

愛知県衛生研究所報

第 71 号 令和 3 年 3 月

目 次

調査研究

愛知県における新型コロナウイルス感染症の疫学特性 長瀬智哉、中村瑞那、山本弘明、安井善宏	1
愛知県で検出されたコクサッキーウイルス A6 型 (CV-A6) の解析 伊藤 雅、皆川洋子、安達啓一、廣瀬絵美、齋藤典子、齋藤友睦、中村範子、 安井善宏、佐藤克彦	10
黄色ブドウ球菌の毒素遺伝子保有状況と分子疫学解析への適用 山田和弘、松田達也、續木洋一、佐藤克彦	21
LC-MS/MS を用いた畜水産物中の残留アセトアミノフェン分析法の開発 海野明広、堀田沙希、福田博司、猪飼誉友 ¹ 、上野英二、棚橋高志 ¹ (現所属) 中部大学応用生物学部	29
水道水質検査試料の採水容器に関する検討 服部靖子、原田知美、加藤千佳 ¹ 、渡邊美奈恵、棚橋高志 ¹ (現所属) 春日井保健所	41
他誌掲載論文抄録	49

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

Volume 71, March 2021

Contents

Original Papers

Epidemiological features of novel coronavirus infection in Aichi Prefecture	1
Tomoya Nagase, Mizuna Nakamura, Hiroaki Yamamoto, Yoshihiro Yasui	
Virological analysis of Coxsackie virus A6 detected in Aichi Prefecture	10
Miyabi Ito, Hiroko Minagawa, Hirokazu Adachi, Emi Hirose, Noriko Saito, Tomochika Saito, Noriko Nakamura, Yoshihiro Yasui, Katsuhiko Sato	
Prevalence of staphylococcal enterotoxin genes in Aichi Prefecture from 2011 to 2020 and evaluation of a discriminatory power of staphylococcal enterotoxin genes PCR method	21
Kazuhiro Yamada, Tatsuya Matsuda, Hirokazu Tsuduki, Katsuhiko Sato	
Development of residual acetaminophen analysis method in livestock and marine products using LC-MS/MS	29
Akihiro Unno, Saki Hotta, Hiroshi Fukuda, Yoshitomo Ikai ¹ , Eiji Ueno, Takashi Tanahashi	
¹ Present affiliation: College of Bioscience and Biotechnology, Chubu University	
Examination of water sample bottles for tap water quality test samples	41
Yasuko Hattori, Tomomi Harada, Chika Kato ¹ , Minae Watanabe, Takashi Tanahashi	
¹ Present affiliation: Kasugai Health Center	
Summaries of papers accepted to other journals	49

調 査 研 究

愛知県における新型コロナウイルス感染症の疫学特性

長瀬智哉、中村瑞那、山本弘明、安井善宏

要 旨

2019年12月に中国の武漢市で感染者が報告されて以来、わずか数か月の間に世界的な流行となった新型コロナウイルス感染症（COVID-19）は、2020年2月中旬以降、愛知県内の居住者にも感染が認められるようになった。今回、県内居住者の2020年2月10日（2020年7週）から10月11日（41週）までに確認された新型コロナウイルス陽性者（以下、陽性者）について各自治体からの報道発表資料を利用して、この期間に見られた流行の大きな波を第1波及び第2波と定義して愛知県における感染拡大の特徴等を解析した。その結果、愛知県内のCOVID-19の流行は第1波・第2波共に人口が密集している都市部から郊外へ拡大していたことが示唆された。感染の様相を詳細に解析すると、第1波では拡大のスピードは緩やかで、感染経路が判明している陽性者が多く、比較的経路不明者は少なかったため、市中感染は限定的であったと考えられた。しかし、第2波では感染拡大期において流行曲線は急峻となっており、急激な感染拡大が起きていた。また20～50歳代の経路不明者の割合は50%を超え、これらの年代の特に無症状者や軽症者を中心に市中感染が進行していたことが推察された。

キーワード： 新型コロナウイルス感染症（COVID-19）、感染症発生動向調査、疫学特性

序 文

COVID-19は、2019年12月、中華人民共和国湖北省武漢市において確認されて以来、日本を含む19か国でヒト-ヒト感染が確認されたこと等を受け、世界保健機関（WHO）は2020年1月30日、COVID-19について「国際的に懸念される公衆衛生上の緊急事態（PHEIC）」を宣言した。その後、世界的な感染拡大の状況等からWHOは3月11日、新型コロナウイルス感染症をパンデミック（世界的な大流行）とみなせると表明した。日本においては、新型コロナウイルス感染症を指定感染症として定める等の政令が1月28日に公布、2月1日から施行され¹⁾、様々な感染拡大防止対策が取られるようになった。

愛知県においては2020年1月26日に中国人渡航者の初発例を認め、2月中旬以降から県内居住者にも感染が認められるようになった。その後、子供たちの感染リスクに予め備えるため小学校・中学校・高等学校等に対し、全国一斉臨時休業（3月2日～春季休業開始日）等の対策が取られた²⁾。全国的に感染者が増えた4月7日には政府から7都府県に新型インフルエンザ等対策特別措置法に基づく緊急事態宣言が発出された（4月16日全国へ拡大^{3) 4)}。愛知県では新規感染者数、PCR検査の陽性率等を指標として流行の監視を行い、感染者が増加した4月10日⁵⁾及び8月6日⁶⁾には、愛知県独自に愛知県緊急事態宣言を発出するに至った。2回の緊急事態宣言は県民や

事業者に対し移動の自粛や休業等を要請する内容であり⁷⁾、県内の社会経済活動へ多大な影響を与えることとなった。

COVID-19は、新たに発見されたコロナウイルスによる感染症であり、その感染性、病原性等、不明な部分が多い。そこで愛知県内の各自治体から報道発表された資料を利用し、愛知県内居住者で遺伝子検査及び抗原検査で確認された陽性を対象として、愛知県におけるCOVID-19の発生動向の特性を解析した。

対象及び方法

愛知県、名古屋市、豊橋市、岡崎市及び豊田市から報道発表された資料に基づき2020年2月10日（7週）～10月11日（41

週）の期間に新型コロナウイルスの感染が確認され、かつ愛知県内を居住地とする陽性を対象（n=5,537、10月12日報道発表時点）とした。報道発表資料から診断時の年齢階級、性別、陽性確認日、居住地、感染経路判明の有無、及び陽性確認時における症状の有無などの情報を収集、解析対象とした。なお、陽性確認日を感染症発生動向調査における報告週（図1参照）の期間に当てはめ診断週とした。また本論文では7～23週を第1波、24～41週を第2波と便宜上定義した。

人口10万人対陽性者数の算出のために使用した人口データは、愛知県人口動態調査結果年報による令和元年10月1日現在の人口を用いた。また、保健所管内の人口

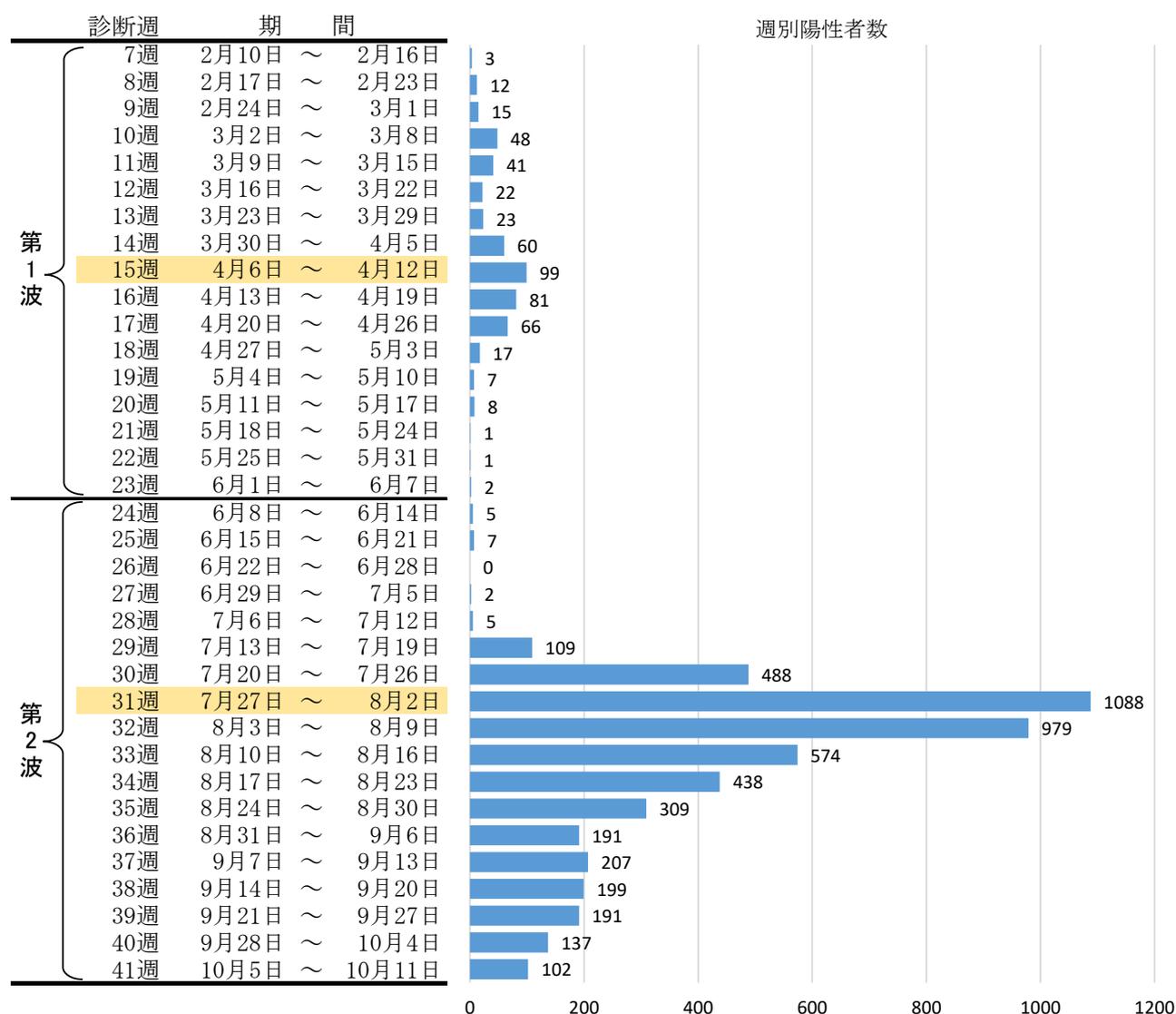


図1 感染症発生動向調査診断週及び期間と愛知県における週別陽性者数

密度算出のための市町村の面積は国土地理院から公表されている令和2年全国都道府県市区町村別面積調のデータを利用した。なお、全国の陽性者数のデータは、厚生労働省のオープンデータを利用した。

結 果

1. 流行曲線（全国との比較）

図2は、横軸に陽性確認日を縦軸に全国（左目盛り）及び愛知県（右目盛り）で確認された陽性者数の過去7日移動平均を示した。7日移動平均を算出することにより曜日によるばらつきを平準化することができる。

その結果、愛知県でも全国と同様な増減傾向を示し、4月中旬と8月上旬に2回の大きな波が観察された。陽性者数の最高値（ピーク）が観察された日は、第1波では愛知県は4月10日、全国では4月14日、また第2波では愛知県が8月3日であったのに対し、全国では8月9日であった。

愛知県での陽性者のピークを全国と比較すると、第1波ではほぼ同時であったのに対し第2波では愛知県が全国よりも6日先にピークに達していたことが観察された。また、陽性者数の推移は愛知県では全国とほぼ同様な傾向を示していたが、第2波では愛知県の方が増加の傾きが急峻であったことが観察された。

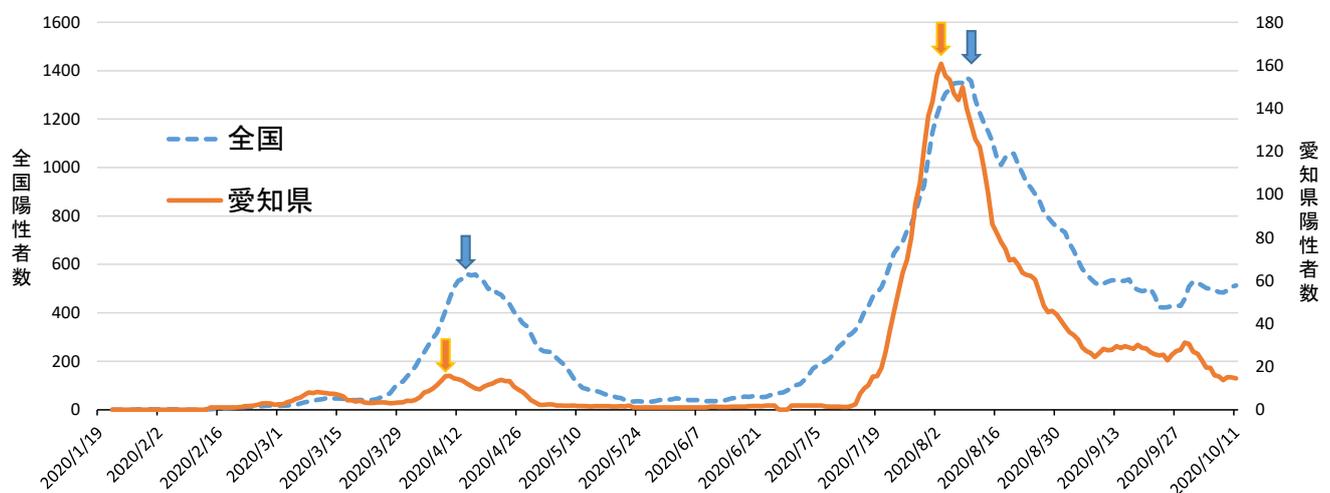


図2 愛知県及び全国における陽性者数(過去7日移動平均)

2. 愛知県における流行第1波及び第2波の比較

2-1. 陽性者属性及び背景

表1に愛知県における第1波、第2波及び全期間の陽性者の属性等をまとめた。

陽性者数は、第1波が506名、第2波が5,031名と第2波では陽性者数は約10倍であった。男女別内訳では、第1波、第2波とも男の方が多く男女比は約1.2対1であった。

死亡数は、第1波では34名、第2波では57名であった。前述のとおり陽性者数は約10倍に増加したのに対し死亡数は1.7倍であった。死亡率(死亡数/患者数x100)では、第1波が6.72に対し、第2波が1.13、全期間総計では1.64であった。

表2に、第1波及び第2波における年齢階級別の陽性者数及びその構成率、感染経路不明者及び陽性確認時に無症状だった者の割合を示す。

陽性者の年齢構成割合を比較すると、第1波に比べ第2波では、10歳代から40歳代の年齢階級で増加しており、特に20歳代の割合が16.6%から29.8%と顕著に増加していた。それに対し、10歳未満及び50歳代以上の割合はすべて減少していた。

感染経路不明の割合を見ると第1波に比べ第2波では、全ての年齢階級で増加しており、全年代総計でも32.8%から53.0%へ

表1 愛知県における陽性者の属性等

定義	第1波	第2波	総計
	7週～23週 2月10日～6月7日	24～41週 6月8日～10月11日	7～41週 2月10日～10月11日
患者数	506	5,031	5,537
男性	279	2,814	3,093
女性	226	2,217	2,443
性別非公表	1	0	1
男女比	1.23 : 1	1.27 : 1	1.27 : 1
死亡数	34	57	91
死亡率 (%)	6.72	1.13	1.64

表2 第1波及び第2波における陽性者年齢階級、感染経路不明者及び無症状者の割合

年齢階級	陽性者数		年齢構成率 (%)		経路不明 (%)		無症状 (%)	
	第1波	第2波	第1波	第2波	第1波	第2波	第1波	第2波
10歳未満	18	136	3.6	2.7	5.6	10.3	50.0	43.6
10歳代	12	319	2.4	6.3	33.3	38.2	16.7	21.2
20歳代	84	1,497	16.6	29.8	34.5	59.5	4.8	9.6
30歳代	65	797	12.9	15.9	32.3	56.0	7.7	9.2
40歳代	65	692	12.9	13.8	36.9	52.3	7.7	13.0
50歳代	85	582	16.8	11.6	44.7	56.4	2.4	14.3
60歳代	72	326	14.3	6.5	27.8	54.9	2.8	17.2
70歳代	51	384	10.1	7.6	33.3	49.2	7.8	16.1
80歳代	45	231	8.9	4.6	24.4	46.3	6.7	21.0
90歳以上	8	63	1.6	1.3	0.0	41.3	0.0	26.2
総計	505	5,027	100	100	32.8	53.0	7.1	14.0

(非公表・調査中等の5名を除く)

増加していた。特に10歳未満及び60歳以上の年齢階級で感染経路不明の割合が増加していた。感染経路不明の割合が最も高かった年齢階級は、第1波では50歳代(44.7%)だったが、第2波では20歳代(59.5%)が最も高かった。

陽性確認時に無症状であった者の割合は、全年代総計で、第1波では7.1%、第2波では14.0%と第2波で増加していた。年齢階級別では、特に高齢になる程、無症状者の割合が増加していた。また、10歳未満では第1波、第2波ともに、ほぼ半数が無症状者であった。

2-2. 第1波及び第2波の各感染拡大期における拡がり方の解析

第1波及び第2波において、感染の拡がり方を解析するため、それぞれ陽性者数が最高値となった週を含む前4週間(第1波:

11～15週(3月9日～4月12日)、第2波:27～31週(6月29日～8月2日))を感染拡大期と定義して、性別、年齢階級及び地域間の特徴等を解析した。

2-2-1. 性別・年齢階級別

第1波及び第2波それぞれ感染の拡大期であった11～15週及び27～31週における陽性者数を合計し性別に年齢階級の割合を比較した(図3)。

第1波の拡大期では男では40歳以下が60%、女では40%近くを占めていたが、第2波では男女とも40歳以下の割合が増加し80%を占めていた。

また第1波に比べ第2波では、男女ともに特に20歳代の占める割合が大きく増加し、男20.5%→42.2%、女15.3%→49.2%に増加していた。

10歳未満では男女とも第1波、第2波で

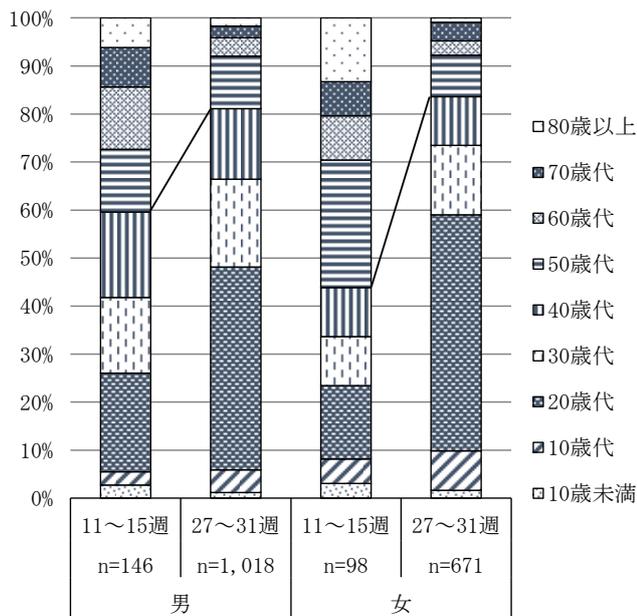


図3 男女別・第1波、第2波の感染拡大期における年齢階級構成割合の比較

の割合の変化は小さかった。

2-2-2. 地域別の拡がり

地域における流行の拡がり方や特徴を解析するため陽性者の居住地（市町村）を管轄する保健所に当てはめ、保健所単位に解析を試みた。人口の偏りを補正するため陽性者数を保健所管内の人口で除し、100,000を乗じた値を人口10万人あたりの陽性者数とした。また、各保健所における人口密度との相関をみるため保健所管内の人口と面積から人口密度を算出した。

