 単独保有が 56 株 (22.3%)、*stx2a* 単独保有が 26 株 (10.4%)、*stx2c* 単独保有が 19 株 (7.6%)、*stx1a+stx2a* が 109 株 (43.4%)、*stx1a+stx2c* が 28 株 (11.2%)、*stx2a+stx2c* が 13 株 (5.2%) であった (表 3)。*stx* 遺伝子サブタイプの *stx1c*、*stx1d*、*stx2b*、*stx2d*、*stx2e*、*stx2f* 及び *stx2g* は検出されなかった。

各血清型における *stx* 遺伝子サブタイプ：0157 177 株中最も多く検出された *stx* 遺伝子サブタイプの組み合わせは *stx1a+stx2a* が 101 株 (57.1%) で、次いで *stx1a+stx2c* が 28 株 (15.8%) であった。また、

0157 では *stx2* 遺伝子を単独保有していた株が 44 株 (24.9%) あり、*stx2* 遺伝子サブタイプは *stx2a* 単独が 13 株 (7.3%)、*stx2c* 単独が 19 株 (10.7%)、*stx2a+stx2c* が 12 株 (6.8%) と *stx2* 遺伝子サブタイプに大きな偏りは見られなかった。026 40 株中の *stx* 遺伝子サブタイプの組み合わせは *stx1a* 単独が 36 株 (90%) で最も多く、*stx1a+stx2a* が 3 株 (7.5%)、*stx2a* 単独が 1 株 (2.5%) であった。0111 9 株の *stx* 遺伝子サブタイプは *stx1a* 単独が 4 株 (44.4%)、*stx1a+stx2a* が 5 株 (55.6%) であった。0103 (11 株) 及び 091 (1 株) の *stx* 遺伝子サブタイプはすべて *stx1a* 単独であり、0121 (4 株)、0145 (6 株)、0166 (1 株) 及び型別不能 (1 株) の *stx* 遺伝子サブタイプはすべて *stx2a* 単独であった。0165 (1 株) の *stx* 遺伝子サブタイプは、*stx2a+stx2c* であった (表 3)。

表 3 各血清型における *stx* 遺伝子サブタイプ

血清型	株数	<i>stx</i> 遺伝子サブタイプ (%)					
		<i>1a</i>	<i>2a</i>	<i>2c</i>	<i>2a + 2c</i>	<i>1a + 2a</i>	<i>1a + 2c</i>
0157	177	4 (2.3)	13 (7.3)	19 (10.7)	12 (6.8)	101 (57.1)	28 (15.8)
026	40	36 (90.0)	1 (2.5)			3 (7.5)	
0111	9	4 (44.4)				5 (55.6)	
0103	11	11 (100)					
0121	4		4 (100)				
0145	6		6 (100)				
0165	1				1 (100)		
091	1	1 (100)					
0166	1		1 (100)				
型別不能	1		1 (100)				
total	251*	56 (22.3)	26 (10.4)	19 (7.6)	13 (5.2)	109 (43.4)	28 (11.2)

*：標的遺伝子のサイズと異なるサイズに増幅産物がみられた株が 4 株 (全て 0157) あったため、計上しなかった

考 察

国内における EHEC の主要 O 血清群は 0157、026、0111、0103、0121、0145、0165 及び 091 であり、分離頻度は 0157(約 55%)、026(約 25%)、0103(約 6%) の順に多くなっている¹⁾。今回調査した株も 0166 の 1 株と型別不能株の 1 株を除いた 253 株は上記 8 血清型のどれかであった。当所に搬入された EHEC の血清型の割合は全国と比較すると 0157 が 71.0%と多く、026 が 15.7%と少なかったが、分離頻度の順は全国と同様の傾向がみられた。近年、国内外で 0157 以外の血清型が増えていることが報告されている⁹⁾。搬入数のうち 0157 の割合は 2009 年～2011 年では約 80%～約 95%であったのに対し、2012 年～2018 年では約 50%～約 75%であり、愛知県内においても 0157 以外の血清型が増えていることが示唆された。また、今後も割合が変化していく可能性も考えられる。

全国における 0157 の *stx* 遺伝子保有状況は *stx1* 遺伝子及び *stx2* 遺伝子を保有している割合が約 50%で最も多く、次いで *stx2* 遺伝子の単独保有の割合が約 40%を占める。また、026 及び 0103 の *stx* 遺伝子保有状況は *stx1* 遺伝子単独が最も多く、それぞれ 99%、100%を占めるとの報告がある¹⁾。今回調査した株では、0157 で *stx1* 遺伝子及び *stx2* 遺伝子保有株は 129 株 (72.9%)、*stx2* 遺伝子単独保有株は 44 株 (24.9%) であり、全国と比較して *stx1* 遺伝子及び *stx2* 遺伝子を保有している割合が約 20%大きかった。また、*stx* 遺伝子サブタイプは、血便患者や HUS 患者から分離されることが多い *stx2a*、*stx2a+stx2c*、*stx1a+stx2a* の合計保有率が 71.2%と高率であった。026 では *stx1* 単独保有株が 36 株 (90%) と全国より少なく、残り 10%は *stx1* 遺伝子及び *stx2* 遺伝子保有株と *stx2* 遺伝子単独保有株で構成されていた。さらに *stx* 遺伝子サブタイプについてみると、*stx1a+stx2a* が 3 株、*stx2a* が 1 株であり、重症化に関与していると考えられている *stx* 遺伝子サブタイプを保有していた。0103 に関してはすべて *stx1* 単独であり、

同様の結果がみられた。

0165 の分離数は国内における EHEC の主要血清群の中で最も少ないが、HUS 患者の血清診断では 0157 に次いで、2 番目に多い報告があり¹⁰⁾、0165 は特に重症化率が高い血清型と考えられている。当県で分離された 0165 1 株の *stx* 遺伝子サブタイプも *stx2a+stx2c* であり、重症化に関与していると考えられている *stx* 遺伝子サブタイプを保有していた。

また、今回解析を実施した株のうち、文献 7 のプライマー (*stx* 遺伝子検出プライマー) では標的サイズに増幅産物が確認されたが、文献 8 のプライマー (*stx2a* 用プライマー) では、標的サイズ (349 bp) とは異なるサイズ (1500 bp 付近) に増幅産物が確認された株が 4 株 (全て 0157) 存在した。文献 8 のプライマー (*stx2a* 用プライマー) を用いた PCR で検出された増幅産物は PCR の非特異反応の可能性または *stx* 遺伝子上に挿入配列 (IS) が存在している可能性が考えられる。実際これまでに *stx* 遺伝子上に IS が認められた報告があり、IS により Stx の産生性に影響を及ぼすことが報告されている^{11,12)}。今回 IS が疑われた 4 株について、Stx は産生されていた。しかし、毒性については検討していないため、今後は実際に IS が存在しているのか及び毒性についても精査する必要があると考えられる。

今回、愛知県において分離された EHEC における血清型や *stx* 遺伝子サブタイプ保有状況調査では、全国と同様な傾向がみられつつも、愛知県における特徴も明らかとなった。*stx* 遺伝子サブタイプは患者の重症度や予後の推察の一助になる可能性があることから、今後も継続的に調査していくことが重要である。また、併せて病原因子及び腸管付着因子の調査を行っていくことで、さらなる感染症予防対策に役立てていきたい。

参考文献

- 1) 国立感染症研究所感染症情報センター：腸管出血性大腸菌感染症 病原微生物検

- 出情報 39(5):71-72, 2018.
- 2) 愛知県感染症発生動向調査事業報告書第36報
 - 3) Boerlin P, McEwen SA, Boerlin-Petzold F, Wilson JB, Johnson RP, Gyles CL : Associations between virulence factors of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and disease in humans. *Journal Clinical Microbiology* 37:497-503, 1999.
 - 4) Ethelberg S, Olsen KE, Scheutz F, Jensen C, Schiellerup P, Enberg J, Petersen AM, Olesen B, Gerner-Smidt P, Mølbak K : Virulence factors for hemolytic uremic syndrome. Denmark. *Emerging Infectious Disease* 10:842-847, 2004.
 - 5) Eklund M, Leino K, Siitonen A : Clinical *Escherichia coli* strains carrying *stx* genes: *stx* variants and *stx* positive virulence profiles. *Journal Clinical Microbiology* 40:4585-4593, 2002.
 - 6) Alexander W. Friedrich, Martina Bielaszewska, Wen-Lan Zhang, Matthias Pulz, Thorsten Kuczius, Andrea Ammon, Helge Karch : *Escherichia coli* Harboring Shiga Toxin 2 Gene Variants: Frequency and Association with Clinical Symptoms. *The Journal of Infectious Diseases* 185:74-84, 2002.
 - 7) Cebula TA, Payne WL, Feng P : Simultaneous identification of strains of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and their Shiga-like toxin type by mismatch amplification mutation assay-multiplex PCR. *Journal Clinical Microbiology* 33:248-250, 1995.
 - 8) Scheutz F, Teel LD, Beutin L, et al. : Multicenter evaluation of a sequence-based protocol for subtyping Shiga toxins and standardizing Stx nomenclature. *Journal Clinical Microbiology* 50: 2951-2963, 2012.
 - 9) Kristine E. Johnson, Cheleste M. Thorpe, Cynthia L. Sears : The emerging clinical importance of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Clinical Infectious Diseases* 43:1587-1595, 2006.
 - 10) 国立感染症研究所感染症情報センター : 血清診断による腸管出血性大腸菌感染による HUS 症例の確定診断例 病原微生物検出情報 39(5):83-84, 2018.
 - 11) Masahiro Suzuki, Fumio Kondo, Yuko Ito, Masakado Matsumoto, Mami Hata, Hisao Oka, Masao Takahashi, Kenji Sakae : Identification of a Shiga-toxin type I variant containing an IS1203-like element, from Shiga-toxin producing *Escherichia coli* O157:H7. *FEMS Microbiolgy Letters* 234:63-67, 2004.
 - 12) Yukiko Asano, Tatsuya Karasudani, Hiroshi Tanaka, Junko Matsumoto, Masako Okada, Kiyoshi Nakamura, Hirokazu Kondo, Hiroto Shinomiya : Characterization of the *Escherichia coli* O157:H7 outbreak strain whose Shiga toxin 2 gene is inactivated by IS1203v insertion. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 66:201-206, 2013.