表3には、保健所別の人口10万人対の陽性者数を11~15週、27~31週の週別に、人口密度の大きい保健所の順に示した。

図4では、視覚的に把握するため感染の拡大期である12~14週及び28~30週における各保健所の人口10万人対の陽性者数を7段階に区切り、マップに示した。

その結果、第1波では11週から名古屋市から陽性者の発生が始まり、3週間程で県全域に緩やかに拡がっていた。一方、第2波では、29週に急激に陽性者が増加すると同時に急速に県全域に拡がったことが示された（表3及び図4）。

また、第1波（11~15週）及び第2波（27

~31週）の各保健所別人口10万人対陽性者数の平均値と各保健所管内の人口密度との相関を見ると、第1波及び第2波共に、同様な正の相関が示された（図5）。

考察

愛知県におけるCOVID-19の流行の特徴を解明するため、県内の各自治体や厚生労働省から報道発表された資料を基に疫学的な解析を行った。

2020年1月19日から10月11日までの陽性者数の日毎の推移について移動平均を用いて愛知県と全国を比較すると、概ね同様な増減傾向を示していたことから愛知県の発生動向のみならず全国の発生動向にも注視しておく有用性が示唆された。一方で、第2波においては陽性者数のピークが愛知県では全国より6日前に観察された。この全国とのピークのずれは、東京都、大阪府、福岡県などでも発症日ベースのピークが7月中にあったこと⁸⁾などから、第2波では愛知県を含む大都市圏から全国へ感染が拡大した可能性が示唆された。

次に、愛知県で観察された第1波及び第2波の流行にどのような特徴があったのかを中心に解析した。

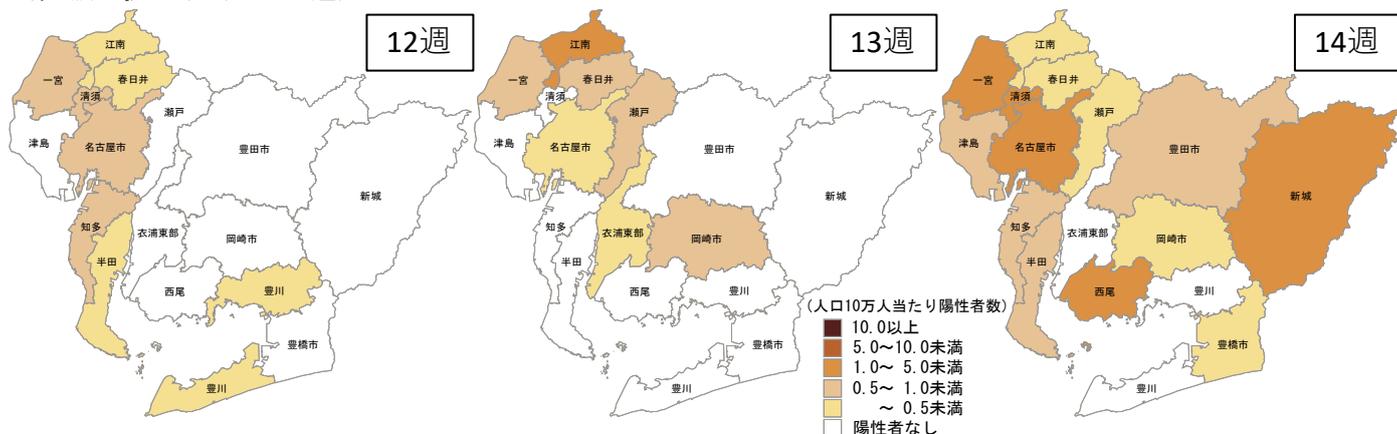
愛知県では、第1波に比べ第2波は陽性者数では約10倍の規模であったのに対し、死亡率では、第1波の6.72に対し、第2波が1.13と減少していた。

年齢階級については、第1波に比べ第2波では20歳代の占める割合が大きく増加しており、その6割近くが感染経路不明であったことから活動量の多い20歳代を中心とする若年層の動向が第2波感染拡大の要因の一つと考えられた。また第2波の感染拡大期においては40歳代以下の年齢階級が80%を占めていた。東京都では6月から感染者が増加し、20~40歳代が80%を占め、歓楽街での感染が多数を占めていたこと⁹⁾などから、愛知県においても繁華街の飲食店を始めとしたクラスターからの拡がりが推測された。また10歳未満の年齢層では、第1波及び第2波共に半数近くが無症状者であった。これは、この年齢層に家族

表3 感染拡大期における保健所別陽性者数(保健所別人口10万対)

保健所	人口密度 (人/km ²)	第1波感染拡大期					第2波感染拡大期				
		11週	12週	13週	14週	15週	27週	28週	29週	30週	31週
名古屋市	7,129	1.37	0.52	0.26	1.25	1.93	0.04	0.17	2.96	11.39	27.93
清須	4,090	0.00	0.58	0.00	2.92	1.17	0.00	0.00	1.75	12.84	7.59
春日井	2,928	0.00	0.22	0.66	0.44	1.10	0.00	0.00	0.88	1.98	8.12
一宮	2,667	0.19	0.58	0.78	1.16	1.75	0.00	0.00	0.58	3.69	13.39
衣浦東部	2,549	0.00	0.00	0.17	0.00	1.34	0.17	0.00	0.33	3.34	9.36
瀬戸	2,071	0.00	0.00	0.63	0.42	2.10	0.00	0.00	0.84	4.41	6.30
江南	1,977	0.00	0.36	1.44	0.36	0.00	0.00	0.00	0.36	3.24	7.93
知多	1,943	0.00	0.58	0.00	0.58	0.86	0.00	0.29	0.58	9.49	10.64
津島	1,573	0.00	0.00	0.00	0.61	1.83	0.00	0.00	1.22	7.32	10.37
豊橋市	1,427	0.00	0.00	0.00	0.27	0.80	0.00	0.00	0.80	1.07	1.07
半田	1,307	0.36	0.36	0.00	0.72	0.72	0.00	0.00	1.43	3.23	10.04
岡崎市	999	0.52	0.00	0.52	0.26	1.03	0.00	0.00	0.26	3.10	8.53
西尾	974	0.00	0.00	0.00	1.41	0.47	0.00	0.00	0.94	2.83	4.24
豊川	792	0.00	0.31	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.31	1.23	4.01
豊田市	464	0.23	0.00	0.00	0.70	0.23	0.00	0.00	1.41	7.04	11.97
新城	51	0.00	0.00	0.00	1.88	0.00	0.00	0.00	0.00	1.88	3.76
平均		0.17	0.22	0.28	0.81	0.96	0.01	0.03	0.92	4.88	9.08
増加率		-	1.3	1.3	2.9	1.2	-	2.2	31.9	5.3	1.9

第1波の拡がり (12~14週)



第2波の拡がり (28~30週)

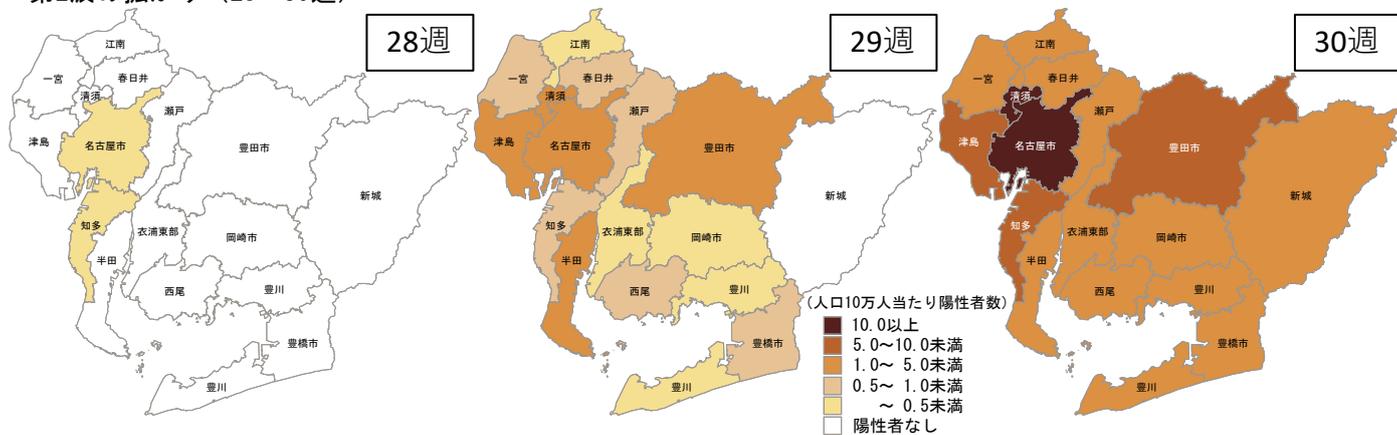


図4 第1波及び第2波の感染拡大期における保健所別陽性者数(人口10万人対)の推移

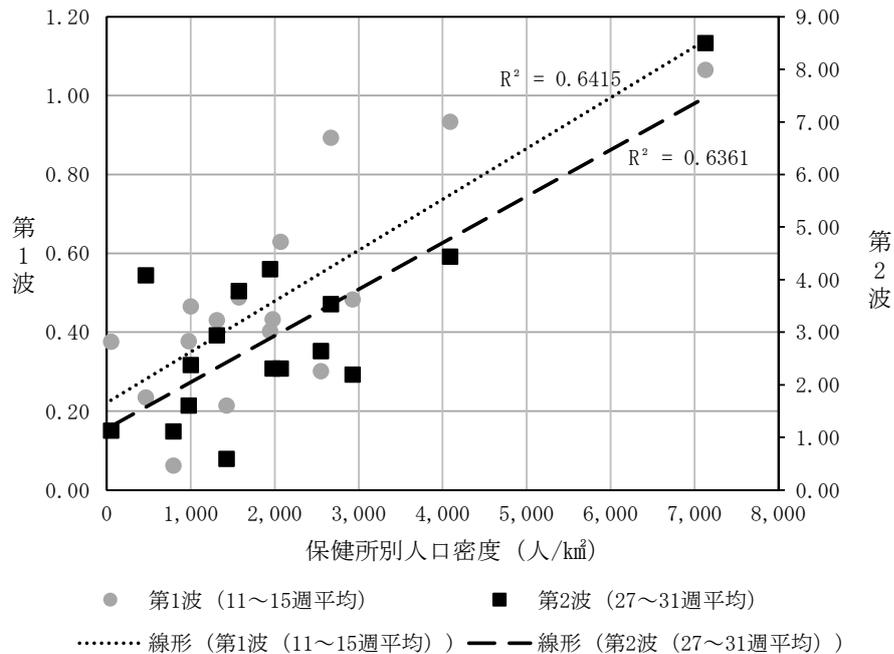


図5 第1波及び第2波のピーク時における保健所別人口10万人対陽性者数と保健所別人口密度(人/km²)との相関

内感染が多く(第1波では陽性者の72%)、濃厚接触者として検査対象となった事例が多かったためと考えられた。また、10歳未満の小児においては新型コロナウイルスの感染に必要な ACE2 遺伝子の鼻粘膜上皮での発現が少ないという報告¹⁰⁾との関連性が考えられた。

陽性確認時に無症状だった者の割合は、第1波7.1%→第2波14.0%に増加していた。この理由としては検査対象の見直しや、抗原検査キット等の新たな検査方法の導入などにより発症前の接触者の検査や不顕性感染者の検査が増えたことが考えられた。また、無症状の小児でも COVID-19 の感染源になり得る¹¹⁾という報告や、感染力は COVID-19 発症の2~3日前から高い¹²⁾という報告もあり、無症状の陽性者を把握することは、そこからの感染を防ぐという目的でも重要と考えられる。その意味では、第2波において無症状で把握された数が多いということは、検査体制の拡充等の施策が機能していたと考えられた。

陽性者数がピークに達するまでの感染拡大期には、地域の人口密度との相関が見られ、人口密度の高い地域から感染が広がった可能性が示唆された。ただし、これは陽

性者の居住地で推計したものであり、感染地域とは一概に一致しないため解釈には注意が必要であるが、第1波及び第2波で共通して観察されたことから、「三密の回避」や「ソーシャルディスタンス」といった「密」を避ける対策の有用性がマクロの視点から裏付けられた。

以上のことから、愛知県内の COVID-19 の流行は第1波・第2波共に人口が密集している都市部から郊外へ拡大していたことが考えられた。感染の様相を詳細に解析すると、第1波では拡大のスピードは緩やかで、感染経路が判明している陽性者が多く、比較的経路不明者は少なかったため、市中感染は限定的であったと考えられた。しかし、第2波では感染拡大期において流行曲線は急峻となっており、急激に感染拡大が起きていた。20~50歳代の経路不明者の割合は50%を超え、これらの年代の特に無症状者や軽症者を中心に市中感染が進行していたことが考えられた。

COVID-19 については、新たに発見されたウイルスであったことから、病原性、感染性等、未だ不明な部分が多く、今後も更なる知見の集積が必要である。今回の解析では、主に各自自治体から報道発表された資料

を利用し疫学的解析を試みたため、十分なデータからの解析には至っていない。しかし、厚生労働省が2020年5月29日¹³⁾に新型コロナウイルス感染者等情報把握・管理支援システム（HER-SYS）を整備し、本格的な運用が開始されたことに伴い、今後は、HER-SYSにより提供される、より詳細な患者情報等のデータを利用し、解析を進める必要がある。

謝 辞

新型コロナウイルス対策に幅広く御協力いただきました医療機関、保健所を始め各関係機関の皆様に深謝いたします。

参考文献

- 1) 厚生労働省：新型コロナウイルス感染症
<https://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekkaku-kansenshou11/01-shitei-01.html>
- 2) 文部科学省：元文科初第1585号 通知
https://www.mext.go.jp/content/202002228-mxt_kouhou01-000004520_1.pdf
- 3) 内閣官房：新型コロナウイルス感染症緊急事態宣言
https://corona.go.jp/news/pdf/kinkyujitai_sengen_0407.pdf
- 4) 内閣官房：新型コロナウイルス感染症緊急事態宣言の区域変更
https://corona.go.jp/news/pdf/kinkyujitaisengen_gaiyou0416.pdf
- 5) 愛知県：新型コロナウイルス感染症愛知県緊急事態宣言
https://www.pref.aichi.jp/uploaded/life/316110_1222521_misc.pdf
- 6) 愛知県：新型コロナウイルス感染症愛知県緊急事態宣言
https://www.pref.aichi.jp/uploaded/life/316110_1222486_misc.pdf

- 7) 愛知県：愛知県新型コロナウイルス感染症感染拡大予防対策指針（第6回変更）
https://www.pref.aichi.jp/uploaded/life/316739_1225288_misc.pdf (accessed August 7, 2020)
- 8) 新型コロナウイルス感染症対策分科会（第8回）
<https://www.cas.go.jp/jp/seisaku/ful/bunkakai/corona8.pdf>
- 9) 新型コロナウイルス感染症対策分科会（第2回）
<https://www.cas.go.jp/jp/seisaku/ful/bunkakai/corona2.pdf>
- 10) Supinda Bunyavanich, Anh Do, Alfin Vicencio: Nasal Gene Expression of Angiotensin-Converting Enzyme 2 in Children and Adults. *Journal of American Medical Association* 323(23):2427-2429, 2020.
- 11) Lael M. Yonker, et al.: Pediatric Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2): Clinical Presentation, Infectivity, and Immune Responses. *The Journal of Pediatrics* 227:45-52, 2020.
- 12) Xi He, et al.: Temporal dynamics in viral shedding and transmissibility of COVID-19. *Nature Medicine* 26:672-675, 2020.
- 13) 厚生労働省：新型コロナウイルス感染者等情報把握・管理支援システム（HER-SYS）を活用した感染症発生動向調査について（2020年12月14日現在）；
<https://www.mhlw.go.jp/content/10900000/000635849.pdf>

Epidemiological features of novel coronavirus infection in Aichi Prefecture

Tomoya Nagase, Mizuna Nakamura, Hiroaki Yamamoto, Yoshihiro Yasui

The novel coronavirus infection (COVID-19), which was reported to be infected in Wuhan, China in December 2019 and became a worldwide epidemic in just a few months, has been reported in Aichi prefecture since mid-February. Since then, residents of the prefecture have been infected.

This time, each local government announced a press release on the novel coronavirus positive cases (hereinafter referred to as positive cases) confirmed from February 10, 2020 (the 7th week of 2020) to October 11 (the 41st week of 2020) of the residents of the prefecture.

From the information provided, we analyzed the features of the spread of infection in Aichi Prefecture.

As a result, it was considered that the COVID-19 epidemic in Aichi Prefecture had spread from the densely populated urban areas to the suburbs in both the first and second waves.

A detailed analysis of the aspect of infection revealed that in the first wave, the rate of spread was slow, there were many positive individuals whose infection route was known, and there were relatively few unknown routes, so community-acquired infection was limited.

However, in the second wave, the epidemic curve became steep during the period of spread of infection, and the spread of infection occurred rapidly.

In addition, the proportion of people in their 20s to 50s with unknown routes exceeded 50%, suggesting that community-acquired infection was progressing, especially among asymptomatic and mild symptoms in these age groups.