Characterization of *shiga toxin* subtypes in enterohemorrhagic *Escherichia coli* isolated in Aichi Prefecture from 2009 to 2018

Yuta Takahashi, Kazuhiro Yamada, Miyako Aoki, Ikumi Nakane, Shinsuke Yotsumoto,
Hirokazu Tsuduki, Masakado Matsumoto

About 4,000 cases of enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) infection are reported annually in Japan. EHEC infection is considered to be a problem, because it may cause hemolytic uremic syndrome (HUS) and encephalopathy, which may lead to death. In recent years, it has been reported that the *shiga toxin* (*stx*) subtype possessed by EHEC is related to the severity. In this study, we investigate the serotypes and *stx* subtypes of EHEC isolates in Aichi Prefecture from 2009 to 2018. A total of 255 EHEC isolates were examined. The most predominant serotypes were O157 (181 isolates, 71.0 %), followed by O26 (40 isolates, 15.7 %). As for *stx* and the subtypes, 56 isolates (22.0 %) carried only *stx1*, and the all was *stx1a*. *stx2a* and *stx2c* were only detected among subtypes of *stx2*. The most frequently detected combination of *stx* subtypes in O157 was *stx1a* + *stx2a* (101 isolates, 57.1 %), followed by *stx1a* + *stx2c* (28 isolates, 15.8 %). In addition, the total rate of *stx2a*, *stx2a* + *stx2c* and *stx1a* + *stx2a*, which are often separated from severe patients, was high (71.2 %). In order to infer the severity and prognosis of the patients, it is important to continue to investigate the distribution of the serotypes and *stx* subtypes of EHEC isolates.

Key words : Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC), Shiga toxin, *stx* subtype

調 査 研 究

清涼飲料水中の重金属一斉分析における前処理法の検討

戸塚昌子、梅村優子、青山文生、渡邊美奈恵、小池恭子、棚橋高志

要 旨

清涼飲料水中のヒ素、鉛及びスズの誘導結合プラズマ質量分析計（ICP-MS）によるスクリーニング一斉分析において、スズの回収率向上を目的として、ヒートブロック型酸分解装置を用いた前処理法について検討した。試料を硝酸酸性とし、精密な温度管理により湿式分解することで、塩酸を用いることなくスズの高い回収率を得ることができた。また、分析法の妥当性評価ガイドラインに従って性能評価を行ったところ、3 元素において、真度 97.1～104.5%、併行精度 0.6～1.5%、室内精度 0.7～1.8%と良好な結果が得られ、妥当性を確認することができた。本法を用いることで、迅速かつ正確な検査結果の還元を図ることが可能となると考えられるため、食の安全・安心に貢献するものと期待される。

キーワード：清涼飲料水、ヒートブロック、スズ、ICP-MS、一斉分析、塩酸を用いない

はじめに

清涼飲料水は食品衛生法第 11 条に基づく「食品、添加物等の規格基準」（昭和 34 年厚生省告示第 370 号。以下「告示」という。）により成分規格が定められている¹⁾。平成 26 年 12 月 22 日の一部改正により、ミネラルウォーター類以外の清涼飲料水について、ヒ素（As）及び鉛（Pb）は検出されてはならないと定められ、また、スズ（Sn）は金属製容器包装入りのものに限定して適用され、その含有量は 150.0 ppm 以下でなければならないと定められた²⁾。当所では、これら 3 元素について、ICP-MS によるスクリーニング一斉分析を行っている。その際、試料の前処理法としてホットプレートを用いた湿式分解（以下「ホットプレート法」という。）を行っているが、スズの回収率がやや低いことが問題となっている。この原因として、ヒ素や鉛など他の重金属とは異なり、スズは加熱分解過程において高温状

態となると硝酸と反応し、メタスズ酸と呼ばれる難溶解性の白色沈殿物を生成するため³⁾、正確なスズ含有量の測定が困難なことがあげられる。その解決法として、前処理の最終工程で塩酸を添加し、生成されたメタスズ酸を再度スズに変換する方法を既報⁴⁾により報告した。しかし、塩酸を用いることで塩化物イオンが発生し、ICP-MS による測定の際にイオン干渉妨害が起こり、繰り返し測定の際のばらつきが大きくなるため、塩酸の使用には注意が必要であった⁴⁾。今回、ヒートブロック型酸分解装置を用い、加熱分解における温度管理を徹底することにより塩酸を使用しない前処理法（以下「ヒートブロック法」という。）を検討した。さらに、ヒートブロック法による前処理後、ICP-MS による一斉分析法についても検討し、その妥当性評価を実施したので、合わせて報告する。

方 法

1. 試料

市販の金属製容器包装入り緑茶飲料を用いた。

2. 試薬

硝酸は、関東化学(株)製のEL(電子工業用)を用いた。

標準液は、関東化学(株)製のAs標準液、Pb標準液及びSn標準液(ICP分析用、全て1,000 mg/L)を用いた。

内部標準液は、関東化学(株)製のイットリウム(Y)標準液(原子吸光分析用、1,000 mg/L)を用いた。

水は、AUTO PURE WT100(ヤマト科学(株))により精製した超純水を用いた。

3. 装置及び測定条件

ヒートブロック型酸分解装置(以下、分解装置)は、DigiPREP Jr.(ジーエルサイエンス(株))を用いた。

ICP-MSは、Agilent 7800(Agilent Technologies, USA)を用い、表1の条件で測定した。

4. 試験溶液の調製

試料1 gをポリプロピレン(PP)製分解容器に採取し、硝酸5 mLを加え、PP製時計皿を上置きした後、あらかじめ初期温度を65℃に設定した分解装置にセットした。そのまま65℃で5分間加熱後、30分間かけて100℃まで昇温させた。その後100℃でさらに15分間加熱分解した。放冷後、0.1 mol/L硝酸で50 mLに定容し試験溶液とした。なお、スズを150 ppm添加した試料については、この溶液を0.1 mol/L硝酸でさらに30倍希釈して試験溶液とした。

5. 分析法の妥当性評価

食品中の金属に関する試験法の妥当性評価ガイドライン(以下「ガイドライン」という。)^{5),6)}に従って、分析者1名が1日2回、5日間の枝分かかれ試験を実施した。添加濃度については、ヒ素(As₂O₃として)及び鉛は告示で示された試験法の検出下限値である0.2 ppm及び0.4 ppm、スズは平成26年12月22日付厚生労働省通知による試験法⁷⁾の定量下限値である5 ppm及び基準値である150 ppmの2濃度とした。ガイドラインの目標値を表2に示した。

表1 ICP-MS測定条件

高周波出力	1,550 W
プラズマガス (Ar)	15 L/min
キャリアガス (Ar)	1.03 L/min
反応ガス (He)	4.2 mL/min
測定モード	Heモード
サンプリング位置	10.0 mm
測定法	内部標準法

元素	質量数	内部標準	積分時間	測定回数
As	75	Y	3.0	3
Sn	118	Y	0.1	3
Pb	208	Y	3.0	3

表2 妥当性評価試験の添加濃度及び目標値

元素	添加濃度 (ppm)	真度 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)
As	0.2	80~110	10 >	15 >
Pb	0.4	80~110	10 >	15 >
Sn	5.0	80~110	10 >	15 >
	150.0	90~110	10 >	15 >

結果及び考察

1. ヒートブロック法における加熱分解条件の検討

(1) 試料量

試料量を1、2及び5 gとし、添加濃度をヒ素0.2 ppm、鉛0.4 ppm及びスズ5 ppmとして回収試験を行い、得られた結果を表3に示した。いずれの場合も回収率は妥当性評価の目標値である80~110%の範囲内であったが、試料量過多による加熱分解時の突沸や漏れ等、また煩雑な希釈操作を考慮し、試料量は1 gとした。なお、今回検討に用いた緑茶飲料は、均質な混合が可能であったが、固形物を含むなどの均質化が困難な場合は、別途検討を行うことが必要と考えられた⁸⁾。

(2) 分解温度及び時間

分解装置の多段階昇温プログラムを用い、昇温後の分解時間(15分、30分及び60分)について比較検討した。試料量を1 gとし、(1)と同様の添加濃度で回収試験を行い、得

られた結果を表4に示した。回収率は3元素において94~101%の範囲内となり、全ての条件において良好な結果が得られたが、前処理工程の迅速性を考慮し分解時間は15分とした。

また分解温度については、試料により急激な加温による突沸や漏れが発生することが想定されることから⁹⁾、あらかじめ65℃に加温した分解装置に、試料を入れた分解容器をセットし、そのまま5分間加熱後、30分かけて100℃まで昇温した。分解容器の耐熱温度(110℃)を考慮し、最高温度は100℃とした。

2. スズの添加回収試験におけるヒートブロック法とホットプレート法との比較

ヒートブロック法の加熱分解条件を用い、2法によるスズの回収率を比較した。すなわち、試料1gにスズが150ppmとなるように添加し、5mLの硝酸を加え、各加熱方法により100℃、15分間の加熱分解後、ICP-MSによる測定を行った。ただし、分解容器はヒートブロック法においては専用のPP製分解容器、ホットプレート法ではガラス製平底ソックスレーフラスコを用いた。その結果、ヒートブロック法を用いた場合では101.8%、ホットプレート法では79.0%の回収率が得られた。ヒートブロック法の利点として、分解装置により精密な温度管理が可能で、底面だけでなく、側面も含め

て容器全体を均一に加熱できることがあげられる。このため、比較的低い温度である100℃での加熱で十分な分解が可能となり、スズのメタスズ酸への反応も極力抑えられた。さらに、メタスズ酸の生成が抑制されたため、それを分解するための塩酸も不要となり、結果的にICP-MS測定時のイオン干渉妨害の影響も抑えられ、高い回収率が得られたと考えられた。一方、ホットプレート法は通常分解温度(約250℃)よりも低い温度でかつ短時間での加熱となったこと、また塩酸を加えなかったためメタスズ酸の生成を誘導することとなったことにより⁴⁾、回収率が低くなったと考えられた。

また、ホットプレート法は、通常継続的に加温調節しながら適宜硝酸を添加し、徐々に約250℃まで温度を上げるなど操作が煩雑で分解終了まで数日を要する。さらに、試料成分、加熱温度、加熱時間及び分析者の技量など多種の要因により回収率にばらつきがみられる⁴⁾。加えて、分解容器がガラス製で再利用するため、高濃度試料に使用した容器からの汚染が懸念される。一方、ヒートブロック法は、半日程度で処理可能で迅速性に優れ、多検体の処理に適した方法と考えられた。加えて、装置専用のPP製の分解容器を使用し、再利用しないため、容器の洗浄不足による汚染等のリスクがなく、検査の信頼性及び精度の向上が可能と考えられた。

表3 各試料量における添加回収試験結果

試料量	As		Pb		Sn	
	回収率(%)	CV(%)	回収率(%)	CV(%)	回収率(%)	CV(%)
1 g	97.6	0.3	100.4	0.8	97.1	4.6
2 g	103.3	0.6	99.3	0.4	94.5	1.4
5 g	105.0	0.6	105.5	2.6	95.7	2.3

表4 各分解時間における添加回収試験結果

分解時間	As		Pb		Sn	
	回収率(%)	CV(%)	回収率(%)	CV(%)	回収率(%)	CV(%)
15分	97.6	0.3	100.4	0.8	97.1	4.6
30分	94.9	1.4	100.5	0.9	95.7	6.2
60分	94.9	2.8	101.0	1.9	96.2	6.2

3. 妥当性評価試験

ヒートブロック法を用いて妥当性評価試験を行った。その結果を表5に示した。すべての元素及び添加濃度において、目標値(表2)を満たすことができた。

以上のことから、従来のホットプレート法より、ヒートブロック法の方が短時間で高精度な分析が可能であると考えられた。

表5 妥当性評価試験結果

元素	添加濃度 (ppm)	真度 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)
As	0.2	97.1	1.4	1.6
Pb	0.4	104.5	1.5	1.8
Sn	5.0	104.3	1.2	1.3
	150.0	101.4	0.6	0.7

まとめ

清涼飲料水中の重金属分析における前処理法として、ヒートブロック型酸分解装置を用いた方法を検討した。今回の検討においては、分解装置による精密な温度管理を行うことで、塩酸を用いることなくスズの良好な回収率を得ることができ、分析法としての妥当性も確認できた。また、分解装置を用いることで、半日程度の前処理工程でICP-MS用試験溶液を調製することが可能となり、加熱分解に要する時間を大幅に削減することができた。

以上により、ヒートブロック法は清涼飲料水中の重金属一斉分析における前処理法として非常に有用であると考えられる。本法を用いることにより、迅速かつ正確に結果の還元を図ることができるため、県民に対し、食の安全・安心に貢献できると考える。今後本法をさらに発展させ、多岐にわたるマトリックスが含まれた清涼飲料水についても、ヒートブロック法を適用できるよう検討する予定である。

なお、本論文の要旨は第54回全国衛生化学協議会年会(2017年11月)において発表した。

参考文献

- 1) 厚生省告示“食品、添加物等の規格基準” 昭和34年12月28日付第370号
- 2) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知 “乳及び乳製品の成分規格等に関する省令及び食品、添加物等の規格基準の一部改正について” 平成26年12月22日付食安発第1222第1号
- 3) 社団法人日本分析化学会関東支部編: ICP発光分析・ICP質量分析の基礎と実際 上本道久監修. 39-45, 2008, オーム社、東京.
- 4) 大島晴美, 椛島由佳, 上野英二, 松本浩: 清涼飲料水中のヒ素、鉛、カドミウムおよびスズのICP-MSによる一斉分析について. 愛知県衛生研究所報 56:25-30, 2006.
- 5) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知 “食品中の有害物質等に関する分析法の妥当性ガイドラインについて” 平成26年12月22日付食安発1222第8号
- 6) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知 “食品中の金属に関する試験法の妥当性評価ガイドラインについて” 平成20年9月26日付食安発第0926001号
- 7) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知 “清涼飲料水等の規格基準の一部改正に係る試験法について” 平成26年12月22日付食安発第1222第4号
- 8) 片岡洋平, 渡邊敬浩, 林智子, 手島玲子, 松田りえ子: 清涼飲料水中の鉛、総ヒ素、カドミウムの一斉定量を目的としたICP-OES法、ICP-MS法、電気加熱式原子吸光法の開発. 食品衛生学雑誌 56(3): 88-95, 2015.
- 9) 稲本勇: 鉄鋼の分析. ぶんせき 7:357-363, 2005.

Development of Pretreatment Method for Simultaneous Analysis of Heavy Metals in Soft Drinks

Masako Totsuka, Yuko Umemura, Fumio Aoyama, Minae Watanabe,
Yasuko Koike, Takashi Tanahashi

For the purpose of increasing the recovery of Sn from soft drinks, we used the heat block for heating samples. The result showed that our method can obtain a better recovery of Sn by ICP-MS, using HNO₃ to make the sample acidic instead of HCl, with the temperature of the sample finely controlled. Additionally, we evaluated their performance per governmental guidelines. Therefore, we obtained acceptable results about measurement trueness (97.1-104.5%), repeatability (0.6-1.5%), intermediate precision (0.7-1.8%) in the three metals.

In conclusion, this method of not using HCl is useful to contribute further to the safety and security of food because of its ability to obtain accurate and speedy analyses.

Key words : soft drinks, heat block, Sn, ICP-MS, simultaneous analysis, no-HCl-use

調 査 研 究

ICP-MS 多元素一斉分析による愛知県内の水道原水の地域特性調査

長谷川真照、尾内彩乃、渡邊美奈恵、棚橋高志

要 旨

愛知県内を尾張西部、尾張東部、西三河及び東三河と大きく4つの地域に分け、水道原水に用いられている地下水の水質成分について、誘導結合プラズマ質量分析計(ICP-MS)を用いて35元素を定量し、地域特性の把握を試みた。その結果、各地域の水道原水中の元素に地域差が確認された。また、採水地点の元素濃度に対し主成分分析(PCA)を主軸とした多変量解析を行ったところ、元素濃度の分布により愛知県内の水道原水は尾張西部、西三河の一部及びそれ以外の地域の大きく3つに分けられることが明らかとなった。これらことから、元素による水道原水の地域特性の把握が可能となることが示唆された。引き続き、採水地点を追加し、詳細な地域特性及び各地域の原水と給水栓水との関係を把握することにより、危機管理事例発生時の迅速な対応に役立てたいと考えている。

キーワード：ICP-MS、多元素一斉分析、多変量解析、水道原水、地下水

序 文

愛知県内の水道普及率は、平成29年3月の時点で99.9%であり、700万人を超える県民が水道を利用している¹⁾。水道水質は水道法により基準が定められ、水道事業者等には、51項目の水質基準を満たす水の供給が求められている²⁾。また、毒性評価値が暫定的であったり検出レベルは高くないものの、水道水質管理上注意喚起すべきものとして、26項目の水質管理目標設定項目が定められている³⁾。しかし、これら水質基準項目及び水質管理目標設定項目以外の成分に関しては、存在量の実態把握はできていない。

毎日の生活に欠かせない水道水は、県民の健康に深い関わりをもっている。当所では県内の水道水中の元素濃度を地域別に把握することにより、各地域住民への健康被害を未然に防ぐことが可能となると考えており、水道水質の地域特性に関する実

態調査を行っている。本研究では、この実態調査の一環として県内の主な水道原水となっている地下水に含まれる元素について、ICP-MSを用いて一斉分析し、より詳細な水質データを取得した。また、そのデータに対して多変量解析等を行い、水道原水の地域特性の把握を試みた。

方 法

1. 試料

2014～2019年度の6年間に採水した愛知県内の水道原水となっている地下水を用いた。

2. 試薬及び標準物質

1) 試薬

硝酸は関東化学株式会社製電子工業用を用いた。水は超純水製造装置(BARNSTEAD GenPure UV-TOC xCAD plus, Thermo Fisher Scientific, USA)により製造した超純水を用いた。

2) 標準原液

リチウム (Li)、ホウ素 (B)、ナトリウム (Na)、マグネシウム (Mg)、アルミニウム (Al)、ケイ素 (Si)、リン (P)、カリウム (K)、カルシウム (Ca)、チタン (Ti)、バナジウム (V)、クロム (Cr)、マンガン (Mn)、鉄 (Fe)、コバルト (Co)、ニッケル (Ni)、銅 (Cu)、亜鉛 (Zn)、ガリウム (Ga)、ゲルマニウム (Ge)、ヒ素 (As)、セレン (Se)、ルビジウム (Rb)、ストロンチウム (Sr)、ジルコニウム (Zr)、モリブデン (Mo)、銀 (Ag)、カドミウム (Cd)、スズ (Sn)、アンチモン (Sb)、セシウム (Cs)、バリウム (Ba)、タンゲステン (W)、鉛 (Pb)、ウラン (U) をそれぞれ 10 mg/L 含む 35 元素混合標準液 (XSTC-622 ICP 用、SPEX、USA) を用いた。ベリリウム (Be)、イットリウム (Y)、インジウム (In)、タリウム (Tl) は関東化学株式会社製 1000 mg/L 標準液を用いた。

3) 混合標準溶液

2) の 35 元素混合標準液 (10 mg/L) を分取し、100、40、20、8、4、1、0.5、0.2 $\mu\text{g/L}$ となるように硝酸 (1 \rightarrow 100) 溶液で希釈して調製した。

4) 混合内部標準溶液

Be、Y、In、Tl の各標準原液を分取し、それぞれ 300、50、50、50 $\mu\text{g/L}$ となるように硝酸 (1 \rightarrow 100) 溶液で希釈し、混合内部標準溶液とした。

3. 装置及び測定条件

ICP-MS (Agilent 7800、Agilent technologies、USA) を用いた。測定条件は、プラズマガス: アルゴン、リアクションガス: 水素、コリジョンガス: ヘリウム、プラズマモード: 低マトリックス、RF 出力: 1550 W、プラズマガス流量: 15.01 L/min、

ネブライザーガス流量: 1.03 L/min、 H_2 ガス流量: 6 mL/min、He ガス流量: 4.3 mL/min、測定質量数: Li (7)、B (11)、Na (23)、Mg (24)、Al (27)、Si (28)、P (31)、K (39)、Ca (44)、Ti (47)、V (51)、Cr (52)、Mn (55)、Fe (56)、Co (59)、Ni (60)、Cu (63)、Zn (66)、Ga (69)、Ge (72)、As (75)、Se (77)、Rb (85)、Sr (88)、Zr (90)、Mo (95)、Ag (107)、Cd (111)、Sn (118)、Sb (121)、Cs (133)、Ba (137)、W (182)、Pb (208)、U (238)、Be (9)、Y (89)、In (115)、Tl (205)。

4. 試験溶液の調製

試料 100 mL をテフロンビーカーに採り、硝酸 1 mL を加え、赤外線ランプで沸騰しない程度に加熱し、液量が 90 mL 以下になるまで濃縮した。これを室温程度まで放冷し、ポリプロピレン製のメスフラスコ 100 mL に移し、水で 100 mL に定容した。また、水 100 mL を試料と同様に処理し、空試験とした。

5. ICP-MS 測定

測定は ICP-MS により内部標準法を用いて行った。各測定対象元素に対する内部標準物質は、測定対象元素と質量数の近いものを選定した。

6. 調査方法

愛知県内の水道原水となっている地下水について、35 種類の元素を 2014~2019 年度の 6 年間測定し、55 地点のデータを取得した (表 1)。この採水地点を、木曾川水系を主な原水としている尾張西部 (13 地点) 及び尾張東部 (15 地点)、矢作川水系を主な原水とする西三河 (14 地点)、豊川水系を主な原水とする東三河 (13 地点) と大きく 4 つの地域に分け、各地域における元素の検出頻度を比較した。検出頻度に

表 1 採水地点

地点数	地点番号	地域
13	1~13	尾張西部 (一宮市、愛西市、津島市、北名古屋市、稲沢市、清須市)
15	14~28	尾張東部 (春日井市、犬山市、江南市、小牧市、大口町、岩倉市、長久手市、瀬戸市)
14	29~42	西三河 (刈谷市、岡崎市、安城市、西尾市、豊田市、知立市)
13	43~55	東三河 (豊橋市、豊川市、田原市、新城市)

については、各元素がそれぞれの地域の採水地点の中で何地点検出されたかを割合で示した。尚、名古屋市及び地下水を原水としていない知多地域は対象外とした。さらに、各採水地点の元素の検出濃度に対し、PCA を主軸とした多変量解析を行うことで、4つの地域の地域特性を調査した。