Key words : novel coronavirus infection (COVID-19), surveillance,
epidemiological features

調 査 研 究

愛知県で検出されたコクサッキーウイルス A6 型 (CV-A6) の解析

伊藤 雅、皆川洋子、安達啓一、廣瀬絵美、齋藤典子、齋藤友睦、中村範子、
安井善宏、佐藤克彦

要 旨

A 群コクサッキーウイルスは、感染症発生動向調査対象疾病の手足口病やヘルパンギーナの主な病原ウイルスの 1 つである。コクサッキーウイルス A6 型 (CV-A6) はヘルパンギーナの主要な病原ウイルスとして知られていたが、2008 年以降、国内外の手足口病患者からの検出が多数報告されている。本県で検出した CV-A6 の分子疫学解析の結果、臨床症状がヘルパンギーナから手足口病へ変化した 2009 年を境にウイルスの構造タンパク質領域、非構造タンパク質領域のいずれも別々のクラスターを形成しており、ウイルスの遺伝子変異が症状に影響を及ぼしている可能性が考えられた。手足口病の原因ウイルスは複数報告されるが、検出された CV-A6 の遺伝子解析の結果、検出数の多い年にクラスターが複数分類されることが明らかとなった。遺伝子解析により血清型別の情報だけでは把握することのできない国内、海外に由来する遺伝子性状の異なる複数の CV-A6 が県内に持ち込まれ、同時流行により患者数が増加する可能性が推測された。県民の CV-A6 抗体保有状況を調査した結果、保有率は比較的高く、また各年齢層において抗体価が高いことから、近年の CV-A6 流行により多くが抗体を獲得したと推測された。本県分離株の病原性を検討する目的でマウスに接種したところ病原性の異なる株の存在が明らかになった。今後の継続研究によりヒトにおける病原性指標となる抗原性の解析が期待される。

キーワード：感染症発生動向調査、コクサッキーウイルス A6 型 (CV-A6)、手足口病、ヘルパンギーナ

序 文

コクサッキーウイルス (CV) は、ピコルナウイルス科エンテロウイルスに属し、遺伝子型分類においては Enterovirus A に分類されるヒトの病原ウイルスである。1947 年にニューヨーク州コクサッキー地方のポリオ様麻痺の小児患者検体から乳のみマウスを用いてウイルス分離を試みた際に初めて検出された¹⁾。乳のみマウスに対する病原性の違いにより A 群、B 群に分類され、CV-A 群は全身の筋炎による弛緩性麻痺、CV-B 群は強直性麻痺 (痙攣麻痺) を起こす

ことが知られている²⁾。

CV は、エンテロウイルス 71 型 (EV-A71) とともに乳幼児を中心に夏季に流行する手足口病、ヘルパンギーナ等の主な原因ウイルスである。手足口病は口唇粘膜および手足の指先に現れる発疹症状を特徴とし、EV-A71、CV-A10、A16 が主な病原体として検出される。ヘルパンギーナは口腔粘膜に現れる水疱性発疹と発熱を特徴とする急性咽頭炎で CV-A2、4、5、6 の検出が多い。どちらも比較的予後良好なウイルス性疾患で、県内でも毎年流行している。

材料と方法

2009年頃から全国的に従来ヘルパンギーナの原因ウイルスであった CV-A6 が手足口病患者から検出報告されるようになり、愛知県でも 2011 年以降の手足口病患者検体から CV-A6 の検出が増加していた。CV-A6 が検出される症例は、しばしば非定型型手足口病と表現されるように従来と症状が異なり、高熱を伴うことが多く、手足口のみならず大腿部や臀部に水疱性発疹を認め、回復後に爪甲脱落症³⁾を認める例や、成人の症例⁴⁾も珍しくない。海外では 2008 年にフィンランド⁵⁾から最初の報告があり、2010 年に台湾⁶⁾、2012 年に米国⁷⁾等から CV-A6 による手足口病の流行が報告された。

感染症発生動向調査事業は 1981 年(昭和 56 年)に厚生省及び国立予防衛生研究所が主体となって正式に始まり、1999 年以降は感染症法(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(法律第 114 号))に基づき感染症の発生情報の正確な把握と分析、その結果の的確な提供・公開が感染症対策の基本となることを目的に、患者情報とともに病原体情報の収集が行われている。愛知県ではそれらに先立ち 1970 年代から同事業の基礎となる流行病原体の調査を開始しており、現在は同事業による 5 類定点把握対象疾患患者を中心に病原ウイルスの検査を実施し、その結果を愛知県感染症情報や年報等において定期的に報告している。そして、手足口病及びヘルパンギーナは、インフルエンザ等と並んで病原体検索の対象となっている。

本稿では 2005 年 4 月から 2019 年 3 月までの 15 年間に、同事業の病原体定点(名古屋市を除き中核市病原体定点を含む)より採取・搬入された検体から検出された CV-A6 に注目し、手足口病患者、ヘルパンギーナ患者由来株の遺伝子解析及び疫学解析を行った。

また、血清疫学解析を目的として、健康な一般県民における CV-A6 に対する抗体保有状況を調査した。さらに手足口病患者由来分離株の一部について、病原性解析を目的に乳のみマウスへの接種実験を行ったので、調査結果を報告する。

1. 検査検体

2005 年 4 月から 2019 年 3 月までに感染症発生動向調査事業において名古屋市を除く県内全保健所管内の病原体定点医療機関の協力を得て採取された感染症患者検体(糞便、咽頭ぬぐい液、尿、脳脊髄液、血清等)から検出され CV-A6 と同定された 495 件の検出株を検査対象とした。臨床診断名等は行政検査依頼票(患者個票)に記載されたデータを用いた。血清疫学解析には 2017 年の感染症流行予測調査事業への協力を得た、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にて採取された血清検体を用いた。

2. 検査方法

2. 1 細胞培養法

糞便は抗生物質(ペニシリン、ストレプトマイシン、アンフォテリシン B、ゲンタマイシン)及び 0.2% 牛血清アルブミン(BSA: bovine serum albumin)を添加した 2.5% veal infusion broth(Difco, USA)で 10% 乳剤とした後 10,000 rpm で、咽頭ぬぐい液及び尿は攪拌後 3,000 rpm で 15 分間遠心した。遠心上清 200 μ L、髄液、血清検体は未処理 50 μ L~200 μ L を 1 mL の 2% 牛胎児血清(FCS: fetal calf serum)添加 Eagle's minimum essential medium (MEM)培地で試験管培養した Vero 細胞、HeLa 細胞、RD 細胞に接種し、3~4 日毎に抗生物質及び 2% FCS を添加した MEM 培地を交換し、37°C で 2 週間観察培養した。エンテロウイルス様の細胞変性効果(CPE: cytopathic effect)が観察された場合、2 回凍結融解後、新しい培養細胞に接種し、さらに 2 週間観察培養し、CPE が観察された場合をウイルス分離陽性とした。ウイルス分離陽性の場合、国立感染症研究所から分与された CV-A6 抗血清を用い RD-A 細胞を用いた 96 穴マイクロプレート法による中和試験⁸⁾により同定した。

2. 2 遺伝子検出及び系統解析

患者検体から直接又は分離ウイルスから High Pure Viral RNA Kit (Roche, Germany)

を用いてウイルス RNA を抽出し、遺伝子検査のテンプレートとした。CV-A6 のカプシドタンパク質 VP1 遺伝子領域の検出には 189-222 プライマー⁹⁾を用いた One-step RT-PCR (Reverse transcription -polymerase chain reaction: 逆転写ポリメラーゼ連鎖反応) 法又は CODE-HOP VP1 RT-snPCR 法¹⁰⁾にて行った。カプシドタンパク質 VP4 遺伝子領域は MD91、EVP4、OL68 プライマー¹¹⁾を、非構造タンパク質 3D ポリメラーゼ遺伝子領域は CVA6-12-2F、14-3R、14-2F、15-2R プライマー¹²⁾を用いて遺伝子を増幅した。1.5%アガロースゲル電気泳動後、ethidium bromide 染色下にて増幅を確認した PCR 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にて塩基配列を決定した。データベース上に登録されている国内外分離株の遺伝子配列をもとに、MEGA ver. 7 を用いて近隣結合 (NJ: Neighbor-Joining) 法による分子系統解析を行った。

3. 血清疫学調査

2017 年の感染症流行予測調査事業において同意を得た 1 ヶ月～65 歳の健康な一般県民 198 名の血清を検体として用いた。2016 年 CV-A6 分離株 (100TCID₅₀) (TCID₅₀: 50% Tissue Culture Infectious Dose) と階段希釈した血清を 37℃、2 時間反応させ、RD-A 細胞を用いたマイクロプレート法で中和抗体価 (neutralizing antibody titer :NT) を測定し、抗体価 8 倍以上を陽性と判定した。

4. 乳のみマウス接種

臨床分離株のマウス病原性情報を得る目的で、病態の変化がみられた前後の手足口病患者由来 CV-A6 分離株 3 株 (表 1) について、50%組織培養感染量 (TCID₅₀) を決定のうえヒトヘルペスウイルスの発症病理研究において有用であった¹³⁾ 6 日齢 TNF 欠損マウス (TNF: 腫瘍壊死因子) 皮下に接種し、最長 21 日間観察して 50%致死量 (LD50) を決定した。動物実験の実施にあたっては、愛知県衛生研究所動物実験委員会の承認を得た。

結果と考察

1. 愛知県における CV-A6 検出状況

培養細胞による CV-A6 の分離は不可能ではないものの増殖性が低いため、分離培養法に並行してエンテロウイルス特異プライマーを用いた RT-PCR 法による遺伝子検出を実施した。2005 年から 2019 年の間に 495 件の CV-A6 が検出された。臨床診断名の内訳は手足口病 298 件、ヘルパンギーナ 133 件、不明発疹症 20 件、上気道炎 13 件、脳炎 5 件、不明熱 4 件、無菌性髄膜炎 3 件等であった (表 2)。期間内において 2006 年を除く全ての年に検出され、2 年毎、西暦の奇数年に多く検出される傾向が認められた (図 1)。2009 年以前は主にヘルパンギーナ患者から検出されていた CV-A6 が 2010 年以降は手足口病患者から検出されるようになり、手足口病患者とヘルパンギーナ患者比は 2009 年以前の約 1:5 (16 名: 84 名) から、2010 年以降は約 6:1 (282 名: 49 名) と逆転していた。

表1 手足口病由来CV-A6分離株の乳のみマウス皮下接種結果

接種CV-A6分離株	由来	log ₁₀ TCID ₅₀	100TCID ₅₀ 接種時の生存率(%)	1000TCID ₅₀ 接種時の生存率(%)
2017-10184	手足口病, 2017年	1.5	0(0/4)	0(0/5)
2017-10264	手足口病, 2017年	3.5	100(12/12)	33.3(2/6)
2007-10198	手足口病, 2007年	1.6	12.5(2/16)	ND

ND: not done

手足口病患者 298 名に注目すると、2010 年以降は臨床症状においても高熱や全身性の発疹の報告が多く、非定型型手足口病といわれる症状の報告が多かった。男女比は 2009 年以前は(16 名)3 : 1、2010 年以降は(282 名)2 : 1 であり、患者の年齢(不明 5 名を除く)は、2009 年以前は 0 歳～5 歳(2 歳以下 62.5%)であったが、2010 年以降は 0 歳～30 歳(2 歳以下 74.1%、6 歳以上 6.5%)であり、患者個票に保護者に発疹症状があると記載される症例もあった。(データ非掲載)

2. CV-A6 株の遺伝子解析

調査期間内に検出された CV-A6 株 188 株のカプシドタンパク質 VP4 領域一部の遺伝子塩基配列に基づいた分子系統樹を図 2 に示した。検出株は 2009 年前後で大きく 2 つのクラスター(グループ A、B)を形成しており、2010 年以降に検出された手足口病患者由来の多くの株は 2008 年にフィンランドで最初に報告された非定型型手足口病由来株(©Finland2008-KM114057)と同じグループ A に分類され、2009 年以前の検出株はグループ B に分類された。2009 年の手足口病由来株(→)、2010 年のヘルパンギーナ由来株(⇒)はどちらのグループからも検出されていたが、VP4 領域 650 塩基配列ではグループ間に 9%の相違があり、推定アミノ酸配列の比較では 5 カ所(8、16、20、60、64)に置換が認められた(データ非掲載)。グループ内では年毎にサブグループを形成する傾向にあったが、多くは国外や国内から前年又は同年に検出された株に近縁であった。また、系統樹上で手足口病由来株、ヘルパンギーナ由来株を特徴づける所見は認められなかった。2019 年は手足口病患者から CV-A6 以外に EV-A71、CV-A16、CV-A10 が検出され、調査期間中最大の流行を示した。2019 年に注目すると検出株は全てグループ A に属していたが、A1、A2、A3 で示すサブグループを形成していた。

表2 CV-A6が検出された臨床診断名の内訳

検出期間	2005年～ 2019年	2005年～ 2009年	2010年～ 2019年
手足口病	298 (60%)	16 (14%)	282 (74%)
ヘルパンギーナ	133 (27%)	84 (74%)	49 (13%)
発疹症	20 (4%)	4 (4%)	16 (4%)
上気道炎	13 (3%)	3 (3%)	10 (3%)
脳炎	5 (1%)	3 (3%)	2 (0.5%)
不明熱	4 (0.8%)	1 (0.8%)	3 (0.8%)
無菌性髄膜炎	3 (0.6%)	1 (0.8%)	2 (0.5%)
その他	19 (3.8%)	1 (0.8%)	18 (5%)
計	495 (100%)	113 (100%)	382 (100%)

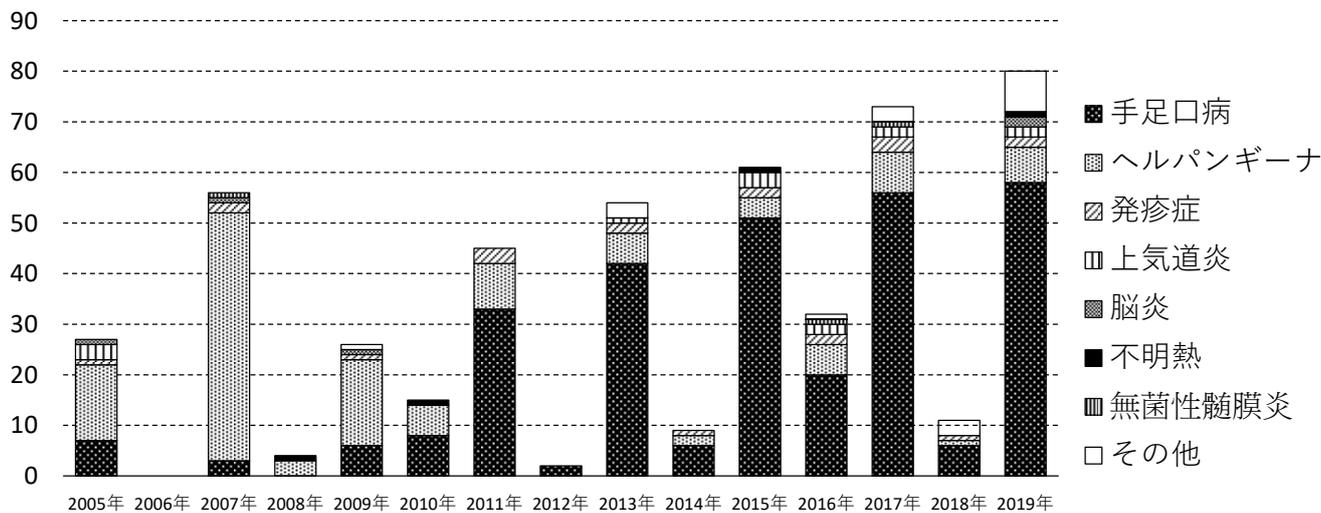


図1 年別検出状況

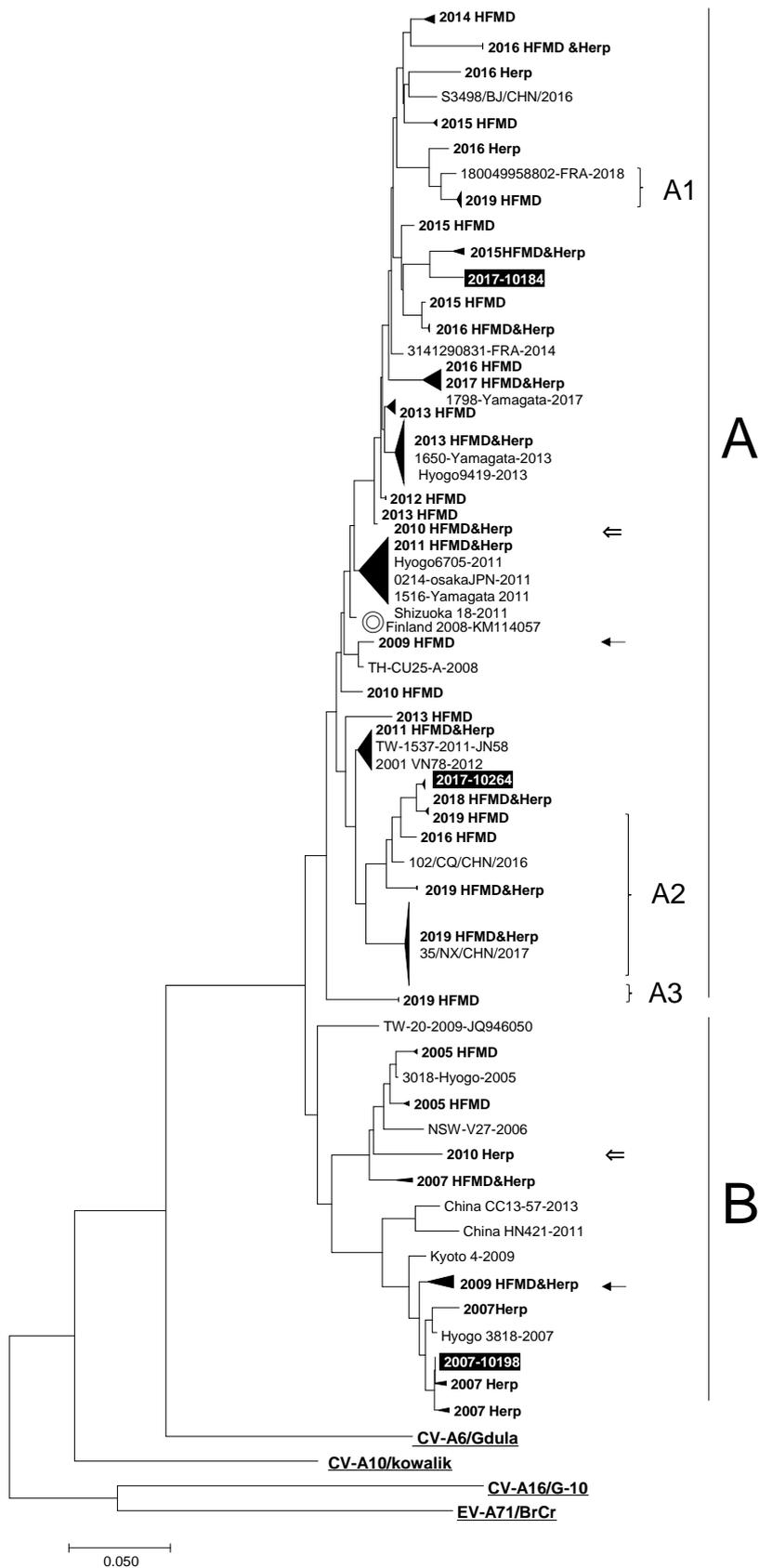


図2 VP4領域の分子系統樹

検出株は手足口病検出株：検出年 HFMD、ヘルパンギーナ検出株：検出年 Herpと表示した。
 検出年が同一の場合は ▲ でまとめ、系統樹における相対距離を横方向に検出数を縦方向の大き
 さで示した。下線：標準株、白抜き：手足口病患者由来マウス接種株（検出年-検体番号）

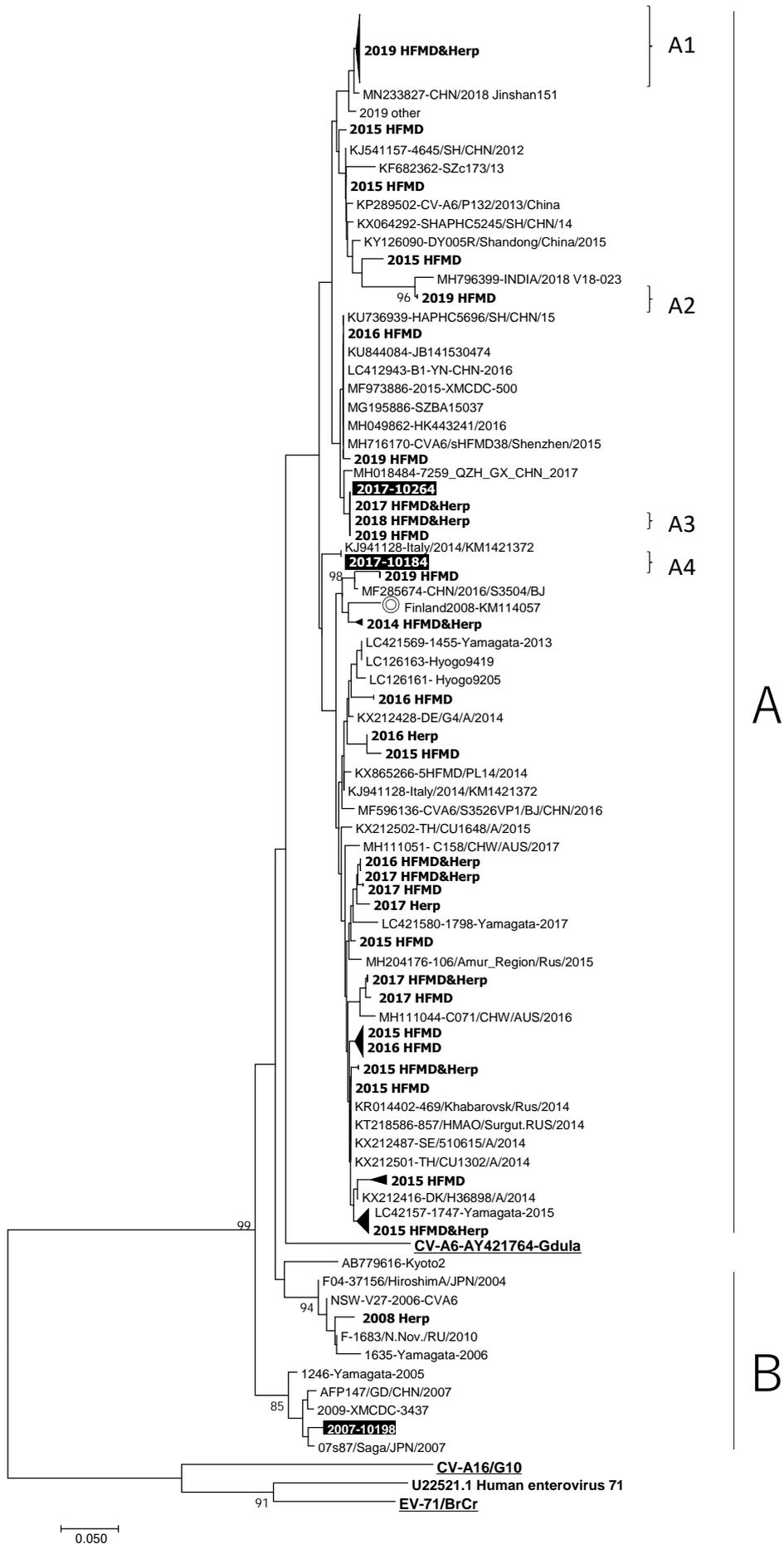


図3 VP1領域の分子系統樹

次に遺伝子の変異が多く抗原性の決定に関係するといわれているカプシドタンパク質 VP1 領域の一部増幅を確認した 154 株の遺伝子塩基配列に基づいた分子系統樹を図 3 に示した。VP4 領域の分子系統樹と同様に 2009 年以前と 2010 年以降で 2 つのクラスター（グループ A、B）を形成し、年毎にサブグループを形成していた。2019 年に注目すると 4 つのサブグループに分類され、A1 は CHN2018(中国)に 98.9~99.7%、A2 は IND2018(インド)に 98.3%、A3 は CHN2017 に 99.7~100%、A4 は CHN2016 に 98.7%類似性の株がそれぞれ複数例検出されていた。

VP4 領域、VP1 領域の分子系統樹から CV-A6 については同じ遺伝子型に属するウイルス同士でも遺伝子的相違が認められることから、本県への侵入経路が多岐に渡り、諸外国の流行株の影響を受けて流行の拡大の一因になっていると思われる。

さらに、VP4 領域と VP1 領域の系統解析で別グループに属する株について病原性指標に関する検討のため、RD-A 細胞での増殖後に乳のみマウスへの接種実験が可能なウイルス力価が得られた 3 株（白抜き：2017-10184 株、2017-10264 株、2007-10198 株）を代表株として選出した（図 2、3）。この 3 株について 3D ポリメラーゼ遺伝子塩基配列に基づいた分子系統樹を図 4 に示した。3D 領域でも別々のグループに属しており、類似性の高い株との比較に基づいて組換えウイルス株ではないと推測された。

3. CV-A6 に対する抗体保有状況

移行抗体の影響が否定できない 6 ヶ月未満の 3 名のうち 1 名（33.3%）が陽性であった。7 ヶ月～2 歳は 36.4%、3 歳以上では、25 歳～29 歳の 33.3%を除き、57.1%～90.5%であった（図 5）。幼児～学童期の年齢階層では陽性者の 7 割以上が 64 倍以上抗体価を示した。抗体保有率は比較的高く、また各年齢層において抗体価が高いことから、近年の CV-A6 流行により県民の多くが抗体を獲得したと推測された。感染に注意すべき年齢は、流行の周期から感染の機会の少ない 3 歳未満の乳幼児であり、症状

の重篤度に注意が必要であると考えられた。

4. 乳のみマウスへの接種

手足口病の臨床症状が変化した前後の手足口病患者から分離された CV-A6 の代表株（2007 年 1 株、2017 年 2 株）を 6 日齢 TNF 欠損マウス皮下に接種し 50%致死量（LD50）を指標に病原性の比較を行った。接種後 21 日間毎日生死を観察したところ、死亡は 4-14 日の間に発生した。VP4、VP1、3D 領域の分子系統解析においてグループ A の中でも別々のサブグループに属する（2017-10184 株、2017-10264 株）2 株の間に、50%培養細胞感染価（TCID50）を指標とした LD50 において約 100 倍（log10 で 2）の差が認められ、2017-10184 株はマウスに対する強毒株と考えられた。また、分子系統解析でグループ B に属していた 2007 年分離株（2007-10198 株）は 2017 年強毒株（2017-10184 株）と同等の病原性を示した（表 1）。

LD50 の異なる接種株について解析可能な VP1、VP4、3D 領域の推定アミノ酸の比較を行ったが、強毒株に特有の配列は同定できなかった。（データ非掲載）

遺伝子レベルの解析を継続するとともに、遺伝子解析だけでは病態の比較は困難であることからマウス体内のウイルス伝播及び臓器別分布など発症病理に関するさらなる解析は、今後の調査課題と考えている。

エンテロウイルスの遺伝子構造は VP1～VP4 領域からなる構造カプシドタンパク質をコードする P1 と、2A～2C、3A～3D 領域を含む非構造タンパク質をコードする P2、P3 の 3 つの領域に分けられる。エンテロウイルスは伝播の過程で次第に変異を起しやすいたことが知られている。中国上海市で手足口病患者から検出された CV-A6 リコンビナント株は、2C 領域で CV-A4 との組換え株であると解析されており、臨床的に発疹の程度に差がみられたことが報告されている¹⁴⁾。また、中国広州市では、小児の軽度および重度の手足口病から検出された CV-A6 の遺伝子解析の結果、VP1 領域の V174I 及び T283A のアミノ酸変異が重症度に関連していたことも報告されている¹⁵⁾。兵庫県

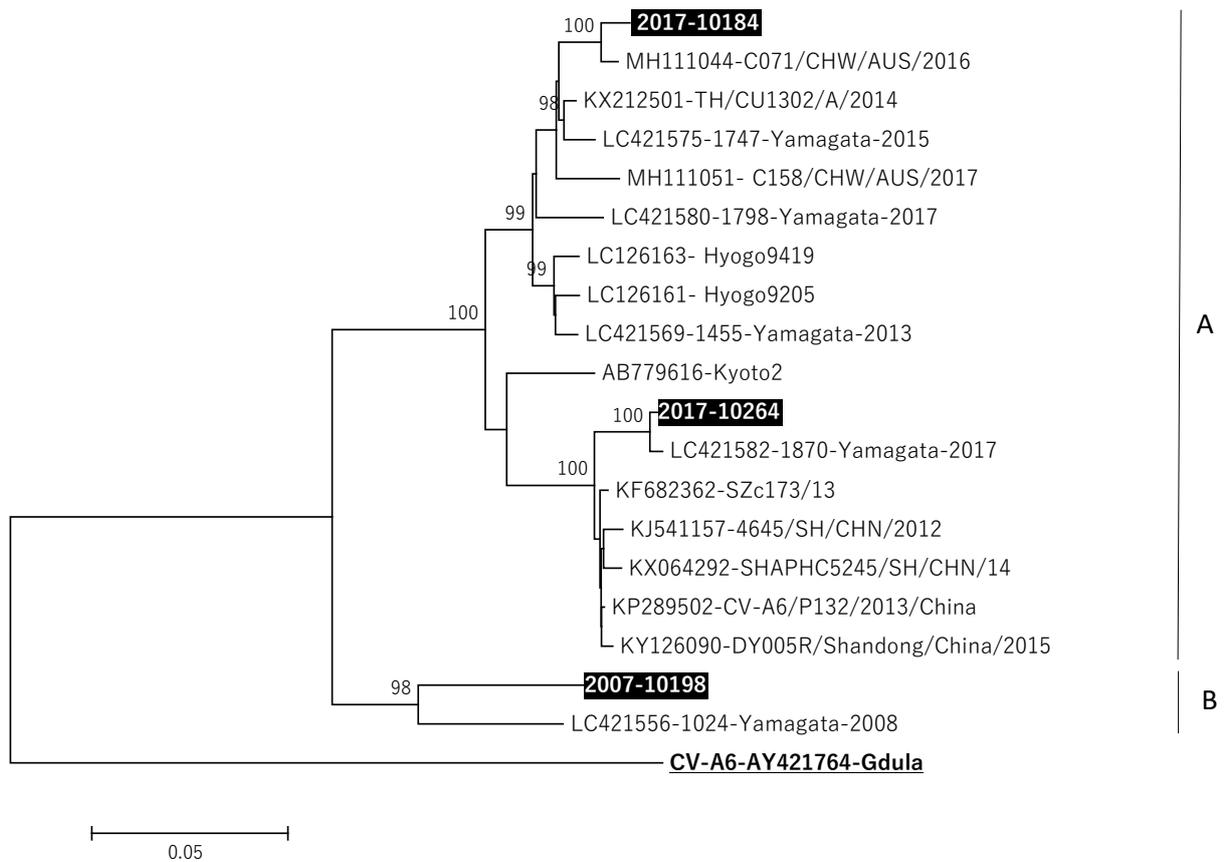


図4 3Dポリメラーゼ領域の分子系統樹

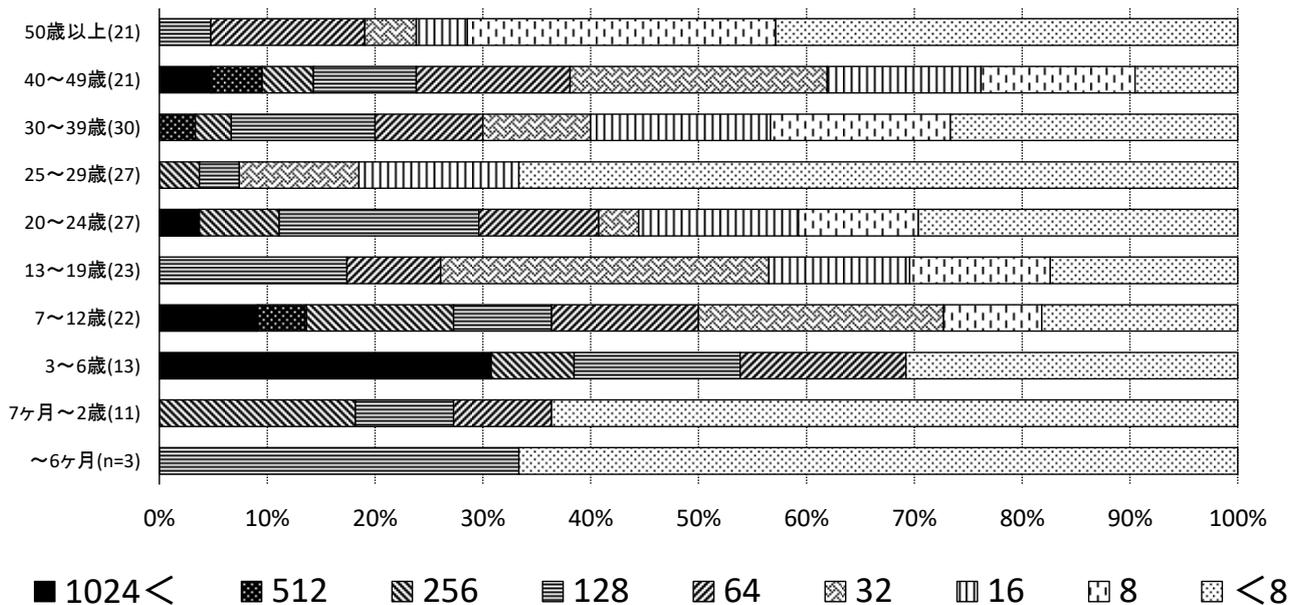


図5 CV-A6の年齢階層別抗体保有状況

は 1999 年～2013 年までに検出された CV-A6 株が 2009 年前後で別々のクラスターを形成することを報告しており、クラスター間で明確に異なるアミノ酸は 17 残基あり、この変異と臨床症状の関連性を推測している¹²⁾。本県の分離株でも解析できた VP4 の 2 残基と 3D の 6 残基について、同じアミノ酸置換が検出されていた（データ非掲載）。ヒト及びマウスでの病態変化の特徴において、分子系統解析に反映されない 1 塩基置換など僅かなゲノム遺伝子変異が病原性に関与する例は他のエンテロウイルスで報告があり¹⁶⁾、CV-A6 についても可能性は否定できない。ヒト中枢神経症状の報告が多い EV-A71 のみならず CV-A6 による重症感染症の流行が日本国内でも発生するリスクを考えると、手足口病やヘルパンギーナなどを指標とするピコルナウイルス感染症の病原体サーベイランスは今後も継続する必要がある。

5. 総括及び今後の展望

CV-A6 は 2009 年以前には主にヘルパンギーナ患者から検出されていたが、2009 年以降、本県を含め全国的に非定型手足口病患者から検出されるようになった。本県の患者由来株の遺伝子系統解析でも 2009 年前後で異なるグループを形成する方向に変化していることが明らかになっている。どちらのグループでも手足口病、ヘルパンギーナ両疾患患者から検出される CV-A6 は類似性が高く、解析した領域の塩基配列及び推定アミノ酸配列からは両疾患の病態の差に関連する特定の遺伝子変異は解明できていない。CV-A6 を原因とする感染病態の変化が国内のみならず、海外からも報告されていることから、宿主側よりもウイルス側に要因があると推測している。マウスへの接種実験結果からは、CV-A6 株間で致死接種量に 100 倍の差が認められた。今後は、各種臓器のウイルス増殖解析等を行い、病原性の決定因子の探求を試みたい。CV-A6 をはじめとするエンテロウイルス感染症病態変化の探知や変異ウイルスの解明には臨床検体からのウイルス分離培養の継続が不

可欠である。引き続き病原性の変化に関与する可能性のあるウイルス遺伝子の変異を解析し、県民への注意喚起、情報提供に努めていきたい。

謝 辞

愛知県内の定点医療機関、豊橋市、岡崎市及び豊田市を含む愛知県の各保健所、愛知県感染症対策局感染症対策課の皆様には感謝いたします。

参考文献

- 1) Dalldorf G, Sickles GM: An unidentified, filterable agent isolated from the feces of children with paralysis. *Science* 108:61-63, 1948.
- 2) Pallansch MA, Oberste MS, Whitton JL: Enteroviruses: Polioviruses, Coxsackieviruses, Echoviruses, and newer enteroviruses. *Fields Virology 6th edition* (Knipe DM, Howley PM eds):490-530, 2015.
- 3) 志水哲也、志水麻実子、渡辺まどか: 2013 年～2017 年の 5 年間に経験した手足口病の検討. 小牧医報別冊 第 41 号 2018.
- 4) 中田恵子、山崎謙治、加瀬哲男: コクサッキーウイルス A6 型による手足口病の成人例－大阪府. *病原微生物検出情報* 32(8):231, 2011.
- 5) Osterback R, Vuorinen T, Linna T, Susi P, Hyypia T, Waris M: Coxsackievirus A6 and hand, foot, and mouth disease, Finland. *Emerging Infectious Diseases* 15(9):1485-1488, 2009.
- 6) Chen YJ, Chang SC, Tsao KC, Shih SR, Yang SL, Lin TY, Huang YC: Comparative Genomic Analysis of Coxsackievirus A6 strains of different clinical disease entities. *PLoS ONE* 7(12):e52432, 2012.
- 7) McIntyre MG, Stevens KM, Davidson S et al.: Severe hand, foot, and mouth disease associated with Coxsackievirus A6-Alabama, Connecticut, California, and Nevada, November 2011-February 2012. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 61(12):213-214, 2012.

- 8) Schmidt NJ, Lennette EH, Ho, HH: An apparently new enterovirus isolated from patients with disease of central nervous system. *Journal of Infectious Diseases* 129:304-309, 1974.
- 9) Oberste MS, Maher K, Flemister MR, Marchetti G, Kilpatrick DR, Pallansch MA: Comparison of classic and molecular approaches for the identification of untypeable enterovirus. *Journal of Clinical Microbiology* 38(3):1170-1174, 2000.
- 10) Nix WA, Oberste MS, Pallansch MA: Sensitive, seminested PCR amplification of VP1 sequences for direct identification of all enterovirus serotypes from original clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology* 44(8):2698-2704, 2006.
- 11) Ishiko H, Shimada Y, Yonaha M, Hashimoto, O, Hayashi A, Sakae K, Takeda N: Molecular diagnosis of human enteroviruses by phylogeny-based classification by use of the VP4 sequence. *Journal of Infectious Diseases* 185:744-754, 2002.
- 12) Ogi M, Yano Y, Chikahira M, Takai D, Oshibe T, Arashiro T, Hanaoka N, Fujimoto T, Hayashi Y: Characterization of genome sequences and clinical features of Coxsackievirus A6 strains collected in Hyogo, Japan in 1999-2013. *Journal of Medical Virology* 89(8):1395-1403, 2017.
- 13) Minagawa H, Hashimoto K, Yanagi Y: Absence of tumor necrosis factor facilitates primary and recurrent herpes simplex virus-1 infections. *Journal of General Virology* 85(2):343-347, 2004.
- 14) Feng X, Guan W, Guo Y, et al.: A novel recombinant lineages contribution to the outbreak of coxsackievirus A6-associated hand, foot and mouth disease in Shanghai, China, 2012-2013. *Scientific Reports* (5):1-12, 2015.
- 15) Yang X, Li Y, Zhang C, et al.: Clinical features and phylogenetic analysis of severe hand-foot-and-mouth disease caused by Coxsackievirus A6. *Infection, Genetics and Evolution* 77, DOI:10.1016/j.meegid.104054 (2019)
- 16) Fujii K, Sudaka Y, Takashino A, et al.: VP1 amino acid residue 145 of enterovirus 71 is a key residue for its receptor attachment and resistance to neutralizing antibody during cynomolgus monkey infection. *Journal of Virology* 92(15):e00682-18, 2018.