7. 多変量解析

多変量解析は Sartorius Stedim Biotech (Germany) の多変量解析ソフト SIMCA を用いて行った。各採水地点に対して Li、B、Na、Mg、Al、Si、P、K、Ca、Ti、V、Cr、Mn、Fe、Co、Ni、Cu、Zn、Ga、Ge、As、Se、Rb、Sr、Zr、Mo、Ag、Cd、Sn、Sb、Cs、Ba、W、Pb、U の合計 35 項目を多変量解析の対象項目とした。

結果及び考察

1. 地域における元素の検出頻度の比較

尾張西部（13 地点）、尾張東部（15 地点）、西三河（14 地点）及び東三河（13 地点）における地域毎の元素の検出頻度を確認したところ、Si、Sr、Ba は全ての地点で検出され、Se、Ag、Zr、Sb、Cs はどの地点からも検出されなかった（図 1）。従って、これらの元素は検出頻度において地域差がないことが明らかとなった。また、各地域において検出頻度による地域差を確認したところ、過半数以上の地点で検出された元素に注目することで地域差が確認された（表 2）。その結果、尾張西部では P、尾張東部では Cu、東三河では Cr について特に検出頻度が高い傾向が認められた。し

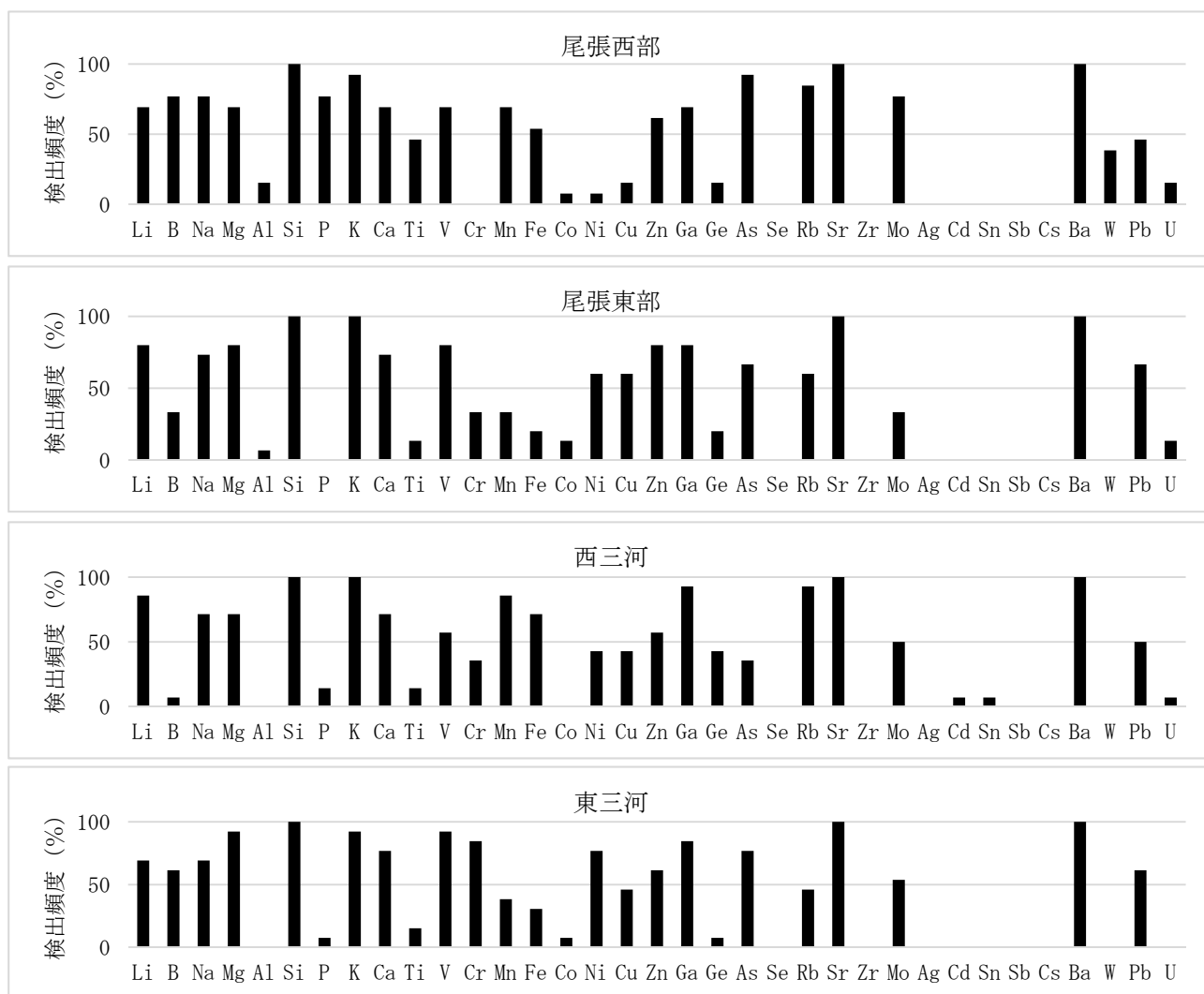


図 1 4 地域における元素の検出頻度

表 2 地域別の検出頻度 5 割以上の元素

地域	検出頻度5割以上の元素																					
尾張西部	P	-	-	Mn	Fe	B	-	Rb	As	Mo	-	Li	Na	Mg	Si	K	Ca	V	Zn	Ga	Sr	Ba
尾張東部	-	Cu	-	-	-	-	Ni	Rb	As	-	Pb	Li	Na	Mg	Si	K	Ca	V	Zn	Ga	Sr	Ba
西三河	-	-	-	Mn	Fe	-	-	Rb	-	Mo	Pb	Li	Na	Mg	Si	K	Ca	V	Zn	Ga	Sr	Ba
東三河	-	-	Cr	-	-	B	Ni	-	As	Mo	Pb	Li	Na	Mg	Si	K	Ca	V	Zn	Ga	Sr	Ba

- : 検出頻度5割未満

かし、西三河では、特異的に検出頻度の高い元素は確認されなかった。さらに、4つの地域のうち2つの地域でのみ検出頻度の高い元素として Mn、Fe（尾張西部、西三河）、B（尾張西部、東三河）、Ni（尾張東部、東三河）が確認された。逆に、1地域のみ検出頻度が過半数に満たなかった元素は、Pb（尾張西部）、Mo（尾張東部）、As（西三河）、Rb（東三河）であることが明らかとなった。

これらの結果により、4つの地域には検出頻度の高い元素の種類に違いが見られ、地域的な特徴があることが示唆された。

2. 採水地点の主成分分析による地域特性の評価

上述の検出頻度の結果より、原水中の元素分布に地域特性があることが示唆された。そこで、より詳細な解析を行うため、多変量解析ソフト（SIMCA）を用いて採水地点と元素濃度の関係を解析した。方法としては、多検体の試料構造の分布を観察し、それを特徴づける変数を抽出する PCA を行い、データの分布を確認した。PCAからは、散布図とローディングプロット（変数の負荷図）を得ることができた。散布図は多次元を縮約した2次元に試料1点を表し、各地の元素の検出傾向を示している。また、ローディングプロットは散布図に対応した各元素の分布状況を示している。解析の結果、図2のPCA散布図が得られた。なお、散布図中のプロット番号は表1に示す地点番号を表している。

尾張西部及び西三河においては、一部特徴的な分布が確認された。しかし、尾張東部の地点28が散布図中で大きく外れてお

り、散布図の分布が地点28の値に影響されている可能性が考えられたため、地点28を除外し再解析を行った。その結果、図3のPCA散布図となり、例外はあるが尾張西部に特徴的な分布が確認された。また、西三河においても一部の地点（地点29、30、34、41、42）において特徴的な分布が見られた。それ以外の地点に関しては、地域毎の特徴的な分布は確認されなかったが、一つの大きな集団を形成していることが示唆された。また、各地点における元素のローディングプロット（図4）を基に、各元素について全地点の検出濃度の合計に対する地点毎の濃度割合を確認したところ、図5に示すような地域特性の高い傾向にある元素が確認された。その結果、As、Mo、P、W、Tiは尾張西部で多く検出され、同方向に分布しているNa、Al、V、Bも尾張西部に多い傾向があった（図5）。一方、Fe、Rb、Ga、Baは西三河で多く検出される傾向にあった（図5）。これらの元素分布は散布図（図2）で示された尾張西部及び西三河の分布と相関が見られた。なお、他の地域と異なる分布が確認された地点28は、西三河と類似した分布傾向を示したが、Rb、Ga、Baが西三河よりもやや高めに検出される等、元素の分布パターンがやや異なっていた。しかし、他の地点と同様に基準値を超える値は確認されず、各元素濃度は微量であった。なお、これら各地点の元素の分布傾向は、原水とする河川の影響とともに、水源の位置・深さ・地形及び地質的要素が関与していると考えられたため、各地点の水源及び地質情報も視野に入れて解析することが必要であると考えられた。