Virological analysis of Coxsackie virus A6 detected in Aichi Prefecture

Miyabi Ito, Hiroko Minagawa, Hirokazu Adachi, Emi Hirose, Noriko Saito,
Tomochika Saito, Noriko Nakamura, Yoshihiro Yasui, Katsuhiko Sato

Coxsackieviruses group A are major pathogens of hand, foot and mouth disease (HFMD) and herpangina, both of which are subjected to sentinel-based patient and pathogen surveillances based on National Epidemiological Surveillance of Infectious Diseases (NESID) program. Since 2008, detection of Coxsackie virus A6 (CV-A6) from HFMD patients is frequently reported. Molecular epidemiological analyses of CV-A6 genes detected from specimens collected in Aichi Prefecture revealed that both structural and non-structural protein coding regions formed distinct clusters before and after 2009 (when the major disease manifestations caused by CV-A6 switched from herpangina to HFMD in Aichi Prefecture). These results suggested the possibility that mutations of CV-A6 affected the disease manifestations. The analyses of virus genes also revealed the presence of more than one clusters per year in the years with many patients. They enabled the recognition of different viruses which belong to the same serotype and further suggested the simultaneous circulation of different foreign viruses that had arrived to Aichi Prefecture resulted in the increase of patients. Serological analyses of residents revealed the relatively high rates of seropositivity against CV-A6 throughout all age groups, and suggested the recent epidemic in Aichi Prefecture. Existence of virus isolates with different pathogenicity in mice implies possible different pathogenicity in humans, and rationalizes further studies on changes in pathogenicity and antigenicity of CV-A6 isolates.

Key words : surveillance, Coxsackievirus A6 (CV-A6), Hand, foot and mouth disease,
Herpangina

調 査 研 究

黄色ブドウ球菌の毒素遺伝子保有状況と分子疫学解析への適用

山田和弘、松田達也、續木洋一、佐藤克彦

要 約

黄色ブドウ球菌は毒素性食中毒の起因菌であり、原因毒素はブドウ球菌エンテロトキシン(staphylococcal enterotoxins、SEs)である。通常の食中毒検査においてはSEA、SEB、SEC、SED、SEEの5型(古典的SEs)を検査するのが一般的である。近年、ゲノム解析の進展に伴ってSEsと類似する遺伝子(staphylococcal enterotoxin-like(SE1)、新型SEs遺伝子)の存在が明らかにされてきた。今回、当所保存の黄色ブドウ球菌を用いて、SE/SE1遺伝子保有状況を調査するとともに、SE/SE1遺伝子保有パターンとS. aureus PCR-based ORF typing(SA-POT)法を比較することで、SE/SE1遺伝子保有パターンが菌株識別法として利用可能であるかを検討した。黄色ブドウ球菌111株は30 SE/SE1遺伝子保有パターン(D index0.874)に識別され、最大8種類のSE/SE1遺伝子が検出された。一方、SA-POT法では黄色ブドウ球菌111株は79遺伝子型(D index0.990)に分類され、菌株識別能力はSA-POT法がSE/SE1遺伝子検出法よりも高かった。SE/SE1遺伝子検出法単独での菌株識別法としての利用は難しいと考えられたが、SA-POT法で同一遺伝子型と判定された株のSE/SE1遺伝子保有パターンが異なっている場合もあったため、SE/SE1遺伝子検出法は補助的な菌株識別法としての利用は可能であると考えられた。

キーワード：黄色ブドウ球菌、ブドウ球菌エンテロトキシン遺伝子、
Cica Geneus Staph POT KIT

序 文

黄色ブドウ球菌は毒素性食中毒の起因菌であり、日本における細菌性食中毒の中ではカンピロバクターに次いで多く、サルモネラと並んで年間10%前後の発生件数を占めている¹⁾。食中毒原因菌として黄色ブドウ球菌を同定するためには、毒素産生性の確認及び常在菌として存在する黄色ブドウ球菌との菌株識別が重要となる。黄色ブドウ球菌食中毒の原因毒素はブドウ球菌エンテロトキシン(staphylococcal enterotoxins、SEs)であり、SEsは複数の型が存在することが知られている。通常の食中毒検査においては、市販キットにより産生性の確認が可能な

SEA、SEB、SEC、SED、SEEの5型(古典的SEs)を検査するのが一般的である。しかし、近年ブドウ球菌の遺伝子解析・ゲノム解析の進展に伴って従来から知られていたSEsと類似する遺伝子の存在が次々と明らかにされ、新型SEsとして報告された²⁾。命名規約³⁾によれば、SEsと類似した蛋白質で、スーパー抗原活性を有し、さらに霊長類への経口投与により嘔吐活性が証明されたものを「SE」と命名し、霊長類の嘔吐実験で嘔吐活性陰性のもの、あるいは未だ嘔吐実験が行われていないものは「staphylococcal enterotoxin-like(SE1)」と命名することとなっている。現在までにSEG、SEH、SEI、SE1J、SEK、SEL、SEM、SEN、SEO、

SEP、SEQ、SER、SES、SET、SE1U、SE1V、SE1W、SE1X、SE1Y、SE1Z、SE126 及び SE127 の 22 型 (新型 SEs) が報告されており^{4, 5, 6, 7)}、SE/SE1 遺伝子検出 PCR^{2, 8)} も開発されている。

また、黄色ブドウ球菌は生活環境中に常在菌として存在し、健康者の鼻腔、咽頭、腸管等にも生息している⁹⁾。そのため、食中毒発生時の検査の際に常在菌が検出されることが多く、食中毒原因菌と判別するために、コアグラーゼ型別やパルスフィールドゲル電気泳動 (Pulsed-Field Gel Electrophoresis : PFGE) 法による菌株の識別が行われる。当所では、これまでにメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* : MRSA) の集団感染時に容易に分子疫学解析を実施可能とすることを目的に開発された *S. aureus* PCR-based ORF typing (SA-POT) 法が、メチシリン感受性黄色ブドウ球菌 (MSSA) に対しても、実用可能な菌株識別能があることを報告してきた¹⁰⁾。

そこで今回、当所で保存されている食中毒関連検体から検出された黄色ブドウ球菌を用いて、黄色ブドウ球菌の SE/SE1 遺伝子保有状況を調査するとともに、SE/SE1 遺伝

子保有パターンと SA-POT 法を比較することで、SE/SE1 遺伝子保有パターンが菌株識別法として利用可能かの検討を行った。

材料及び方法

供試菌株 : 2011 年から 2020 年に食中毒関連調査から分離された黄色ブドウ球菌 111 株 (ヒト糞便由来 102 株、食品由来 6 株、ふきとり検体由来 3 株) を用いた。また、111 株のうち 2 株は黄色ブドウ球菌が原因とされた食中毒事例から 1 株を代表株 (2 事例からヒト糞便由来 2 株) として抽出した。DNA 抽出 : シカジーニクス® DNA 抽出試薬 (関東化学、東京) を添付文書に従い使用した。

SE/SE1 遺伝子検出法: QIAGEN Multiplex PCR Kit (QIAGEN、ドイツ) を使い、2×マスターミックス 7.5 μL、プライマーミックス 0.3 μL (最終濃度 0.2 μM each)、蒸留水 5.2 μL を混合し、テンプレートに 2 μL 加え、95°C 15 分間ののち、94°C 30 秒、57°C 90 秒、72°C 60 秒のサイクルを 35 回繰り返し、最後に 72°C 10 分の伸長反応を行った。プライマーミックスは文献 1 に従い、調製した (表 1)。

表1 SE/SE1 遺伝子検出PCRのprimer*

target gene	primer name	sequence (5' -3')	product size(bp)	Primer mix No.	target gene	primer name	sequence (5' -3')	product size(bp)	Primer mix No.
<i>femB</i> **	femB1	TTACAGAGTAACTGTTACC	651		<i>sei</i>	SEI-1	GGTGATATTGGTGTAGGTAAC	454	
	FemB2	ATACAAATCCAGCAGCTCT				SEI-2	ATCCATATCTTTGCCTTTACCAG		
<i>seb</i>	SEB-1	TCGCATCAAACGACAAACG	477		<i>sep</i>	44077	TGATTTATTAGTAGACCTTGG	396	
	SEB-4	GCAGGTACTCTATAAGTGCCTGC				44078	ATAACCAACCGAATCACCAG		
<i>sed</i>	SED-3	CTAGTTTGGTAATATCTCCTTTAAACG	319	1***	<i>seg</i>	SEG-1	AAGTAGACATTTTTGGCGTTCC	287	2
	SED-4	TTAATGCTATATCTTATAGGGTAAACATC				SEG-2	AGAACCATCAAACCTCGTATAGC		
<i>sec</i>	SEC-3	CTCAAGAAGTACAGATAAAAGCTAGG	271		<i>seh</i>	SEH-1	GTCTATATGGAGGTACAACACT	213	
	SEC-4	TCAAAATCGGATTAACATTATCC				SEH-2	GACCTTACTTATTTGCTGCTGC		
<i>see</i>	SEE-3	CAGTACCTATAGATAAAGTTAAACAAGC	178		<i>selj</i>	SEJ-1	ATAGCATCAGAAGTGTGTTCCG	152	
	SEE-2	TAACCTACCGTGGACCCTTC				SEJ-2	CTTCTGAATTTTACCACCAAAGG		
<i>sea</i>	SEA-3	CCTTTGGAAACGGTTAAACG	127		<i>femA</i> **	femA1	AAAAAAGCACATAACAAGCG	134	
	SEA-4	TCTGAACCTTCCCATCAAAAAC				FemA2	GATAAAGAAGAAACCAGCAG		
<i>tstI</i>	TST-3	AAGCCCTTGTGTGCTTGCG	447		<i>femB</i> **	femB1	TTACAGAGTAACTGTTACC	651	
	TST-6	ATCGAACTTTGGCCATACTTT				FemB2	ATACAAATCCAGCAGCTCT		
<i>sem</i>	SEM-1	GGATAATTCGACAGTAACAG	379		<i>sel</i>	SEL-1	TAACGGCGATGTAGGTCAGG	383	
	SEM-2	TCCTGCATTAATCCAGAAC				SEL-2	CATCTATTTCTGTGCGGTAAC		
<i>sek</i>	SEK-1	TAGGTGTCTCTAATAATGCCA	293	3	<i>sen</i>	SEN-1	TATGTTAATGCTGAAGTAGAC	282	4
	SEK-2	TAGATATTCGTTAGTAGCTG				SEN-2	ATTTCCAAAATACAGTCCATA		
<i>seo</i>	SEO-1	TGTGTAAGAAGTCAAGTGATG	214		<i>ser</i>	SER-1	GGATAAAGCGGTAATAGCAG	166	
	SEO-2	TCTTTAGAAATCGCTGATGA				SER-4	GTATTTCCAAACACATCTAAC		
<i>femA</i> **	femA1	AAAAAAGCACATAACAAGCG	134		<i>seq</i>	SEQ-1	AATCTCTGGTCAATGGTAAGC	122	
	FemA2	GATAAAGAAGAAACCAGCAG				SEQ-2	TTGTATTCTGTTTGTAGTATTTTCG		

* Omoe K et al. FEMS Microbiol Lett, 246, 191-198, 2005.

** *femA* 及び *femB* 遺伝子は黄色ブドウ球菌特異的の遺伝子であり、内部陽性対照として組み込まれている。

*** 古典的SEsはPrimer mix1に含まれている。

PCR 反応終了後、4%KANTO HC（短フラグメント用）（関東化学、東京）を用い 120 V 70 分間電気泳動を行い、エチジウムブロマイドで染色後、増幅産物の有無を確認することで判定した。

SA-POT 法：Cica Geneus Staph POT Kit（関東化学、東京）を用いた。PCR 反応終了後、4%KANTO HC（短フラグメント用）（関東化学、東京）を用い 120 V 70 分間電気泳動を行い、エチジウムブロマイドで染色した。増幅産物の有無から添付文書に従い POT 型の値を算出し、3 つの数値全てが一致した場合を同一遺伝子型と判定した。

SE/SEI 遺伝子検出法、SA-POT 法ともに D index¹¹⁾ を算出した。D index とは互いに関連のない 2 株をタイピングしたときに異なる株であると判定される確率である。

結 果

SE/SEI 遺伝子分布状況（表 2）：黄色ブドウ球菌 111 株中、SE/SEI 遺伝子を 1 遺伝子以上保有していたのは 78 株（70.3%）であり、最大 8 種類の SE/SEI 遺伝子（*sed*、*seg*、*sei*、*selj*、*sem*、*sen*、*seo* 及び *ser* 遺伝子）を保有していた。SE/SEI 遺伝子の保有パターンは「検出せず」を含めて 30 パターン検出され、最も多く検出された保有パターンは *seg*、*sei*、*sem*、*sen* 及び *seo* 遺伝子保有株（16 株）で、次いで *sea* 遺伝子単独保有株（14 株）であった。古典的 SEs 遺伝子のみ保有していたのは 14 株（全て *sea* 遺伝子単独保有株）あり、*see* 遺伝子保有株は検出されなかった。また、新型 SEs 遺伝子のみを保有していたのは 37 株あり、そのうち 29 株は *seg* 遺伝子を、27 株は *sei* 遺伝子を保有していた。*sec* 遺伝子と *sel* 遺伝子（10 株）、*sek* 遺伝子と *seq* 遺伝子（6 株）、*selj* 遺伝子と *ser* 遺伝子（4 株）の保有状況は合同であった。

SA-POT 法（表 3）：黄色ブドウ球菌 111 株は SA-POT 法で 79 遺伝子型に分類された。最も多く検出された POT 型は 0-51-9 及び 4-26-0（それぞれ 6 株ずつ）であった。メチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）判定用遺伝子が含まれる POT1 のバンドが 1 本も

表2 SE/SEI 遺伝子型保有状況

SE/SEI 遺伝子型	株数
<i>sea</i>	14
<i>sea</i> , <i>sec</i> , <i>sel</i>	2
<i>sea</i> , <i>sed</i> , <i>selj</i> , <i>ser</i>	1
<i>sea</i> , <i>seg</i>	2
<i>sea</i> , <i>seg</i> , <i>sei</i>	2
<i>sea</i> , <i>seg</i> , <i>sei</i> , <i>sen</i>	1
<i>sea</i> , <i>seh</i> , <i>sek</i> , <i>seq</i>	2
<i>seb</i> , <i>sed</i> , <i>selj</i> , <i>ser</i>	1
<i>seb</i> , <i>seg</i> , <i>sei</i> , <i>sem</i>	2
<i>seb</i> , <i>seg</i> , <i>sei</i> , <i>sem</i> , <i>sen</i> , <i>seo</i>	1
<i>seb</i> , <i>sek</i> , <i>sep</i> , <i>seq</i>	2
<i>seb</i> , <i>sep</i>	2
<i>sec</i> , <i>seg</i> , <i>sei</i> , <i>sel</i> , <i>sem</i> , <i>sen</i> , <i>seo</i>	3
<i>sec</i> , <i>sek</i> , <i>sel</i> , <i>sep</i> , <i>seq</i>	1
<i>sec</i> , <i>sel</i>	1
<i>sec</i> , <i>sel</i> , <i>sep</i>	3
<i>sed</i> , <i>seg</i> , <i>sei</i> , <i>selj</i> , <i>sem</i> , <i>sen</i> , <i>seo</i> , <i>ser</i>	1
<i>seg</i>	2
<i>seg</i> , <i>sei</i>	2
<i>seg</i> , <i>sei</i> , <i>selj</i> , <i>sem</i> , <i>sen</i> , <i>seo</i> , <i>ser</i>	1
<i>seg</i> , <i>sei</i> , <i>sem</i>	1
<i>seg</i> , <i>sei</i> , <i>sem</i> , <i>sen</i>	4
<i>seg</i> , <i>sei</i> , <i>sem</i> , <i>sen</i> , <i>seo</i>	16
<i>seg</i> , <i>sei</i> , <i>sem</i> , <i>sen</i> , <i>seo</i> , <i>sep</i>	2
<i>seg</i> , <i>sen</i>	1
<i>seh</i>	2
<i>sei</i>	1
<i>sek</i> , <i>seq</i>	1
<i>sep</i>	4
検出せず	33
合計	111

下線は古典的SEs

表3 SA-POT法の遺伝子型

POT型	株数	POT型	株数
0-10-16	3	4-0-80	1
0-1-1	3	4-136-80	1
0-113-17	1	4-158-104	2
0-131-1	1	4-186-112	1
0-17-65	1	4-186-116	1
0-2-17	2	4-24-32	3
0-2-2	1	4-26-0	6
0-248-80	1	4-26-48	1
0-25-80	1	4-28-0	1
0-29-18	1	4-28-96	1
0-3-1	4	4-29-112	1
0-51-9	6	4-30-56	1
0-59-112	1	4-47-112	1
0-59-113	1	4-58-0	1
0-59-92	1	4-60-120	1
0-6-2	2	4-80-99	1
0-73-53	2	4-8-16	1
0-8-112	1	4-8-2	1
0-8-2	1	4-8-80	1
0-8-80	3	4-88-33	1
0-9-113	1	4-9-80	1
0-9-16	1	6-0-64	2
0-9-84	1	6-136-120	1
2-1-0	4	6-138-65	1
2-10-4	1	6-152-34	1
2-1-13	1	6-156-66	1
2-137-80	1	6-178-40	1
2-145-1	1	6-18-1	3
2-146-2	1	6-186-104	1
2-17-0	1	6-186-42	1
2-19-0	1	6-18-81	1
2-222-80	1	6-20-2	1
2-27-36	1	6-20-99	1
2-29-116	1	70-0-0	1
2-51-101	1	106-183-37	1
2-65-33	1	106-209-46	1
2-73-113	1	106-213-45	1
2-89-112	1	106-27-66	1
2-9-80	1	106-9-80	1
4-0-0	2	合計	111

検出されなかった株 (POT1:0) が 40 株あり、POT1 の値が 64 を超え、MRSA と判定された株が 6 株 (POT1 : 70 1 株、POT1 : 106 5 株) 存在した。

SE/SE1 遺伝子検出法と SA-POT 法の比較 (表 4) : 黄色ブドウ球菌 111 株の D index は SE/SE1 遺伝子検出法で 0.874、SA-POT 法で 0.990 と、菌株識別能力は SA-POT 法が SE/SE1 遺伝子検出法よりも高かった。高頻度に SE/SE1 遺伝子保有パターンであった *seg*、*sei*、*sem*、*sen* 及び *seo* 遺伝子保有株 (16 株) は SA-POT 法で 12 遺伝子型に、*sea* 遺伝子単独保有株 (14 株) は SA-POT 法で 8 遺伝子型に細分化された。反対に同一 POT 型に異なる SE/SE1 遺伝子保有パターンであったのは、POT 型 6-18-1 (*seg*、*sei* 及び *sem* 遺伝子保有 1 株、*seg*、*sei*、*sem* 及び *sen* 遺伝子保有 2 株)、POT 型 4-0-0 (*seg*、*sei*、*selj*、*sem*、*sen*、*seo* 及び *ser* 遺伝子保有 1 株、遺伝子検出せず 1 株)、POT 型 2-1-0 (*sec* 及び *sel* 遺伝子保有 1 株、*sek*、*seq* 遺伝子保有 1 株、遺伝子検出せず 2 株)、POT 型 0-8-80 (*sea* 遺伝子保有 1 株、*seb* 及び *sep* 遺伝子保有 1 株、*sep* 遺伝子保有 1 株)、POT 型 0-1-1 (*sea* 遺伝子保有 2 株、*sea*、*sec* 及び *sel* 遺伝子保有 1 株) の 5 遺伝子型であった。SA-POT 法において MRSA と判定された株 (6 株) は全ていずれかの SE/SE1 遺伝子を保有していた (*seg* 及び *sei* 遺伝子保有 1 株、*sec*、*sel* 及び *sep* 遺伝子保有 2 株、*seh* 遺伝子保有 2 株、*sea*、*seh*、*sek* 及び *seq* 遺伝子保有 1 株)。