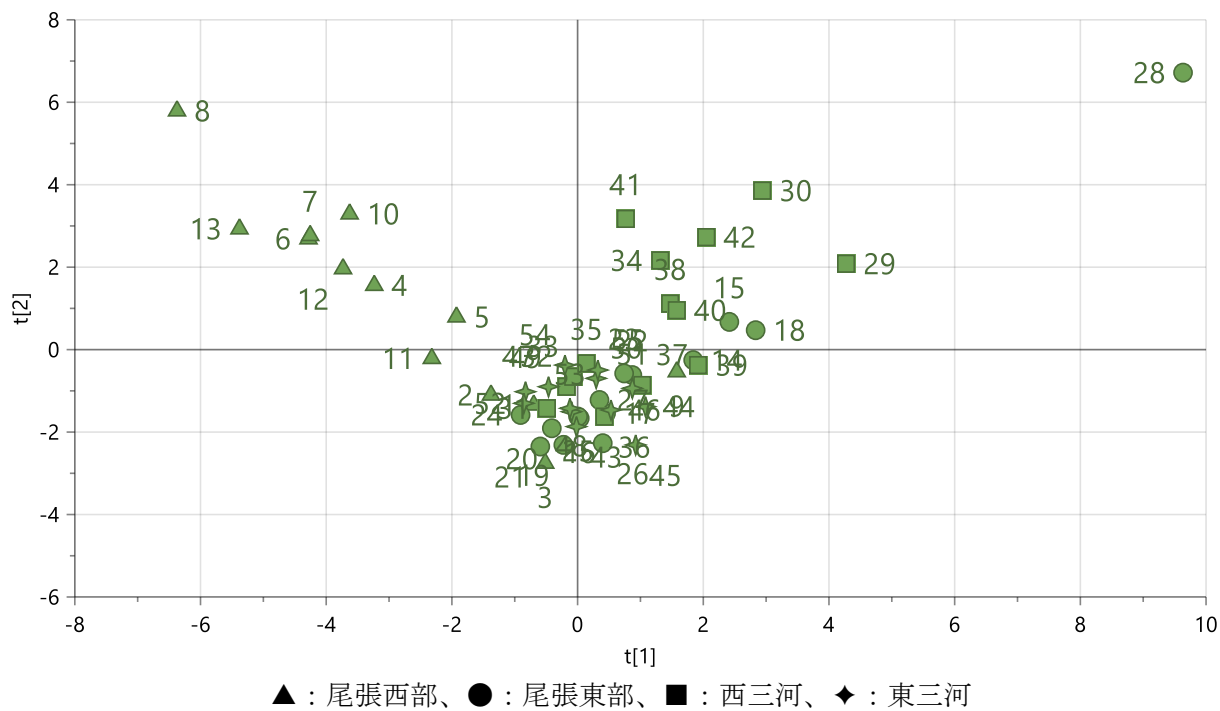


図 2 採水地点の主成分分析の散布図

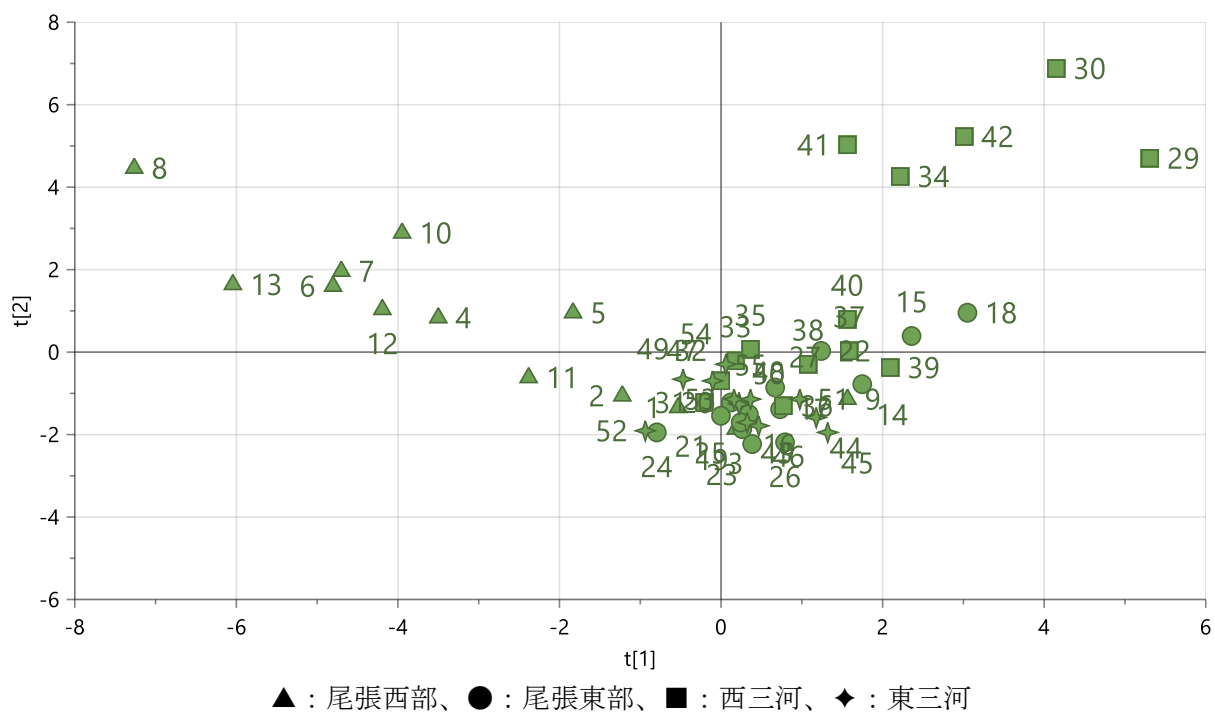


図 3 地点 28 を除いた採水地点の主成分分析の散布図

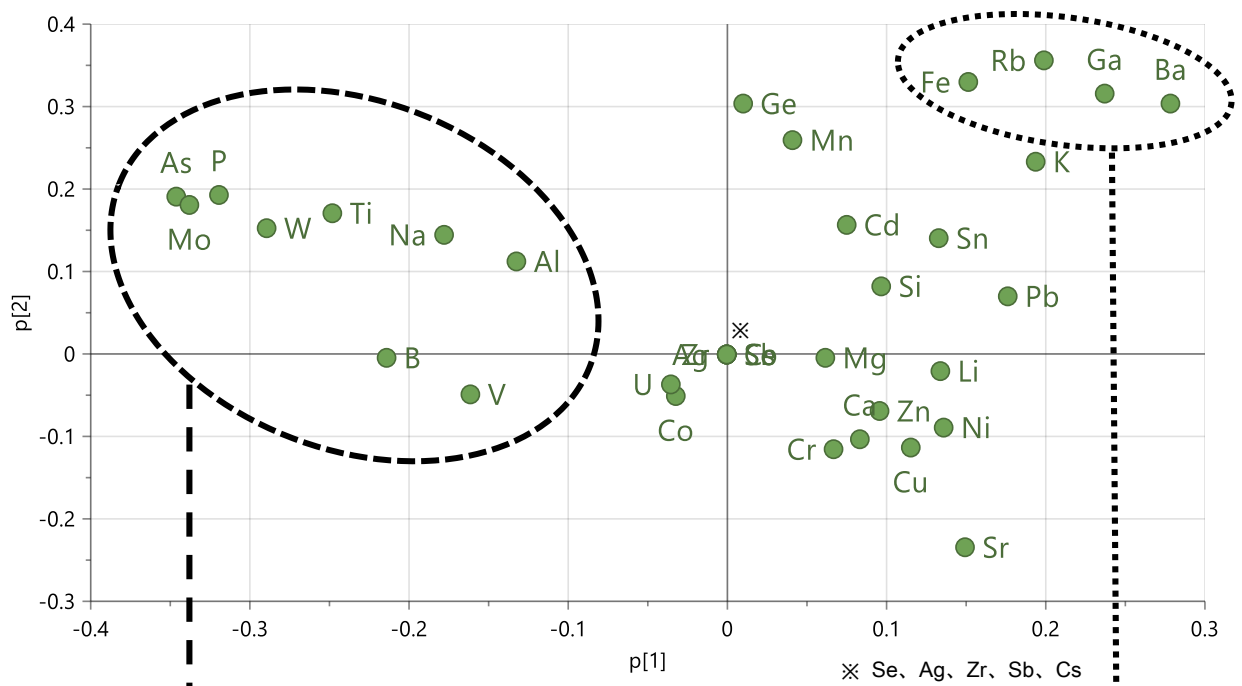


図4 採水地点における元素のローディングプロット

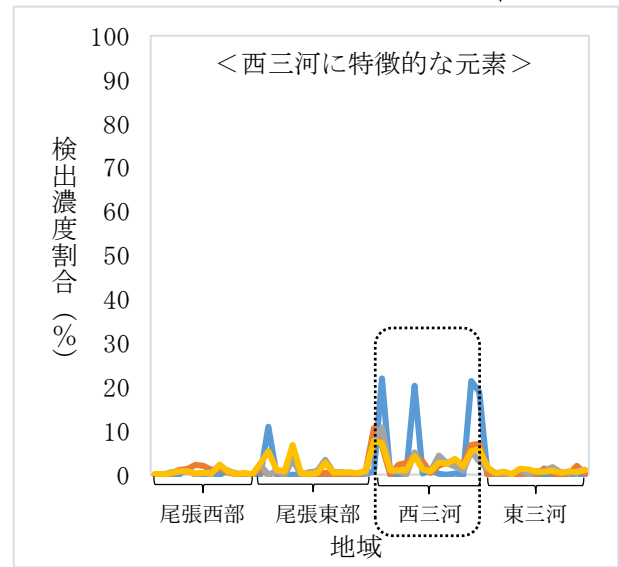
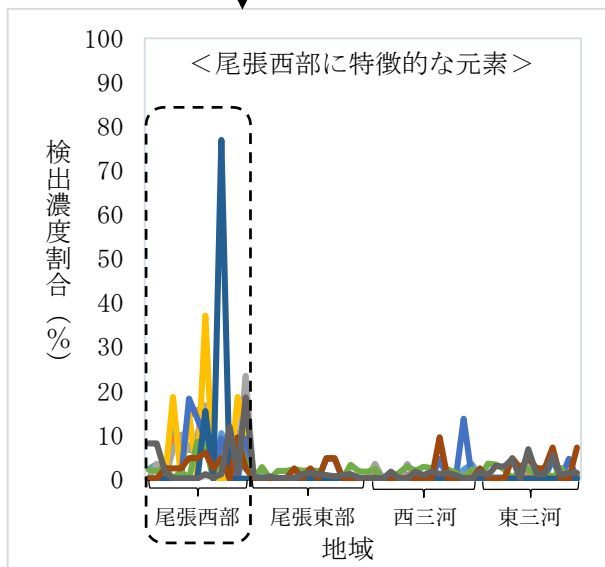


図5 地域特異性の高い傾向にある元素

まとめ

愛知県内を4つの地域に分け、55地点における水道原水の地域特性調査を行った。各地点の元素の検出頻度においては、検出頻度の高い元素に地域差が見られ、地域特性があることが示唆された。

また、採水地点の元素濃度に対し多変量解析を行ったところ、元素濃度の分布により愛知県内の水道原水は尾張西部、西三河の一部及びそれ以外の地域の大きく3つに分けられることが明らかとなった。さらに、一部地域においてはどの地域とも異なる分布を示すことが確認された。

本研究により、県内の水道原水中の元素濃度の基礎となる資材を得た。これら平常時の水質データを把握することは、水道原水となる地下水の元素濃度の異常の有無について把握でき、危機管理事例発生時に有益である。また、現時点では未解明である健康等への微量元素の相互作用や他の物質相互の影響等、今後新たな作用が明確になった場合の迅速な対応にも役立つことと期待される。今後、採水地点毎の水源の情報や地質を加味し、地域特性の原因解

明を図りたいと考えている。また、採水地点の追加及びそれに伴う各地域の原水と給水栓水の関係性解明を行うことで、より詳細な地域の元素分布を明らかにしていく必要があると考えている。

なお、今回測定した全ての地点において検出された元素濃度は、水道法に規定されている水質基準値を大きく下回っており、基準項目以外の元素においても極微量にしか検出されなかった。このことから、平常時の水道水の飲用による健康被害の可能性は低いことが示された。

文献

- 1) <https://www.pref.aichi.jp/soshiki/taoukei/0000079643.html> : 愛知県県民文化局県民生活部統計課「平成30年度刊愛知県統計年鑑」
- 2) 水質基準に関する省令：平成15年5月30日付け厚生労働省令第101号
- 3) 水質基準に関する省令の制定及び水道法施行規則の一部改正等について：平成15年10月10日健発第1010004号 厚生労働省通知

Study on the regional characteristics of raw water in Aichi Prefecture using simultaneous analysis of multi-elements with inductively coupled plasma mass spectrometry

Masateru Hasegawa, Ayano Onouchi, Minae Watanabe, Takashi Tanahashi

ICP-MS is effective tool for the simultaneous analysis of multi-elements in water. In this article, we attempted to comprehend the regional characteristics of four areas (West-Owari, East-Owari, West-Mikawa and East-Mikawa) by the quantification of the 35 elements in groundwaters used as raw water. Through our experimental simultaneous multi-elements analysis of groundwaters using ICP-MS, the regional characteristics of raw waters were confirmed. Additionally, multivariate analysis was applied to element concentrations in groundwater of the sampling points. This analysis revealed that raw waters in Aichi Prefecture were divided into three groups of West-Owari, part of West-Mikawa and the other by the distribution of element concentrations. In the future, the sampling points will be increased to clarify the details of the regional characteristics and relationship between raw waters and tap waters. Furthermore, this study is considered useful to respond appropriately to health related crisis and the elements which toxicity became identified.

Key words : ICP-MS, simultaneous analysis of multi-elements, multivariate analysis, raw water, groundwater

他誌掲載論文抄録

The association between documentation of Koplik spots and laboratory diagnosis of measles and other rash diseases in a national measles surveillance program in Japan

Kimura H^{1,2,3}, Shirabe K⁴, Takeda M⁵, Kobayashi M⁶, Tsukagoshi H⁶, Okayama K², Ryo A³, Nagasawa K^{1,7}, Okabe N^{3,8}, Minagawa H, Kozawa K³

¹Infectious Disease Surveillance Center, National Institute of Infectious Diseases, ²Gunma Paz University, ³Yokohama City University, ⁴Yamaguchi Prefectural Institute of Public Health and Environment, ⁵Department of Virology III, National Institute of Infectious Diseases, ⁶Gunma Prefectural Institute of Public Health and Environmental Sciences, ⁷Eastern Chiba Medical Center, ⁸Kawasaki City Institute for Public Health Frontiers in Microbiology, doi: 10.3389/fmicb.2019.00269, 2019

Koplik spots are considered a disease-specific sign for measles, although comprehensive virological studies have not been conducted to date. In Japan, a national survey of 3023 measles and measles-suspected cases was conducted between 2009 and 2014 using polymerase chain reaction (PCR) or reverse transcription PCR (RT-PCR) to detect various rash/fever-associated viruses. Koplik spots were observed in 717 of 3023 cases (23.7%). Among these, the measles virus was detected in 202 cases (28.2%), while the rubella virus was detected in

125 cases (17.4%). Other viruses were detected in 51 cases having the spots (7.1%). In some of the cases with spots, two or three viruses, such as the rubella virus, parvovirus, and human herpesvirus type 6 were also detected. The sensitivity and specificity of Koplik spots as a diagnostic marker for measles were 48 and 80%, respectively. The results suggested that Koplik spots might appear not only in measles but also in other viral infections, such as rubella, as a clinical sign.

Nationwide Molecular Epidemiology of Measles Virus in Japan Between 2008 and 2017

Seki F¹, Miyoshi M², Ikeda T³, Nishijima H⁴, Saikusa M⁵, Itamochi M⁶, Minagawa H, Kurata T⁷, Ootomo R⁸, Kajiwara J⁹, Kato T¹⁰, Komase K¹¹, Tanaka-Taya K¹¹, Sunagawa T¹¹, Oishi K¹¹, Okabe N¹², Kimura H¹³, Suga S¹⁴, Kozawa K¹⁵, Otsuki N¹, Mori Y¹, Shirabe K¹⁶, Takeda M¹, the Measles Virus Surveillance Group of Japan (Yasui Y, et al.), the Technical Support Team for Measles Control in Japan

¹Department of Virology 3, National Institute of Infectious Diseases, ²Hokkaido Institute of Public Health, ³Yamagata Prefectural Institute of Public Health, ⁴Chiba Prefectural Institute of Public Health, ⁵Yokohama City Institute of Public Health, ⁶Toyama Institute of Health, ⁷Osaka Institute of Public Health, ⁸Tottori Prefectural Institute of Public Health and Environmental Science, ⁹Fukuoka Institute of Health and Environmental Sciences, ¹⁰Okinawa Prefectural Institute of Health and Environment, ¹¹Infectious Disease Surveillance Center, National Institute of Infectious Diseases, ¹²Kawasaki City Institute for Public Health, ¹³Gunma Paz

University, ¹⁴National Mie Hospital, ¹⁵Yokohama City University, ¹⁶Yamaguchi Prefectural Institute of Public Health and Environment
Frontiers in Microbiology, doi: 10.3389/fmicb.2019.01470, 2019

Genotyping evidence that supports the interruption of endemic measles virus (MV) transmission is one of the essential criteria to be verified in achieving measles elimination. In Japan since 2014, MV genotype analyses have been performed for most of the measles cases in prefectural public health institutes nationwide. With this strong molecular epidemiological data, Japan was verified to have eliminated measles in March, 2015. However, even in the postelimination era, sporadic cases and small outbreaks of measles have been detected repeatedly in Japan. This study investigated the nationwide molecular epidemiology of MV between 2008 and 2017. The 891 strains in the total period between 2008 and 2017 belonged to seven genotypes (D5, D4, D9, H1, G3, B3, and D8) and 124 different MV sequence variants, based on the 450-nucleotide sequence region of the N gene (N450). The 311 MV strains in the postelimination era between 2015 and

2017 were classified into 1, 7, 8, and 32 different N450 sequence variants in D9, H1, B3, and D8 genotypes. Analysis of the detection period of the individual N450 sequence variants showed that the majority of MV strains were detected only for a short period. However, WHO-named MV strains, MVs/Osaka.JPN/29.15/[D8] and MVi/Hulu Langat.MYS/26.11/[D8], have been detected in many cases over 2 or 3 years between 2015 and 2017. Epidemiological investigation revealed repeated importation of these strains into Japan. To demonstrate the elimination status (interruption of endemic transmission) in situations with repeated importation of the same strains is challenging. Nevertheless, the detailed sequence analysis of individual MV strains and chronological analysis of these strains provided sufficient evidence to show that Japan has still maintained its measles elimination status in 2017.

Detection of influenza A(H3N2) viruses exhibiting reduced susceptibility to the novel cap-dependent endonuclease inhibitor baloxavir in Japan, December 2018

Takashita E¹, Kawakami C², Morita H¹, Ogawa R¹, Fujisaki S¹, Shirakura M¹, Miura H¹, Nakamura K¹, Kishida N¹, Kuwahara T¹, Mitamura K³, Abe T⁴, Ichikawa M⁵, Yamazaki M⁶, Watanabe S¹, Odagiri T¹, The Influenza Virus Surveillance Group of Japan (Yasui Y et al.)

¹National Institute of Infectious Diseases, ²Yokohama City Institute of Public Health, ³Eiju General Hospital, ⁴Abe Children's Clinic, ⁵Ichikawa Children's Clinic, ⁶Zama Children's Clinic

Eurosurveillance. 24(3): pii=1800698, 2019

The novel cap-dependent endonuclease inhibitor baloxavir marboxil was approved for the treatment of influenza virus infection in Japan in February 2018. Two influenza A(H3N2) viruses carrying an I38T substitution in the polymerase

acidic subunit (PA) were detected in baloxavir-treated children in December 2018. This mutation is known to confer reduced susceptibility to baloxavir, and the two mutant viruses exhibited 76- and 120-fold reduced susceptibility to baloxavir.

Evolutionary Analysis of the VP1 and RNA-Dependent RNA Polymerase Regions of Human Norovirus GII.P17-GII.17 in 2013-2017

Matsushima Y¹, Mizukoshi F², Sakon N³, Doan Y-H⁴, Ueki Y⁵, Ogawa Y⁶, Motoya T⁷, Tsukagoshi H⁸, Nakamura N, Shigemoto N⁹, Yoshitomi H¹⁰, Okamoto-Nakagawa R¹¹, Suzuki R¹², Tsutsui R¹³, Terasoma F¹⁴, Takahashi T¹⁵, Sadamasu K¹⁶, Shimizu H¹, Okabe N¹, Nagasawa K¹⁷, Aso J^{18,19}, Ishii H¹⁹, Kuroda M²⁰, Ryo A²¹, Katayama K²² and Kimura H^{18,21}

¹Kawasaki City Institute for Public Health, ²Tochigi Prefectural Institute of Public Health and Environmental Science, ³Osaka Institute of Public Health, ⁴National Institute of Infectious Diseases, ⁵Miyagi Prefectural Institute of Public Health and Environment, ⁶Saitama Institute of Public Health, ⁷Ibaraki Prefectural Institute of Public Health, ⁸Gunma Prefectural Institute of Public Health and Environmental Sciences, ⁹Hiroshima Prefectural Technology Research Institute Public Health and Environment Center, ¹⁰Fukuoka Institute of Health and Environmental Sciences, ¹¹Yamaguchi Prefectural Institute of Public Health and Environment, ¹²Kanagawa Prefectural Institute of Public Health, ¹³Aomori Prefecture Public Health and Environment Center, ¹⁴Wakayama Prefectural Research Center of Environment and Public Health, ¹⁵Iwate Prefectural Research Institute for Environmental Sciences and Public Health, ¹⁶Tokyo Metropolitan Institute of Public Health, ¹⁷Eastern Chiba Medical Center, ¹⁸Gunma Paz University, ¹⁹Kyorin University School of Medicine, ²⁰Pathogen Genomics Center, National Institute of Infectious Diseases, ²¹Yokohama City University, ²²Kitasato University

Frontiers in Microbiology, doi: 10.3389/fmicb.2019.02189, 2019

Human norovirus (HuNoV) GII.P17-GII.17 (Kawasaki2014 variant) reportedly emerged in 2014 and caused gastroenteritis outbreaks worldwide. To clarify the evolution of both VP1 and RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) regions of GII.P17-GII.17, we analyzed both global and novel Japanese strains detected during 2013–2017. Time-scaled phylogenetic trees revealed that the ancestral GII.17 VP1 region diverged around 1949, while the ancestral GII.P17 RdRp region diverged around 2010. The evolutionary rates of the VP1 and RdRp regions were estimated at $\sim 2.7 \times 10^{-3}$ and $\sim 2.3 \times 10^{-3}$ substitutions/site/year, respectively. The phylogenetic distances of the VP1 region exhibited no overlaps between intra-cluster and inter-cluster peaks in the GII.17 strains, whereas

those of the RdRp region exhibited a unimodal distribution in the GII.P17 strains. Conformational epitope positions in the VP1 protein of the GII.P17-GII.17 strains were similar, although some substitutions, insertions and deletions had occurred. Strains belonging to the same cluster also harbored substitutions around the binding sites for the histo-blood group antigens of the VP1 protein. Moreover, some amino acid substitutions were estimated to be near the interface between monomers and the active site of the RdRp protein. These results suggest that the GII.P17-GII.17 virus has produced variants with the potential to alter viral antigenicity, host-binding capability, and replication property over the past 10 years.