考 察

今回供試した黄色ブドウ球菌は、食中毒原因菌とされずヒトが保有している株又は環境・食品由来株がほとんどである (109/111 株) が、多様な SE/SE1 遺伝子が検出された。さらに、食中毒原因菌とされなかった黄色ブドウ球菌の中にも古典的 SEs 遺伝子保有株が 39 株あり、食品・環境由来株やヒト糞便由来株が食中毒の汚染源となりうることが示唆された。また、近年古典的 SEs を保有しない黄色ブドウ球菌による食中毒の報告^{12、13)} や食中毒事例由来

表4 SE/SEI遺伝子型保有状況とSA-POT法の比較

SE/SEI遺伝子型	POT型	株数	SE/SEI遺伝子型	POT型	株数
<u>sea</u>	0-1-1	2	<i>seg, sei, sem, sen, seo</i>	0-10-16	3
	0-17-65	1		0-29-18	1
	0-51-9	6		0-73-53	2
	0-59-112	1		4-0-80	1
	0-59-113	1		4-136-80	1
	0-8-80	1		4-158-104	2
	0-9-113	1		4-186-112	1
	2-146-2	1		4-186-116	1
<u>sea, sec, sel</u>	0-1-1	1		4-29-112	1
	0-2-2	1		4-47-112	1
<u>sea, sed, selj, ser</u>	2-145-1	1		4-60-120	1
<u>sea, seg</u>	0-113-17	1		4-9-80	1
	6-152-34	1		<i>seg, sei, sem, sen, seo, sep</i>	4-8-16
<u>sea, seg, sei</u>	6-136-120	1			4-8-80
	6-186-104	1		<i>seg, sen</i>	6-20-99
<u>sea, seg, sei, sen</u>	6-186-42	1	<i>seh</i>	106-209-46	1
<u>sea, seh, sek, seq</u>	106-183-37	1		106-213-45	1
	2-65-33	1	<i>sei</i>	0-25-80	1
<u>seh, sed, selj, ser</u>	0-8-2	1		<i>sek, seq</i>	2-1-0
	<u>seh, seg, sei, sem</u>	6-0-64	2	<i>sep</i>	0-59-92
<u>seh, seg, sei, sem, sen, seo</u>	0-9-16	1	0-8-80		1
<u>seh, sek, sep, seq</u>	2-222-80	1	2-137-80		1
	2-89-112	1	2-9-80		1
<u>seh, sep</u>	0-248-80	1	0-131-1		1
	0-8-80	1	0-2-17	2	
<u>sec, seg, sei, sel, sem, sen, seo</u>	0-9-84	1	0-3-1	4	
	4-26-48	1	0-6-2	2	
	4-30-56	1	0-8-112	1	
	<u>sec, sek, sel, sep, seq</u>	2-73-113	1	2-1-0	2
		2-1-0	1	2-10-4	1
<u>sec, sel, sep</u>	106-27-66	1	2-1-13	1	
	106-9-80	1	2-17-0	1	
	2-29-116	1	2-19-0	1	
<u>sed, seg, sei, selj, sem, sen, seo, ser</u>	4-8-2	1	2-27-36	1	
<u>seg</u>	6-138-65	1	2-51-101	1	
	6-178-40	1	4-0-0	1	
<u>seg, sei</u>	6-156-66	1	4-24-32	3	
	70-0-0	1	4-26-0	6	
<u>seg, sei, selj, sem, sen, seo, ser</u>	4-0-0	1	4-28-0	1	
<u>seg, sei, sem</u>	6-18-1	1	4-28-96	1	
<u>seg, sei, sem, sen</u>	6-18-1	2	4-58-0	1	
	6-18-81	1	4-80-99	1	
	6-20-2	1	4-88-33	1	
合計					111

下線は古典的SEs

株の約 15%が古典的 SEs を保有しないとの報告¹⁴⁾もあり、新型 SEs 遺伝子を調査し分布状況を確認することは重要であると考えられた。今回の調査では、新型 SE 遺伝子 22 型のうち 10 型(*ses*、*set*、*selu*、*selv*、*selw*、*selx*、*sely*、*selz*、*sel26* 及び *sel27* 遺伝子)の保有についてが未解明である。SE/SE1 遺伝子の多くは菌株間を水平伝播する可能性がある可動性遺伝子因子¹⁵⁾であるため、今回 SE/SE1 遺伝子が検出不能であった株(33 株)が、これらの SE/SE1 遺伝子を保有していた可能性がある。今後も食中毒発生時に備え、これらの SE/SE1 遺伝子を含めた新型 SEs 遺伝子を検出するための検査法の準備や検討を進めていくことが重要であると考えられる。

SA-POT 法で MRSA と判定された黄色ブドウ球菌も SE/SE1 遺伝子を保有していた。MRSA は院内感染症だけでなく、市中感染症の起原菌としても警戒されており、今後食中毒対応の際にも注意が必要となる可能性があると考えられる。

SE/SE1 遺伝子保有パターンが菌株識別法としての利用可否を検討した結果、SE/SE1 遺伝子検出法は D index が 0.874 と実用に耐えうると考えられる値(0.95)よりも低かったため、SE/SE1 遺伝子検出法単独での菌株識別法としての利用は難しいと考えられた。しかし、菌株識別法として有効と考えられている SA-POT 法で同一遺伝子型と判定された株の SE/SE1 遺伝子保有パターンが異なっている場合もあったため、SE/SE1 遺伝子検出法は補助的な菌株識別法(疫学マーカー)としての利用は可能であると考えられた。

今回、愛知県内で分離された黄色ブドウ球菌が多様な SE/SE1 遺伝子を保有していることが明らかとなった。今後も黄色ブドウ球菌の SE/SE1 遺伝子保有状況に注視していくことで、黄色ブドウ球菌食中毒の潜在的风险を調査していきたいと考えている。

文 献

1) 令和元年食中毒発生状況 厚生労働省 食中毒統計・調査結果 ([https://www.m](https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/shokuhin/syokuchu/04.html)

[hlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/shokuhin/syokuchu/04.html](https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/shokuhin/syokuchu/04.html))

- 2) Omoe K, Hu DL, Takahashi-Omoe H, Nakane A, Shinagawa K.: Comprehensive analysis of classical and newly described staphylococcal superantigenic toxin genes in *Staphylococcus aureus* isolates. FEMS Microbiology Letters 246(2):191-198, 2005.
- 3) Lina G, Bohach GA, Nair SP, Hiramatsu K, Jouvin-Marche E, Mariuzza R: International Nomenclature Committee for Staphylococcal Superantigens: Standard nomenclature for the superantigens expressed by *Staphylococcus*. Journal of Infectious Diseases 189(12): 2334-2336, 2004.
- 4) Thomas DY, Jarraud S, Lemercier B, Cozon G, Echasserieau K, Etienne J, Gougeon ML, Lina G, Vandenesch F.: Staphylococcal enterotoxin-like toxins U2 and V, two new staphylococcal superantigens arising from recombination within the enterotoxin gene cluster. Infection and Immunity 74(8):4724-4734, 2006.
- 5) Ono HK, Omoe K, Imanishi K, Iwakabe Y, Hu DL, Kato H, Saito N, Nakane A, Uchiyama T, Shinagawa K.: Identification and characterization of two novel staphylococcal enterotoxins types S and T. Infection and Immunity 76(11): 4999-5005, 2008.
- 6) Zhang DF, Yang XY, Zhang J, Qin X, Huang X, Cui Y, Zhou M, Shi C, French NP, Shi X: Identification and characterization of two novel superantigens among *Staphylococcus aureus* complex. International Journal of Medical Microbiology 308(4):438-446, 2018.
- 7) Omoe K, Hu DL, Ono HK, Shimizu S, Takahashi-Omoe H, Nakane A, Uchiyama T, Shinagawa K, Imanishi K: Emetic

- potentials of newly identified staphylococcal enterotoxin-like toxins. *Infection and Immunity* 81(10):3627-3631, 2013.
- 8) 狩野真由子、重茂克彦、品川邦汎：ブドウ球菌エンテロトキシンを網羅的に検出する multiplex PCR. *岩手県獣医師会会報* 35(2):43-48, 2009.
- 9) 善養寺浩、寺山武、潮田弘、五十嵐英夫、丸山務：ブドウ球菌食中毒に関する研究(第2報) 食品、調理器具等および健康人における黄色ブドウ球菌の分布とそのコアグララーゼ型について. *食品衛生学雑誌* 12(6):501-505, 1971.
- 10) 青木美耶子、山田和弘、鈴木匡弘、松本昌門、皆川洋子：黄色ブドウ球菌の分子疫学解析における Cica Geneus Staph POT KIT の有効性検討. *愛知県衛生研究所報* 67:17-22, 2017.
- 11) Hunter PR, Gaston MA: Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *Journal of Clinical Microbiology* 26(11):2465-2466, 1988.
- 12) 倉本早苗、児玉洋江、山田恵子、戌亥一朗、北川恵美子、川上慶子、里見良二、伊川あけみ、重茂克彦、品川邦汎：未知の SE を産生する黄色ブドウ球菌が原因と疑われた食中毒事例－石川県. *病原微生物検出情報* 27:73-74, 2006.
- 13) 牛水真紀子、高畑寿太郎、熊谷正憲、吉田菊喜、重茂克彦、品川邦汎：エンテロトキシン A～E 非産生の黄色ブドウ球菌が原因と推定された家庭内食中毒事例－仙台市. *病原微生物検出情報* 26:20-21, 2005.
- 14) Sato'o Y, Omoe K, Naito I, Ono HK, Nakane A, Sugai M, Yamagishi N, Hu DL: Molecular epidemiology and identification of a *Staphylococcus aureus* clone causing food poisoning outbreaks in Japan. *Journal of Clinical Microbiology* 52(7):2637-2640, 2014.
- 15) 鈴木康規：ブドウ球菌食中毒に関する最近の進展. *食品衛生学雑誌* 60(3):27-37, 2019.

Prevalence of staphylococcal enterotoxin genes in Aichi Prefecture from 2011 to 2020 and evaluation of a discriminatory power of staphylococcal enterotoxin genes PCR method

Kazuhiro Yamada, Tatsuya Matsuda, Hirokazu Tsuduki, Katsuhiko Sato

Staphylococcus aureus is one of the most important bacteria causing food poisoning. Staphylococcal enterotoxins (SEs) are emetic toxins that cause staphylococcal food poisoning. In food poisoning, existence of several classical types (SEA, SEB, SEC, SED, and SEE) has been tested. In recent years, new types of SEs have been reported and detection method of SE genes using PCR were developed. In this study, we investigated prevalence of staphylococcal enterotoxin genes in Aichi Prefecture from 2011 to 2020 and evaluated discriminatory power of SE genes PCR method comparing *S. aureus* PCR-based ORF typing (SA-POT).

A total of 111 isolates of *S. aureus* were tested by SE genes PCR method and SA-POT. These isolates were classified into 30 SE genes pattern and 79 POT types, respectively. 78 isolates (70.3%) had one or more SE genes, and up to eight types of SE genes (*sed*, *seg*, *sei*, *selj*, *sem*, *sen*, *seo* and *ser* genes) were carried. The D indexes were 0.874 for SE genes PCR method, and 0.990 for SA-POT. Discriminatory power of SE genes PCR method was insufficient, therefore it was considered difficult to use it as a stand-alone method to differentiate strains. However, since several isolates identified by the SA-POT as same genotype were distinguished by SE genes PCR method, SE genes PCR method could be used as a supplementary method for strain differentiation.

Key words : *Staphylococcus aureus*, Staphylococcal enterotoxin genes,
Cica Geneus Staph POT KIT

調 査 研 究

LC-MS/MS を用いた 畜水産物中の残留アセトアミノフェン分析法の開発

海野明広、堀田沙希、福田博司、猪飼誉友¹、上野英二、棚橋高志
¹(現所属)中部大学応用生物学部

要 旨

食品中に残留する動物用医薬品による健康被害を防ぐため、食品衛生法に基づいて食品ごとに動物用医薬品の残留基準値が設定されている。中枢性解熱鎮痛薬であるアセトアミノフェン(AAP)は、平成23年に豚での使用が承認され残留基準値が定められたものの、その残留分析法は公に示されていない。そこで、本研究ではLC-MS/MS(Liquid Chromatograph-Mass Spectrometry)を用いた畜水産物中の残留AAPの分析法の開発を行った。その結果、一律基準レベル(0.01 ppm)のAAPを良好なピーク形状で分離・検出できた。本分析法の妥当性を評価するため、畜水産物(豚の筋肉、脂肪、肝臓、牛乳、鶏卵、はちみつ、うなぎ及びしじみ)を用いて残留農薬等試験法開発事業実施要領が定める添加回収試験を行った。その結果、真度72.1~103.2%、併行精度0.5~6.7RSD%と同要領の評価基準を満たした。このことから、本分析法は畜水産物中のAAPの残留分析法として適用可能と考えられた。

キーワード:アセトアミノフェン、畜水産物、残留分析、LC-MS/MS

はじめに

動物用医薬品は、畜産や魚の養殖などの現場で疾病の予防や治療等を目的に使用されるほか、栄養補給や成長促進を目的に飼料添加物としても利用され、畜水産動物の生産性の向上に寄与している。一方で、使用された動物用医薬品が畜水産物へ残留し、これを喫食することによる健康被害が食品衛生上懸念される。こうした健康被害を未然に防ぐため、食品衛生法に基づいて食品ごとに動物用医薬品の残留基準値が設定されており¹⁾、残留基準を超える畜水産物が市場に流通しないよう地方衛生研究所等においてモニタリング検査が実施されている。

食品中の動物用医薬品の検査は、公定法である「HPLC(High Performance Liquid

Chromatograph)による動物用医薬品の一斉試験法Ⅰ~Ⅲ」及び「個別分析法」により実施されている²⁾。しかしながら、平成23年に豚の経口投与剤として承認された中枢性解熱鎮痛薬であるアセトアミノフェン(AAP)³⁾は、上述した試験法の検査対象に含まれていない。そのため精度が確保された公定法の確立が求められている。

当所では、平成30年にHPLC-UV(Ultraviolet Absorption Detector)を用いたAAP残留分析法を報告している⁴⁾。この分析法は、AAPの残留基準値⁵⁾(豚の筋肉0.6 ppm、脂肪0.3 ppm、肝臓、腎臓及び豚の食用部位2 ppm)レベルのAAPを良好に分離・検出できるものの、肝臓のような夾雑物の多い試料では正確な定量分析が困難という問題点があった。

また、一律基準 0.01 ppm が適用される豚以外の食品の分析においては、UV 検出器では、選択性や感度等が不十分であることから、選択性や感度に優れる質量分析計を用いた分析法の開発が必要であった。なかでも LC-MS/MS は、高分解能での質量分析が可能であり、また高い選択性をもつ MS/MS スペクトルを確認することにより、確実な同定と高感度定量ができる。そこで、本研究では LC-MS/MS を用いた畜水産物中の残留 AAP 分析法の検討を行った。また、本分析法の妥当性について、残留農薬等試験法開発事業実施要領⁶⁾が定める添加回収試験にて評価を行った。

方 法

1. 試料

令和 2 年 7 月から 11 月に愛知県内の小売店で購入した豚の筋肉、肝臓、脂肪、牛乳、鶏卵、はちみつ(百花蜜)、うなぎ及びしじみを用いた。豚の筋肉、肝臓及び脂肪は、細切後フードプロセッサーで均一化したものを試料とした。鶏卵はフードプロセッサーで均一化したものを試料とした。うなぎは、頭部を除いた可食部(内臓、骨及び皮も含む)を細切後フードプロセッサーで均一化したものを試料とした。しじみは、貝殻を除き目の細かい網にのせ 5 分間水切りを行った後、フードプロセッサーで均一化したものを試料とした。

2. 試薬及び標準品

メタノール、*n*-ヘキサン、アセトン、アセトニトリル、ギ酸、超純水及び無水硫酸ナトリウムは富士フィルム和光純薬(株)または関東化学(株)の製品を用いた。試薬のグレードは抽出・精製操作には特級を、移動相には LC/MS 用を用いた。蒸留水は純水製造装置(WG222、ヤマト科学(株))で製造した。AAP 標準品は(一財)医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス財団の日本薬局方標準品を用い、メタノールに溶解して 1 mg/mL 標準原液とし、これを適宜希釈して標準溶液とした。

3. 装置及び測定条件

LC-MS/MS(ACQUITY H-Class/Xevo TQ-XS、Waters, USA)を用い、表 1 の条件で測定した。
ホモジナイザー(T25 digital ULTRA-TURRAX、IKA、Germany)
ロータリーエバポレーター(N-1300、EYELA 東京理化学器械(株))
遠心分離器(KUBOTA8420、久保田商事(株))
超音波装置(BRANSON2510、日本エマソン(株))

4. 試験溶液の調製

(1) 抽出

① 筋肉、肝臓、脂肪、牛乳、鶏卵及び魚介類の場合

試料 10.0 g(脂肪、牛乳及び鶏卵は 5.00 g)を 100 mL 容ポリプロピレン製遠心管に採り、*n*-ヘキサン 15 mL を加え 1 分間ホモジナイズした後、アセトニトリル 30 mL と無水硫酸ナトリウム 30 g を加え、さらに 1 分間ホモジナイズ抽出した。シャフトジェネレータを 50 mL 容ポリプロピレン製遠心管に入ったアセトニトリル 15 mL 中で回転させて洗浄し、アセトニトリル洗浄液を得た。先の 100 mL 容ポリプロピレン製遠心管を毎分 3000 回転で 5 分間遠心分離し、有機溶媒層を別の遠心管に分取後、残渣に *n*-ヘキサン 15 mL 及びアセトニトリル洗浄液 15 mL を加えて 1 分間ホモジナイズ抽出し、毎分 3000 回転で 5 分間遠心分離した。得られた有機溶媒層と前操作で分取した有機溶媒層を合わせ 1 分間振とうし、毎分 3000 回転で 5 分間遠心分離後、*n*-ヘキサン層を除去した。残ったアセトニトリル層に *n*-ヘキサン 30 mL を加えて 1 分間振とう後、毎分 3000 回転で 5 分間遠心分離し *n*-ヘキサン層を除去した。この操作を 3 回繰り返す、最後は下層のアセトニトリル層を分取した。分取液にアセトニトリルを追加し正確に 50 mL に合わせ抽出溶液とした。

② はちみつの場合

試料 5.00 g を 100 mL 容ポリプロピレン製遠心管に採り、水 5 mL を加え溶解させた。アセトニトリル 15 mL を加え 1 分間振とう

表1 LC-MS/MS条件

MS条件			
測定モード	MS/MS		
イオン化モード	ESI(+)		
キャピラリ電圧	2 kV		
イオン源温度	150 °C		
デソルベーション温度	400 °C		
コーンガス	窒素、150 L/hr		
デソルベーションガス	窒素、800 L/hr		
コリジョンガス	アルゴン		
プレカーサーイオン	151.9 <i>m/z</i> (アセトアミノフェン)		
プロダクトイオン	109.9 <i>m/z</i> (コーン電圧：28V、コリジョンエネルギー：16eV)		
	92.8 <i>m/z</i> (コーン電圧：28V、コリジョンエネルギー：22eV)		
	64.9 <i>m/z</i> (コーン電圧：28V、コリジョンエネルギー：28eV)		
LC条件			
カラム	Inertsil ODS-3 (内径2.1 mm、長さ100 mm、粒子径3 μm)		
移動相流速	0.2 mL/min		
注入量	10 μL		
カラム温度	40 °C		
移動相	A液：0.05 vol%ギ酸含有アセトニトリル B液：0.05 vol%ギ酸		
グラジエント条件	時間 (min)	A液 (%)	B液 (%)
	0	10	90
	4	10	90
	6	90	10
	10	90	10
	10.01	10	90
	20	10	90

し、毎分 3000 回転で 5 分間遠心分離しアセトニトリル層を回収した。この操作を 3 回繰り返し、得られたアセトニトリル溶液を合わせた。*n*-ヘキサン 30 mL を加えて 1 分間振とう後、毎分 3000 回転で 5 分間遠心分離し、アセトニトリル層を分取した。分取後にアセトニトリルを追加し正確に 50 mL に合わせ抽出溶液とした。

(2) 精製

抽出溶液 5 mL (脂肪、牛乳及び鶏卵は 10 mL) をナスフラスコに移し、40°C 以下で減圧濃縮し、窒素気流下で溶媒を除去した。上記濃縮残渣に 5% メタノール 5 mL を加えて超音波槽内で溶解し、15 mL 容ポリプロピレン製遠心管に移した。ナスフラスコを水 5 mL で洗浄後、洗浄液も同じ遠心管に移した。その溶液をあらかじめメタノール及び水各 10 mL でコンディショニングした OASIS HLB

(150 mg/6 mL、Waters、USA) 固相カラムに負荷した。10% メタノール 5 mL でカラムを洗浄し、さらに毎分 3000 回転で 5 分間遠心分離してカラム内の水分を除去した。カラムに窒素を 10 分間通気して乾燥させた後、保持された AAP を酢酸エチル 10 mL で溶出した。溶出液を 40°C 以下で減圧濃縮し、窒素気流下で溶媒を除去した。得られた残渣に 0.05 vol% ギ酸含有アセトニトリル及び 0.05 vol% ギ酸 (1:9) 混液 1 mL を加え、超音波槽内で溶解し試験溶液とした。

マトリックス添加標準溶液を調製する場合は、ブランク試料の溶出液 2 mL を、40°C 以下で減圧濃縮し、窒素気流下で溶媒を除去した後、添加回収試験における回収率 100% 相当濃度になるように標準溶液 0.2 mL を加え、超音波槽内で溶解しマトリックス添加標準溶液とした。

5. 検量線

AAP 標準原液を、回収率 25、50、75、100、125、150%相当濃度になるように 0.05 vol%ギ酸含有アセトニトリル及び 0.05 vol%ギ酸(1:9)混液で適宜希釈し、検量線用の溶媒標準溶液とした。

6. 添加回収試験

試料 10.0 g(脂肪、牛乳、鶏卵及びはちみつは 5.00 g)を 100 mL 容ポリプロピレン製遠心管に秤量後、AAP 濃度が 0.01 $\mu\text{g/g}$ になるように標準溶液を添加した。また、豚の筋肉、脂肪及び肝臓においては、各 AAP 濃度が 0.3 $\mu\text{g/g}$ 、0.6 $\mu\text{g/g}$ 及び 2.0 $\mu\text{g/g}$ になる試料も調製した。試料にメタノール(試料が脂肪の場合はアセトン)を 500 μL 添加したものをブランク試料とした。各試料を 30 分間放置した後、上記の方法で試験溶液を調製し、LC-MS/MS にて測定した。なお、AAP 濃度を 2.0 $\mu\text{g/g}$ に調製した肝臓試料は、試験溶液をさらに 0.05 vol%ギ酸含有アセトニトリル及び 0.05 vol%ギ酸(1:9)混液で 10 倍希釈してから LC-MS/MS にて測定した。

7. 定量

AAP 標準溶液と試験溶液 10 μL を LC-MS/MS で分析した。AAP のプロトン化分子(m/z 151.9)をプリカーサーイオンとして MRM (Multiple Reaction Monitoring) モードで定量イオン(m/z 109.9)と確認イオン(m/z 92.8、 m/z 64.9)を測定し、定量イオンのピーク面積を用いて絶対検量線法により試験溶液中の AAP 濃度を算出した。

8. 確認

AAP の確認は、標準溶液と試験溶液 10 μL を LC-MS/MS で分析し、得られたプロダクトイオンスペクトルのスペクトルパターンを比較し行った。

結果及び考察

1. MS 及び LC 条件の設定

はじめに、AAP 測定に最適な MS 条件の設定を試みた。AAP 標準溶液を LC-MS Scan 分析

して得られたマススペクトル上に、AAP のプロトン化分子 $[\text{M}+\text{H}]^+$ の m/z 151.9 を確認した(図 1A、B)。AAP のプロトン化分子(m/z 151.9)をプリカーサーイオンとして、解析ソフト(MassLynx v4.2、Waters、USA)の自動解析機能を用いて、表 1 のとおり MS 条件を設定した。設定条件による衝突誘起解離で得られたプロダクトイオンスペクトル上には、 m/z 109.9、 m/z 92.8、 m/z 64.9 の特徴的なイオンが認められた(図 1C)。定量イオンには m/z 値が大きく発現強度の高い m/z 109.9 を選択し、確認イオンには m/z 92.8 及び m/z 64.9 を用いた。これらのイオン比は、衝突誘起解離を誘発するコリジョンエネルギーに依存して、それぞれ特徴的なパターンを示した(図 1C)。これらのイオン比を指標としたプロダクトイオンスペクトル解析により AAP の確認が可能と考えた。また、本分析法は適用対象を畜水産物としており、はちみつ等夾雑物が多い試料では、夾雑成分が定量に大きな影響を及ぼすため、選択的に目的化合物を測定可能な MRM モードによる定量を採用した。

ついで、LC による AAP の分離条件を設定するため、充填剤の異なる各種カラムを用いて AAP の溶出挙動を比較した。カラムは内径 2.1 mm、長さ 100 mm の Inertsil ODS-3 (3 μm 、ジーエルサイエンス)、Inertsil Ph-3 (3.5 μm 、ジーエルサイエンス)、Xterra MS C18 (3.5 μm 、Waters、USA) 及び X-Bridge C18 (3.5 μm 、Waters、USA) を用いた。移動相は 0.05 vol%ギ酸含有アセトニトリル及び 0.05 vol%ギ酸(1:9)混液とし、この混液で調製した 0.0025 ppm の AAP の分離を試みた。図 2 に示すように、いずれのカラムにおいても 0.0025 ppm という微量な AAP を良好なピーク形状($S/N > 10$)で分離することができた。これらの中で、保持能力が最も高く、夾雑物との分離が期待できる Inertsil ODS-3 を分離用カラムとした。また、上記の移動相は、アセトニトリル濃度が低く、AAP 溶出後にも試料由来の夾雑物が多く溶出することが懸念されたため、次の試料の分析に影響が及ぶことを避ける目的でグラジエント条件を設定した(表 1)。設定条件にて、次の

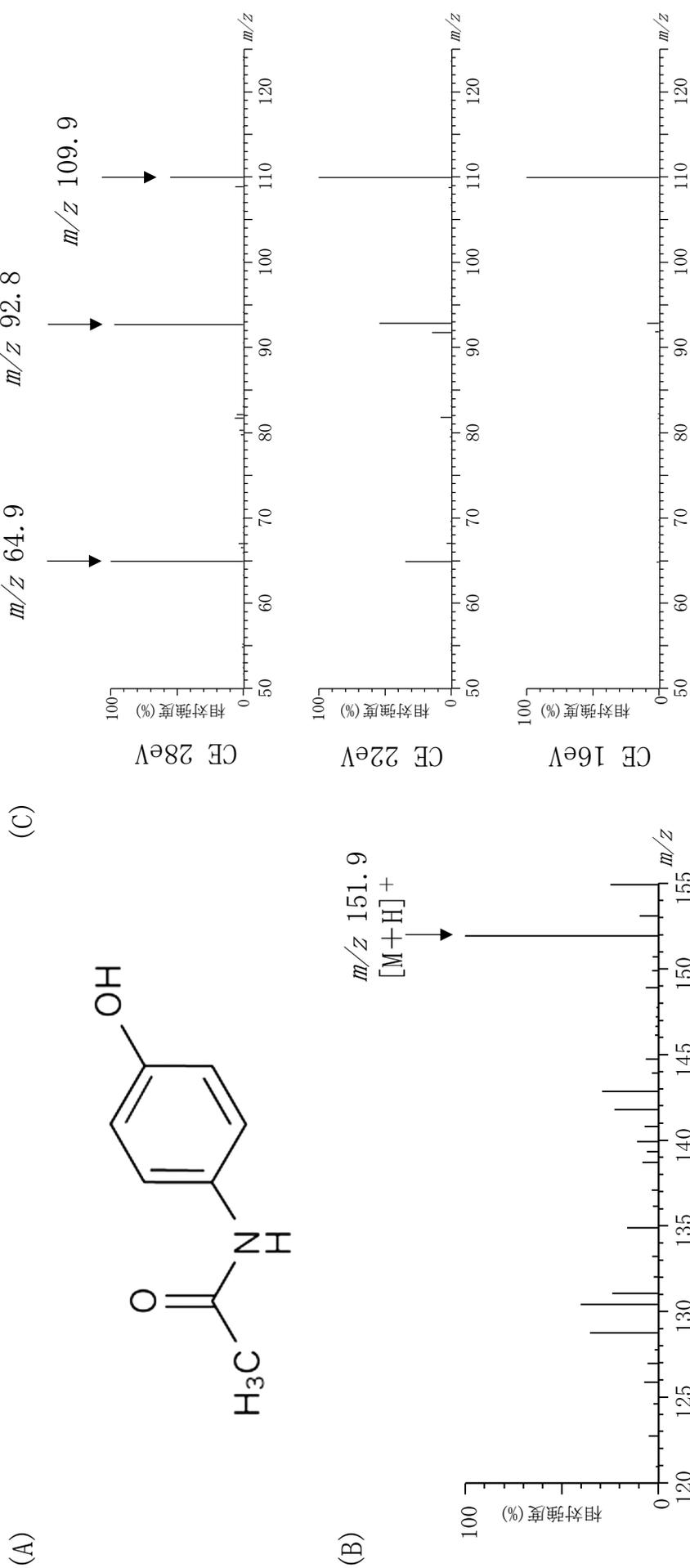


図1 MSを用いたアセトアミノフェン(AAP)のフラグメント解析

(A) AAPの化学構造 ($C_8H_9NO_2$ 分子量151.169)

(B) AAPのマススペクトル(0.01ppm 10 μ L injection)

スキヤン範囲120~155 amu, ESI+, CV=28 (CV:Cone Voltage)

(C) AAP のプロダクトイオンスペクトル(0.01ppm 10 μ L injection)

プリカーサーイオン m/z 151.9, ESI+, CV=28, CE=28 eV, 22eV, 16eV (CE:Collision Energy)

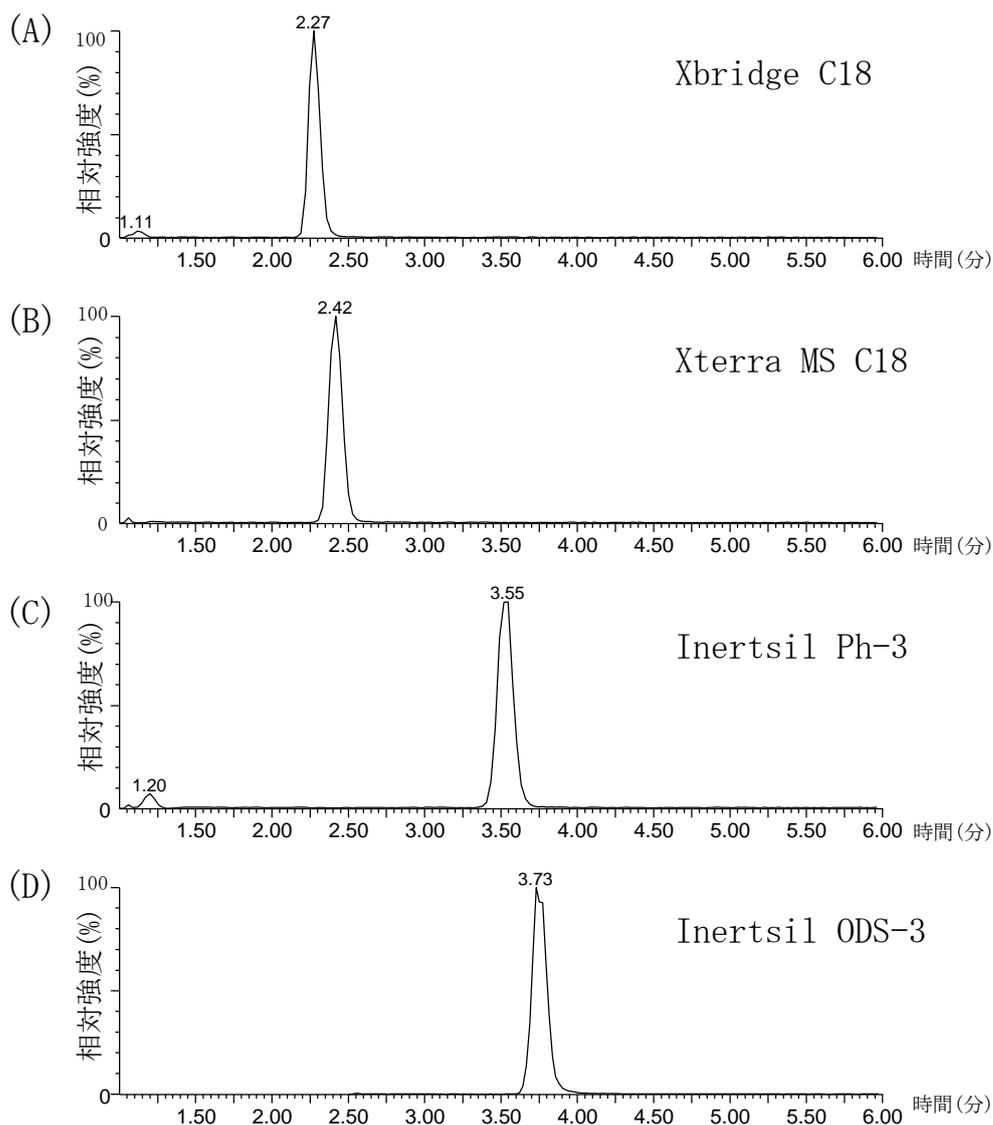


図2 カラムによるアセトアミノフェン(AAP)の溶出挙動の変化

AAPのMRMクロマトグラム (151.9 > 109.9) (0.0025ppm 10 μ L injection)

(A)Xbridge C18、(B)Xterra MS C18、(C) Inertsil Ph-3、(D)Inertsil ODS-3

試料の分析への夾雑物の影響を確認したが、妨害ピーク等は観察されなかった(data not shown)。以上の結果から、設定条件でAAPを検出可能と判断した。

表1の設定条件において、マトリックス中のAAP(0.01 ppm)が検出可能か確認するため、溶媒標準溶液とマトリックス添加標準溶液をLC-MS/MSにて分析した。図3に示すとおり、ブランク試料から調製した試験溶液(マトリックス)では測定を妨害するような大きなピークは観察されなかったが、

マトリックス添加標準溶液では、約3.7分付近に溶媒標準溶液と同様のピークが観察された。観察されたピークのプロダクトイオンスペクトルを確認したところ、ピークを構成する定量イオン(m/z 109.97)と確認イオン(m/z 92.80、 m/z 64.95)の比が溶媒標準溶液とほぼ一致していることから、観察されたピークがAAPであることを確認した(図3D、E)。以上の結果から、表1の設定条件にてマトリックス中の0.01 ppmのAAPを検出可能と判断した。

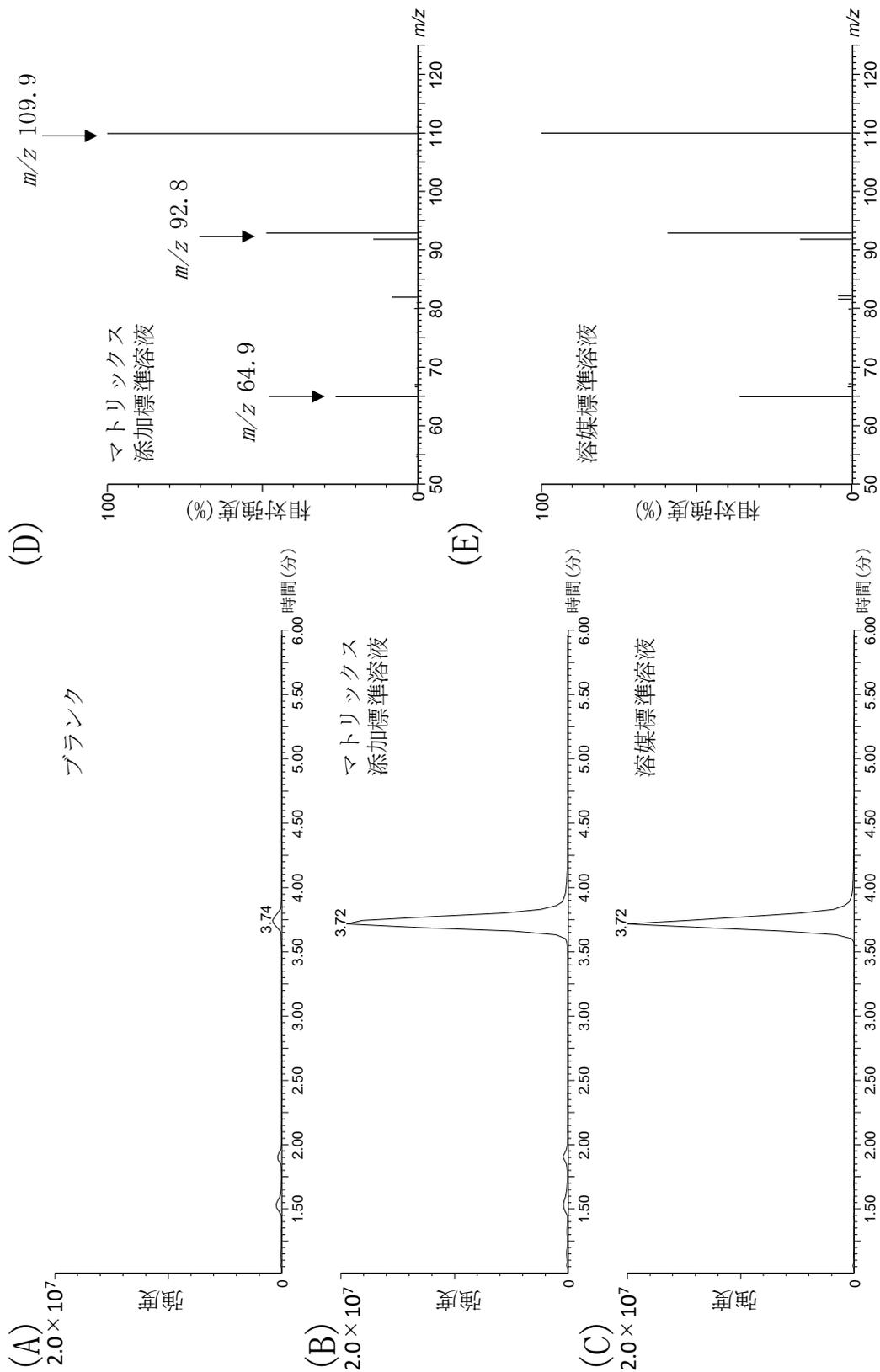


図3 添加試験における代表的なアセトアミノフェン(AAP)のMRMクロマトグラムとプロダクトイオンスペクトル
 AAPのMRMクロマトグラム (151.9>109.9) (A)ブランク (豚の筋肉)、(B)マトリックス添加標準溶液 (0.01ppm)、(C)溶媒標準溶液 (0.01ppm)
 AAPのプロダクトイオンスペクトル (Collision energy 22eV) (D)マトリックス添加標準溶液 (0.01ppm)、(E)溶媒標準溶液 (0.01ppm)