Polio vaccination coverage and seroprevalence of poliovirus antibodies after the introduction of inactivated poliovirus vaccines for routine immunization in Japan

Satoh H¹, Tanaka-Taya K¹, Shimizu H¹, Goto A², Tanaka S³, Nakano T⁴, Hotta C⁵, Terue Okazaki T⁶, Itamochi M⁷, Ito M, Okamoto-Nakagawa R⁸, Yamashita Y⁹, Arai S¹, Okuno H¹, Morino S¹, Oishi K¹

¹National Institute of Infectious Diseases, ²Hokkaido Institute of Public Health, ³Yamagata Prefectural Institute of Public Health, ⁴Gunma Prefectural Institute of Public Health and Environmental Sciences, ⁵Chiba Prefectural Institute of Public Health, ⁶Tokyo Metropolitan Institute of Public Health, ⁷Toyama Institute of Health, ⁸Yamaguchi Prefectural Institute of Public Health and Environment, ⁹Ehime Prefectural Institute of Public Health and Environmental Science

Vaccine 37, 1964–1971, 2019

In Japan, the oral poliovirus vaccine (OPV) was changed to 2 types of inactivated poliovirus vaccine (IPV), the standalone conventional IPV (cIPV) and the Sabin-derived IPV combined with diphtheria-tetanus-acellular pertussis vaccine (DTaP-sIPV), for routine immunization in 2012. We evaluated polio vaccination coverage and the seroprevalence of poliovirus antibodies using data from the National Epidemiological Surveillance of Vaccine-Preventable Diseases (NESVPD) from 2011 to 2015. Several years before the introduction of IPV in 2012, OPV administration for children was refused by some parents because of concerns about the risk of vaccine-associated paralytic poliomyelitis. Consequently, in children aged <1 years who were surveyed in 2011-2012, polio vaccination coverage (45.0-48.8%) and seropositivity rates for poliovirus (type 1: 51.7-65.9%, type 2: 48.3-53.7%, and type 3: 15.0-

29.3%) were decreased compared to those surveyed in 2009. However, after IPV introduction, the vaccination coverage (95.5-100%) and seropositivity rates (type 1: 93.2-96.6%, type 2: 93.1-100%, and type 3: 88.6-93.9%) increased among children aged <1 years in 2013-2015. In particular, seropositivity rates and geometric mean titers (GMTs) for poliovirus type 3 in <5-year-old children who received 4 doses of IPV (98.5% and 247.4, respectively) were significantly higher than in those who received 2 doses of OPV (72.5% and 22.9, respectively). Furthermore, in <5-year-old children who received 4 doses of either DTaP-sIPV or cIPV, the seropositivity rates and the GMTs for all 3 types of poliovirus were similarly high (96.5-100% and 170.3-368.8, respectively). Our findings from the NESVPD demonstrate that both the vaccination coverage and seropositivity rates for polio remained high in children after IPV introduction.

風しんの全数検査移行に伴う地方衛生研究所の対応状況--愛知県

皆川洋子、齋藤典子、齋藤友睦、安達啓一、廣瀬絵美、伊藤 雅、松本昌門、長瀬智哉、安井善宏

病原微生物検出情報 40(8):133-134, 2019

2018年1月より「風しんに関する特定感染症予防指針」一部改正に伴い、風しん疑い全事例に対するウイルス遺伝子検査対応について、当所が担当しているウイルス検

査及び医療機関より報告された臨床検査結果を含む患者情報提供を中心に、指針改正前後の変化を報告した。

感染症サーベイランスにおける地方衛生研究所の役割

皆川洋子

臨床とウイルス 47(3):119-126, 2019

地方衛生研究所(地衛研)は地域の公衆衛生に関する①調査研究②試験検査③情報の解析・提供及び発信④研修指導等を担当しており、感染症発生動向調査では、ウイルス担当部署による病原体検索に加えて、「地方感染症情報センター」として各都道府県等域における患者情報、疑似症情報及び病原体情報を収集・分析し、全国情報と併せて医師会等の関係機関に提供・公開している。地衛研にとって感染症サーベイランスは②試験検査及び③情報の解析・提供及び

発信の対象として、きわめて重要な位置を占めるばかりでなく、サーベイランスの結果として得られる病原体や発生動向データに基づいて地域に根ざした①調査研究を行う基盤となっている。感染症サーベイランスにおいて、多くの地衛研が担当している「地方感染症情報センター」の情報解析・提供機能、及びウイルスを主とする病原体検索の現状と最近の成果について紹介し、今後の方向性について考察した。

地衛研の立場からみた麻疹排除維持と風疹排除への展望

皆川洋子、安井善宏

臨床とウイルス 47(4):300-309, 2019

わが国は、2015年3月に世界保健機関西太平洋事務局(WPRO)より麻疹排除状態と認定された。排除状態維持の検証及び風しん排除の達成には、予防接種率の維持と並んで疫学調査やウイルス検査が不可欠である。麻疹及び風疹が日本に常在しない感染症となった現在、発疹症患者に適切な病原

体診断を行うことは輸入感染症対策としても有用と考えられる。愛知県では、2010年から2014年の間輸入麻疹を端緒とする集団発生が繰り返された。2015年以降患者報告は少なかったが2018年は沖縄で感染した患者を端緒とする集団発生など37名(全国282名)の患者報告があった。風し

んも 2018 年 119 名（全国 2917 名）と 2012-2013 年に次いで多く、米国疾病予防制御センターから日本への渡航に注意喚起が出ている。麻疹ウイルス・風疹ウイルス検査（遺伝子検出及び遺伝子型別等）を担当する地

方衛生研究所の視点から、近年の麻疹・風疹発生状況と主に当所におけるウイルス検査対応を紹介し、排除に向けた展望について私見を述べた。

麻疹の抗体保有状況—2018 年度感染症流行予測調査（暫定結果）

佐藤 弘¹、多屋馨子¹、大石和徳¹、竹田 誠²、愛知県衛生研究所他（麻疹感受性調査実施都道府県）

¹ 国立感染症研究所感染症疫学センター、² 国立感染症研究所ウイルス第三部
病原微生物検出情報 40(4):62-63, 2019

感染症流行予測調査における麻疹の感受性調査は、1978 年度からほぼ毎年実施されている。乳幼児から高齢者まで幅広い年齢層における予防接種状況ならびに抗体保有状況について調査を行っている。2018 年度は、わが国における麻疹排除認定（2015 年 3 月）から 3 年後の調査となるが、本調査は今後の麻疹対策および麻疹排除の維持を継続していく上で重要である。麻疹の抗体保有率は、2014 年度の調査以降、5 年連続で 2 歳以上のすべての年齢/年齢

群で 95% 以上を示し、高い抗体保有率が維持されていた。一方、すべての年齢層に PA 抗体価 1:128 未満の者が存在することから、国内における麻疹の排除状態を維持するために、引き続き高い抗体保有率を維持するとともに、麻疹患者が 1 人でも発生した時の迅速な感染拡大予防策に加えて、渡航前の麻疹含有ワクチンの接種ならびに高い予防接種率・抗体保有率の維持が重要である。

新規抗インフルエンザ薬バロキサビル未投与患者からのバロキサビル耐性変異ウイルスの検出

高下恵美¹、小川理恵¹、森田博子¹、藤崎誠一郎¹、白倉雅之¹、三浦秀佳¹、中村一哉¹、岸田典子¹、桑原朋子¹、秋元未来¹、佐藤 彩¹、菅原裕美¹、渡邊真治¹、小田切孝人¹、矢野拓弥²、赤地重宏²、松村義晴²、落合 仁³、川上千春⁴、清水耕平⁴、小澤広規⁴、宇宿秀三⁴、田中伸子⁴、大久保一郎⁴、太田 陽⁵、富樫勇人⁵、田中文子⁵、齋藤綾子⁶、市川正孝⁷、三田村敬子⁸、安倍 隆⁹、山崎雅彦¹⁰、地方衛生研究所インフルエンザウイルス株サーベイランスグループ（安井善宏他）

¹ 国立感染症研究所インフルエンザウイルス研究センター、² 三重県保健環境研究所、³ 落合小児科医院、⁴ 横浜市衛生研究所、⁵ 済生会横浜市南部病院小児科、⁶ さいとう小児科、⁷ 市川こどもクリニック、⁸ 公益財団法人ライフ・エクステンション研究所附属永寿総合病院、⁹ あべこどもクリニック、¹⁰ 座間小児科診療所
病原微生物検出情報 40(4):67-69, 2019

新規抗インフルエンザ薬バロキサビルは、日本国内において2018年2月に承認され、3月より使用可能となった。国立感染症研究所と全国地方衛生研究所は共同で、2017/18シーズンからバロキサビルに対する耐性株サーベイランスを実施している。インフルエンザウイルスPA蛋白質のI38T耐性変異はバロキサビル投与に起因する変異であると考えられている。バロキサビル未投与患者からバロキサビル耐

性変異ウイルス3株を検出したが、患者の詳細な疫学解析により、これら変異ウイルスはバロキサビル投与患者から感染伝播した可能性が示唆された。バロキサビル耐性変異ウイルスの発生動向の把握は、国内のみならず世界的にも極めて重要な公衆衛生上の課題であり、国立感染症研究所と全国地方衛生研究所では引き続きバロキサビル耐性株サーベイランスを実施し、速やかに情報提供を行っていく。

平成29年度ポリオ環境水サーベイランス（感染症流行予測調査事業および調査研究）にて検出されたエンテロウイルスについて

吉田 弘¹、愛知県衛生研究所他（ポリオ環境水サーベイランス協力地衛研）

¹国立感染症研究所ウイルス第二部

病原微生物検出情報 40(5):88-90, 2019

2013(平成25)年度より開始したポリオ環境水サーベイランスは5年目を迎えた。これまで2014年と2016年にそれぞれ1回ずつ3型ポリオウイルスワクチン株が流入下水より検出されている。わが国では2012年9月より定期接種用ワクチンを経口ポリオワクチン(OPV)から不活化ポリオワクチン(IPV)に変更した。これに伴い海外から輸入を想定した高感度なウイルスサーベイランスが必要になるため、翌年度より感染症流行予測調査事業および各地方衛生研究所による調査研究として環境水サーベイランスを開始した。環境水サーベイランスではポリオウイルスを検出することを目的としているが、各地衛研(18地点)では同時に検出されるエンテロウイルスの同定も行っている。平成29年度の調査期間中ポリオウイルスは検出されなかった。エンテロウイルスA(EV-A)群に属するウイルスはコクサッ

キーウイルスA4(CA4)、エンテロウイルス71が各1箇所検出された。環境水から分離されたエンテロウイルスの大部分はEV-B群であった。検出地点と延べ検出月数が特に多いウイルスは、エコーウイルス6(E6)とE3であり、他のエンテロウイルスに比べ、長期間かつ広範囲に流行していた可能性が示唆された。世界ポリオ根絶計画の進捗とともに野生株感染によるポリオ患者の発生はアフガニスタン、パキスタンの2カ国に限られており1型野生株のみが報告されている。また2018年には患者数は両国で32例が報告されている。野生株による患者数は大幅に減少した半面、伝播型ワクチン由来ポリオウイルス(cVDPV)による患者が、同年8カ国より105例が報告される。野生株のみならずVDPVの輸入リスクを念頭に置いたポリオウイルス監視体制を維持する必要がある。

2018 年度感染症流行予測調査における風疹の予防接種状況および抗体保有状況 (暫定結果)

新橋玲子¹、佐藤 弘¹、多屋馨子¹、鈴木 基¹、森 嘉生²、竹田 誠²、愛知県衛生研究所他（風疹感受性調査実施都道府県）

¹国立感染症研究所感染症疫学センター、²国立感染症研究所ウイルス第三部
病原微生物検出情報 40(8):135-137, 2019

感染症流行予測調査における風疹感受性調査は 1971 年度以降、ほぼ毎年実施されてきた。本調査は風疹に対する感受性者を把握し、効果的な予防接種施策を図るための資料にすることを目的として、乳幼児から高齢者まで幅広い年齢層における予防接種状況ならびに抗体保有状況の調査を行っている。2018 年度調査において 30 代後半～50 代前半男性の予防接種割合および抗体

保有割合は女性と比較して低く、これまでの調査と同様の結果であった。2019 年から 3 年間（2022 年 3 月まで）は、1962～1978 年度生まれの男性で HI 抗体価が 1:8 以下であった者が新たに風疹の定期接種対象（第 5 期）に追加されており、本調査を継続して実施することでこの対策に対する効果を評価していく事が重要と考えられた。

2018/19 シーズンのインフルエンザ分離株の解析

岸田典子¹、中村一哉¹、藤崎誠一郎¹、白倉雅之¹、佐藤 彩¹、秋元未来¹、三浦秀佳¹、高下恵美¹、桑原朋子¹、小川理恵¹、森田博子¹、永田志保¹、菅原裕美¹、渡邊真治¹、長谷川秀樹¹、小田切孝人¹、地方衛生研究所インフルエンザ株サーベイランスグループ（安井善宏他）

¹国立感染症研究所インフルエンザウイルス研究センター
病原微生物検出情報 40(11):180-185, 2019

2018/19 インフルエンザシーズンは、2018 年第 49 週に定点当たりの報告数が 1 を超え、流行期に突入した。これは前シーズンとほぼ同様の流行入りであった。国内のインフルエンザウイルスの流行は A 型ウイルスが中心であったが、B 型ウイルス（主に Victoria 系統）も 2019 年第 10 週から増加がみられた。A 型ウイルスは、2019 年第 1 週までは A(H1N1)pdm09 が多く報告されたが、第 2 週以降は A(H3N2)の報告数が上回った。国立感染症研究所では 2018/19 シーズンに全国の地方衛生研究所で分離および型・亜型同定されたウイルスの約 10%につ

いて分与を受け、ヘマグルチニン遺伝子系統樹解析、抗原性解析および抗インフルエンザ薬耐性の検出と性状解析を行った。最近の A(H3N2)ウイルスは 3C.2a および 3C.3a の 2 群に大別されるが、国内では 3C.2a1、3C.2a2、3C.2a3 群が形成され、遺伝子の多様化を呈した。本解析は、「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」の施行に伴う感染症発生動向調査事業に基づくインフルエンザサーベイランスとして、医療機関、保健所、地方衛生研究所との共同で実施された。

抗インフルエンザ薬耐性株の検出と性状

高下恵美¹、小川理恵¹、森田博子¹、永田志保¹、藤崎誠一郎¹、三浦秀佳¹、白倉雅之¹、岸田典子¹、中村一哉¹、桑原朋子¹、佐藤 彩¹、秋元未来¹、菅原裕美¹、渡邊真治¹、長谷川秀樹¹、小田切孝人¹、地方衛生研究所インフルエンザ株サーベイランスグループ（安井善宏他）

¹国立感染症研究所インフルエンザウイルス研究センター
病原微生物検出情報 40(11):185-186, 2019

季節性インフルエンザに対する抗インフルエンザ薬としては、4 種類のノイラミニダーゼ（NA）阻害剤オセルタミビル、ザナミビル、ペラミビルおよびラニナミビル、そしてキャップ依存性エンドヌクレアーゼ阻害剤バロキサビルが承認されている。薬剤耐性株の検出状況を継続的に監視し、国や地方自治体、医療機関ならびに世界保健機関（WHO）に対して迅速に情報提供することは公衆衛生上非常に重要である。そこで国立感染症研究所（感染研）では全国の地方衛生研究所（地衛研）と共同で、薬剤耐性株サーベイランスを実施している。A(H1N1)pdm09 ウイルス；NA 阻害剤については、NA に H275Y 耐性変異をもつオセルタミ

ビル・ペラミビル耐性株が 21 株（1.0%）検出された。バロキサビルについては、PA に I38X 耐性変異をもつバロキサビル耐性変異株が 6 株（1.8%）検出された。A(H3N2) ウイルス；バロキサビルについては、PA に I38X 耐性変異をもつバロキサビル耐性変異株が 34 株（9.6%）検出された。B 型ウイルス；NA 阻害剤については、NA に H273Y 耐性変異をもつペラミビル耐性株が 1 株（0.6%）検出された。本解析は、「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」の施行に伴う感染症発生動向調査事業に基づくインフルエンザサーベイランスとして、医療機関、保健所、地方衛生研究所との共同で実施された。

2018 年度感染症流行予測調査におけるインフルエンザ予防接種状況および抗体保有状況

新橋玲子¹、多屋馨子¹、鈴木 基¹、渡邊真治²、長谷川秀樹²、愛知県衛生研究所他（インフルエンザ感受性調査・予防接種歴調査実施都道府県）

¹国立感染症研究所感染症疫学センター、²国立感染症研究所インフルエンザウイルス研究センター
病原微生物検出情報 40(11):188-190, 2019

厚生労働省健康局結核感染症課を実施主体とする感染症流行予測調査事業においてインフルエンザ予防接種状況と抗体保有状況について毎年度調査し、わが国におけるインフルエンザに対する感受性者の把握を行っている。インフルエンザワクチンは 2001 年の予防接種法改正以降、高齢者を対象に定期接種となり、予防接種実施者数が公表されている。この調査では全国の各都道府県において約 8,000 人の予防接種歴が調査されており、特に任意接種世代の予防

接種実施状況の把握に関して有用である。抗体保有状況は抗体陽性となった時期が明確でないこと、感染による抗体上昇とワクチン接種によるそれとの区別がつかないこと等から結果の解釈が難しい。2017 年度と 2018 年度で同じ調査株を用いている B 型（山形系統）と A/H1pdm09 亜型についてみると、2018 年度調査における両者に対する抗体保有割合は、2017 年度と比較して多くの年齢群で増加し、特に 65 歳以上群において増加した。

バロキサビル耐性変異ウイルスのヒトからヒトへの感染伝播

高下恵美¹、森田博子¹、小川理恵¹、藤崎誠一郎¹、白倉雅之¹、三浦秀佳¹、中村一哉¹、岸田典子¹、桑原朋子¹、菅原裕美¹、佐藤 彩¹、秋元未来¹、渡邊真治¹、小田切孝人¹、長谷川秀樹¹、市川正孝²、三田村敬子³、安倍 隆⁴、山崎雅彦⁵、**地方衛生研究所インフルエンザ株サーベイランスグループ（安井善宏他）**

¹国立感染症研究所インフルエンザウイルス研究センター、²市川こどもクリニック、³公益財団法人ライフ・エクステンション研究所附属永寿総合病院、⁴あべこどもクリニック、⁵座間小児科診療所

病原微生物検出情報 40(11):197-199, 2019

抗インフルエンザ薬バロキサビルは、日本、米国、香港、台湾をはじめ複数の国・地域で承認されている。バロキサビル耐性変異ウイルスはほとんどがバロキサビル投与後の患者から検出されているが、12歳未満の小児のうち3例、12-19歳の未成年者のうち1例、65歳以上の高齢者のうち1例の計5例についてはバロキサビル未投与の患者からA(H3N2)亜型のバロキサビル耐性変異ウイルスが検出された。このうち3例は散发例で、2例は家族内発生例であった。家族内発生例2例については速報として報告したが、うち1例について、その後の詳細な解析により、バロキサビル耐性変異ウイルスのヒトからヒトへの感染伝播が確認された。また、日本国内のバロキサビル耐

性変異株サーベイランスにおいて、PA I38耐性変異が検出されたA(H3N2)ウイルス感染患者34名のうち、5名はバロキサビルの投与を受けておらず、バロキサビル耐性変異ウイルスのヒトからヒトへの感染伝播が起きたと考えられる。バロキサビルの承認国・地域が増えたため、世界保健機関(WHO)では、Global Influenza Surveillance and Response System (GISRS)によるバロキサビル耐性変異株のグローバルサーベイランスの準備を進めている。国立感染症研究所と全国地方衛生研究所では引き続き、バロキサビル耐性変異ウイルスの発生動向を監視し、国内外に向けて速やかに情報提供を行っていく。

家畜を介した非流行地へのエキノコックスの拡散

森島康之、杉山 広、山崎 浩、近 真理奈、長谷川晶子、土井陸雄

病原微生物検出情報 40(3):40-42, 2019

日本で確認されるヒトのエキノコックス症のほとんどは多包性エキノコックス症で、患者は多包条虫が常在する北海道に集中するが、北海道以外の都府県からも少数ながら報告がありその中には流行地と接点を持たない原発疑い例が存在する。動物についても、本州以南において終宿主(成虫が寄生)、中間宿主(幼虫が寄生)の感染動物の検出例がある。終宿主であるイヌに関しては、

本州においては2005年に埼玉県で捕獲されたイヌから多包条虫卵が検出され、本州以南第一例目となる「犬のエキノコックス症」の届け出となった。2014年には愛知県で捕獲されたイヌから多包条虫卵が検出され、愛知県ではその後も野外採取されたイヌの糞便から虫卵やDNAの検出が継続し、2018年には3頭の捕獲犬の感染例が届け出られた。一定の地理的範囲内で時期を違え

て検出が続くことから、愛知県内の一部地域には多包条虫が定着したと考えられる。非流行地において感染動物が発見された場合、終宿主はヒトへの直接の感染源となるだけでなく、中間宿主へ伝播すれば新たな流行地形成につながる恐れがある。

北海道から年間におよそ1万頭のイヌが移送されていると推定され、移送される個

体に多包条虫の感染例が発見されていることから、非流行地への拡散防止を考える上で北海道から本州へ移動するイヌのへの対応は喫緊の課題である。また、イヌの輸入検査は現在狂犬病とレプトスピラ症に限られており、多包条虫および単包条虫の感染実態は不明で、輸入犬における感染実態の把握が必要である。

愛知県衛生研究所報

第 70 号

令和 2(2020)年 3 月 発行

〒462-8576

名古屋市北区辻町字流 7 番 6

愛知県衛生研究所

電話：052-910-5618（代表）

FAX：052-913-3641

e-mail: eiseiken@pref.aichi.lg.jp

愛知県衛生研究所ウェブサイト：<https://www.pref.aichi.jp/eiseiken>

電話（ダイヤルイン）

総務課	052-910-5618
企画情報部	
健康科学情報室	052-910-5619
生物学部	052-910-5654
ウイルス研究室	052-910-5674
細菌研究室	052-910-5669
医動物研究室	052-910-5654
衛生化学部	052-910-5638
医薬食品研究室	052-910-5639
生活科学研究室	052-910-5643

Published by

AICHI PREFECTURAL INSTITUTE OF PUBLIC HEALTH
7-6 Nagare, Tsuji-cho, Kita-ku, Nagoya, 462-8576 Japan

（この刊行物は再生紙を使用しています）