2. 試験溶液調製法の検討

豚の筋肉及び肝臓試料において、*n*-ヘキサンとアセトニトリルの混合溶媒及び OASIS HLB カラムを用いた AAP の抽出・精製方法が報告されている⁴⁾。本研究では、回収率の向上を図るため下記のとおり抽出・精製方法を一部変更した。変更後の抽出・精製方法を図 4 に示す。なお、検討は精製方法、抽出方法の順に行った。

(1) 精製方法の検討

OASIS HLB カラムの AAP 保持能力に対するカラムへの抽出溶液の添加量(負荷溶液量)の影響について検討を行った。堀田らの報告⁴⁾では豚の肝臓からの回収率は 75.1%であったが、図 4 に示すように、濃縮残渣の溶解を、既報の半量である 5%メタノール 5 mL 及び蒸留水 5 mL で実施し、カラムに負荷したところ、回収率の大幅な改善が確認された(data not shown)。そのため、カラムへの負荷溶液量を計 10 mL に変更した。次に、カラムの AAP 保持能力に対する試料マトリックスの影響について検討を行った。鶏卵 5 g を用いて負荷溶液を調製し、濃度が 0.5 ppm になるように AAP を添加後、カラムに負荷した。ついで、カラムの洗浄を行ったところ、洗浄液中に添加量の 30%を超える AAP が観察された。一方、鶏卵 1 g を同様に処理し、負荷した場合は、流出する AAP 量は 8%未満であった。豚の肝臓由来のマトリックスでは、このような現象は観察されなかったが、他試料において同様の現象が発生する可能性があるため、マトリックス負荷量は試料 1 g 相当に統一した。さらに、カラムに負荷する溶出溶媒(酢酸エチル)量の検討を行った。酢酸エチル 5 mL と 10 mL で溶出し、それぞれの AAP 含量を比較したところ、10 mL 溶出では 5 mL 溶出よりも 3%程度回収率が高かったため、溶出溶媒量を 10 mL とした。

(2) 抽出方法の検討

残留農薬等試験法開発事業実施要領には、目的化合物を脂肪とともに抽出する方法を検討するよう明記されている。そこで、脂肪からの AAP の抽出を評価するため、予め 40℃で加温融解させた豚の脂肪に AAP を添

加・ホモジナイズし再度凝固させた脂肪試料を作製した。その上で、脂肪試料に *n*-ヘキサンを加えホモジナイズし脂肪を融解させた後、アセトニトリルによる AAP の抽出を試みたところ、本抽出法の AAP 回収率は 85.2~93.0% (n=10)と良好であった(表 2)。これらの結果から、本抽出法が脂肪からの AAP 抽出に有用であると判断した。また、同要領に従い、脂肪以外の試料(はちみつを除く)についても、本抽出法を採用した(図 4)。一方はちみつは、粘性が高くホモジナイザーを用いた均一化が出来ないという問題があった。そこで、試料 5 g に同量の水を加えて溶解し粘性を低減した後、アセトニトリルによる AAP の抽出を行った(図 4)。なお、無水硫酸ナトリウムの添加により AAP の回収率低下が確認されたため、はちみつの抽出法には無水硫酸ナトリウムは用いなかった(data not shown)。

3. 検量線

AAP の定量用イオンのピーク面積値を用いて、0.0025~0.9000 ppm の範囲で絶対検量線を作成したところ、相関係数が 0.997 以上と良好な直線性が得られた(表 2)。

4. 添加回収試験

本分析法の妥当性を評価するため、残留農薬等試験法開発事業実施要領に従い添加回収試験を実施した。本分析法の適用対象を畜水産物とするため、同要領が定める食品リストから、豚の筋肉、脂肪、肝臓、牛乳、鶏卵、はちみつ、うなぎ及びしじみを選択した。添加濃度は、すべての試料で一律基準(0.01 ppm)とし、残留基準値が設定されている豚試料(筋肉、脂肪及び肝臓)については、それぞれの基準値濃度(0.6 ppm、0.3 ppm、2.0 ppm)についても評価した。得られた結果から、選択性、真度、精度及び試料マトリックスの測定への影響を求め、同要領が定める目標値等に適合するか評価した。選択性はブランク試料と標準溶液のピーク面積比で判断した。豚の肝臓及び牛乳のブランク試料からピークが確認されたが、その影響はそれぞれ標準溶液(0.01 ppm)



図4 試験溶液の調製方法

表2 真度、精度及び定量限界の評価

食品名	定量限界 (mg/kg)		基準値 (ppm)	添加濃度 (ppm)	検量線		回収率 (%)					真度 併行精度			S/N比
	0.01	0.01			相関係数 (r ²)	n=1	n=2	n=3	n=4	n=5	(%)	(RSD%)	Max.	Min.	
豚筋肉	0.01	0.01	0.60	0.60	0.9991	85.5	90.1	89.0	94.1	91.3	90.0	3.5	9556.1	58.3	4807.2
	0.01	0.01	0.01	0.01	0.9991	99.7	102.2	104.8	103.6	105.7	103.2	2.3	324.7	160.0	242.4
豚肝臓	0.01	0.01	2.00	2.00	0.9994	94.5	86.2	90.9	85.7	84.6	88.4	4.7	2544.2	89.4	1316.8
	0.01	0.01	0.01	0.01	0.9992	97.9	96.3	99.1	92.6	92.3	95.6	3.2	2407.3	109.0	1258.2
豚脂肪	0.01	0.01	0.30	0.30	0.9973	86.6	87.3	85.7	85.5	85.2	86.1	1.0	382.9	68.9	225.9
	0.01	0.01	0.01	0.01	0.9991	92.4	92.5	93.0	90.6	87.9	91.3	2.3	248.8	57.7	153.2
牛乳	0.01	0.01	0.01	0.01	0.9991	91.9	88.3	94.1	93.1	90.7	91.6	2.5	1865.3	146.1	1005.7
	0.01	0.01	0.01	0.01	0.9995	77.6	82.5	82.7	83.2	87.2	82.6	4.1	2101.5	109.9	1105.7
はちみつ	0.01	0.01	0.01	0.01	0.9992	71.7	72.5	71.8	72.2	72.2	72.1	0.5	204.2	102.4	153.3
	0.01	0.01	0.01	0.01	0.9991	97.1	93.3	88.6	100.3	105.5	97.0	6.7	1603.8	114.4	859.1
うなぎ	0.01	0.01	0.01	0.01	0.9991	75.4	80.3	82.5	85.3	82.4	81.2	4.5	1429.6	161.6	795.6
	0.01	0.01	0.01	0.01	0.9997										

表3 選択性の評価

食品名	定量限界 (mg/kg)	基準値 (ppm)	添加濃度 (ppm)	妨害ピークの許容範囲		ピーク面積		選択性の評価	
				評価対象濃度 (ppm)	判定基準	マトリックス添加標準溶液 (b)	面積比 (a)/(b)		
豚筋肉	0.01	0.60	0.60	基準値	< 0.100	66527	86140288	0.001	○
	0.01	0.01	0.01	定量限界	< 0.333	43613	2012044	0.022	○
豚肝臓	0.01	2.00	2.00	基準値	< 0.100	43522	32444138	0.001	○
	0.01	0.01	0.01	定量限界	< 0.333	258459	2114748	0.139	○
豚脂肪	0.01	0.30	0.30	基準値	< 0.100	37553	57533940	0.001	○
	0.01	0.01	0.01	定量限界	< 0.333	32829	3055299	0.011	○
牛乳	0.01	0.01	0.01	定量限界	< 0.333	509178	2729538	0.229	○
	0.01	0.01	0.01	定量限界	< 0.333	117359	2597127	0.047	○
はちみつ	0.01	0.01	0.01	定量限界	< 0.333	32245	1316410	0.025	○
	0.01	0.01	0.01	定量限界	< 0.333	10522	2032004	0.005	○
うなぎ	0.01	0.01	0.01	定量限界	< 0.333	17475	1531965	0.012	○
	0.01	0.01	0.01	定量限界	< 0.333				

のピーク面積の 13.9%、22.9%と許容範囲内だった(表 3)。ピークが観察された豚の肝臓及び牛乳については、添加試料のピーク面積値からブランク試料のピーク面積値を除いて真度を算出することとした。その結果、真度は 72.1~103.2%であり、目標値である 70~120%の範囲内だった(表 2)。併行精度は 0.5~6.7RSD%と良好な結果が得られた(表 2)。試料マトリックスの測定への影響は、溶媒標準溶液に対するマトリックス添加標準溶液のピーク面積比で求めた。いずれも 0.66~1.03 の範囲にあり、顕著に高い試料はなかったが、はちみつとしじみではそれぞれ 0.66、0.75 とイオン化抑制が確認された。表 2 に示したはちみつとしじみの真度が低いのは、マトリックスによるイオン化抑制効果の影響と考えられた。

本分析法の定量限界は、検討したすべての添加試料(0.01 ppm)で、真度及び精度が目標値を満たしており、かつ得られたピークの S/N 比が 10 以上であることから 0.01 mg/kg とした。

以上の結果は、同要領が定める目標値等に適合していた。このことから、本分析法は畜水産物中の AAP の残留分析法として適用可能と判断した。

今回用いた豚の肝臓及び牛乳のブランク試料で確認された定量限界未満のピークについて、プロダクトイオンスペクトル解析を行ったところ、AAP のプロダクトイオンスペクトル(図 1C)と一致していた(data not shown)。これらの結果より、観察されたピークは AAP の可能性が高いと考えられた。豚の肝臓は投与された AAP が残留しやすいため⁷⁾、試料に残留していた微量な AAP がピークとして観察されたと考えられた。また、牛乳に関しては、AAP は飲水又は飼料に添加され家畜に投与されるため³⁾、これを摂取した牛において、乳に移行した AAP がピークとして観察されたと考えられた。

まとめ

本研究では、LC-MS/MS を用いた畜水産物中の残留 AAP の分析法の開発を行った。本分析法により、残留農薬等試験法開発事業実施要領が定める添加回収試験を実施したところ評価基準を満たしていた。このことから、本分析法は畜水産物中の AAP の残留分析法として適用可能と判断した。今後、本分析法を用いて流通する畜水産食品中の AAP の残留実態を調査していきたいと考えている。

本研究の一部は、公益財団法人大同生命厚生事業団地域保健福祉研究助成により実施した。

参考文献

- 1) 食品、添加物等の規格基準:昭和 34 年 12 月 28 日付け厚生省告示第 370 号
- 2) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知 “食品に残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法について” 平成 17 年 1 月 24 日付け食安発第 0124001 号
- 3) 農林水産省令 “動物用医薬品の使用の規制に関する省令の一部を改正する省令” 平成 23 年 3 月 11 日付け農林水産省令第九号
- 4) 堀田沙希、後藤智美、市川義多加、猪飼誉友、渡邊美奈恵、小池恭子: 豚組織中のアセトアミノフェン残留分析法の検討. 愛知県衛生研究所報 68:33-40
- 5) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知 “食品、添加物等の規格基準の一部を改正する件について” 平成 25 年 7 月 2 日付け食安発 0702 第 1 号
- 6) 国立医薬品食品衛生研究所食品部: 残留農薬等試験法開発事業実施要領(令和 2 年度)2020 年 6 月 1 日
- 7) 食品安全委員会: 動物用医薬品評価書 アセトアミノフェン 第 2 版 2011

Development of residual acetaminophen analysis method in livestock and marine products using LC-MS/MS

Akihiro Unno, Saki Hotta, Hiroshi Fukuda, Yoshitomo Ikai¹, Eiji Ueno, Takashi Tanahashi

¹ Present affiliation: College of Bioscience and Biotechnology, Chubu University

In order to prevent health hazards caused by veterinary animal drugs remaining in foods, maximum residue limits were set for each food pursuant to Food Sanitation Act. Although acetaminophen (AAP), a central analgesic that has recently been approved for use in pigs, has the residue standard values, the residual analysis method for AAP has not been publicly established. Therefore, in this study we developed the analytical method of residual AAP in livestock and marine products using LC-MS/MS. The method could separate and detect acetaminophen at a uniform limit (0.01ppm) with a good peak shape. To evaluate the validity of this test method, we performed recovery tests using livestock and marine products (pig muscle, fat, liver, milk, chicken eggs, honey, eel and freshwater clam) in accordance with the guidelines for test method development. As a result, the trueness was 72.1 to 103.2% and the repeatability was 0.5 to 6.7 RSD%, which satisfied the evaluation criteria of the guidelines. Therefore, it was considered that this test method is useful as a residual analysis method for AAP in livestock and marine products.

Key words : acetaminophen, livestock and marine products, residue analysis,
LC-MS/MS

調 査 研 究

水道水質検査試料の採水容器に関する検討

服部靖子、原田知美、加藤千佳¹、渡邊美奈恵、棚橋高志

¹(現所属)春日井保健所

要 旨

水道水質基準項目のうち、ハロ酢酸類、非イオン界面活性剤、フェノール類及びホルムアルデヒドの検査において、4種の合成樹脂製採水容器（ポリプロピレン製（PP）、ポリエチレン製（PE）、フッ素樹脂製（PFA）及びポリエチレンテレフタレート製（PET））を用いて搬送時の振動や温度による影響を比較検討した。その結果、すべての項目について、4種の合成樹脂製容器のいずれにおいても回収率は良好で対象物質の吸着は見られず、定量を妨害するような物質の溶出も確認されなかった。また、採水後の搬送時における温度変化や振動による影響について検討したところ、PETでは4℃、室温での保存、あるいは振動については、すべての対象物質の安定性に影響を与える要因とはならなかった。しかし、PEに保存した場合は非イオン界面活性剤では回収率にバラつきが認められた。以上のことを踏まえ、ハロ酢酸類、非イオン界面活性剤、フェノール類及びホルムアルデヒド検査用の採水容器は、重く破損しやすいガラス製に代えて、合成樹脂製容器の使用が可能で、すべての対象物質に適用できる点を考慮するとPET製容器が優れていると考えられた。

キーワード：採水容器、ハロ酢酸類、非イオン界面活性剤、フェノール類、ホルムアルデヒド

序 文

水道水が満たさなければならない水質基準¹⁾項目の検査方法として、「水質基準に関する省令の規定に基づき厚生労働大臣が定める方法²⁾」（公定法）が告示されており、そのなかには、採水容器に関する規定もある。この採水容器については、多くの項目でガラス製のものが採用されているが、重く破損しやすい等の理由から、PEやPETなどの合成樹脂製容器への代替が望まれている。しかしながら、公定法にガラス製容器が採用された根拠等は示されておらず、厚生労働省に設置された水質基準逐次改正検討会においても、採水容器等に関する検討や議論は行われていない。

本研究は、4種の合成樹脂製容器を用いて搬送時の振動や温度による影響を比較し、水質検査試料の採水容器として合成樹脂製品が使用できるか検討した。

方 法

1. 合成樹脂製容器

100 mL、500 mL及び2Lの合成樹脂製容器を使用し、PP及びPEはサンブラテック製、PFAはニチアス製、PETはアズワン製及びその同等品を使用した。

2. 試薬

アセトン、アセトニトリル、酢酸エチル、トルエン及びメタノールは残留農薬試験・

PCB 試験用 (関東化学 (株)) を用いた。メチル-*tert*-ブチルエーテル (MTBE) は水質試験用 (関東化学 (株)) を用いた。4-(2-ピリジルアゾ)-レゾルシノール (PAR) は試験・研究用 (富士フイルム和光純薬工業 (株)) を用いた。N,0-ビス (トリメチルシリル)トリフルオロアセトアミド (BSTFA) はガスクロマトグラフ用 (富士フイルム和光純薬工業 (株)) を用いた。N-Methyl-N-Nitroso-N-nitrosoguanidine はジーエルサイエンス (株) を用いた。その他の試薬は特級 (富士フイルム和光純薬工業 (株)) 又は関東化学 (株) を用いた。

精製水は GenPure UV-TOC xCAD plus (サーモフィッシャーサイエンティフィック (株)) を用いて調製したものを使用した。水道水は当所の給水栓水を 30 分以上放水した後で使用した。

固相カラムは Oasis HLB Plus (日本ウオーターズ (株)) を用いた。

3. 標準液及び内部標準液

(1) ハロ酢酸類

混合標準原液は、試験・研究用ハロ酢酸 4 種混合標準液 (ジーエルサイエンス (株)) を用いた。この混合標準原液は、クロロ酢酸、ジクロロ酢酸及びトリクロロ酢酸 (以下、ハロ酢酸類という) をそれぞれ 1000 mg/L 含んでいる。これをメタノールで希釈し、各 10 mg/L に調製したものを混合標準液とした。

1,2,3-トリクロロプロパンは水質試験用 (関東化学 (株)) を用いた。これを MTBE で希釈して 5 mg/L に調製し、内部標準液とした。

(2) 非イオン界面活性剤

ヘプタオキシエチレンドデシルエーテルは、水質試験用 (富士フイルム和光純薬工業 (株)) を用いた。ヘプタオキシエチレンドデシルエーテル 0.1 g をメタノールに溶かして 100 mL としたものを標準原液とした。この標準原液をメタノールで希釈し、10 mg/L に調製したものを標準液とした。

(3) フェノール類

混合標準原液は、水質試験用フェノール

類 6 種混合標準液 (関東化学 (株)) を用いた。この混合標準原液は、フェノール、2-クロロフェノール、4-クロロフェノール、2,4-ジクロロフェノール、2,6-ジクロロフェノール及び 2,4,6-トリクロロフェノール (以下、フェノール類という) をそれぞれ 1000 mg/L 含んでいる。これをアセトンで希釈し、各 100 mg/L に調製したものを混合標準液とした。

アセナフテン-d₁₀ は水質試験用 (関東化学 (株)) を用いた。アセトンで希釈して 10 mg/L に調製し、内部標準液とした。

(4) ホルムアルデヒド

標準原液は、水質試験用ホルムアルデヒド標準液 (関東化学 (株)) を用いた。この標準原液をアセトニトリルで希釈し、10 mg/L に調製したものを標準液とした。

4. 装置及び測定条件

固相抽出装置はアクアトレース ASPE799 (ジーエルサイエンス (株))、アクアローダー SPL698T 及び SPL698 (ジーエルサイエンス (株)) を用いた。遠心分離器は KUBOTA5100 ((株) 久保田製作所)、pH メーターは HORIBA F-22 ((株) 堀場製作所)、振とう器は YS-8D ((株) ヤヨイ) 及び MW-1L (宮本理研工業 (株)) を用いた。各項目の測定条件等については表 1 及び表 2 に示した。

5. 検水の調製

検討に用いた検水は以下に示すとおり調製した。

検水①: 精製水に、表 3 に示した濃度となるように対象成分を添加した。合成樹脂製容器はハロ酢酸類及びホルムアルデヒドには 100 mL を、非イオン界面活性剤及びフェノール類には 2 L を用いた。

検水②: 残塩処理した水道水に、表 4 に示した濃度となるように対象成分を添加した。合成樹脂製容器はハロ酢酸類及びホルムアルデヒドには 500 mL を、非イオン界面活性剤及びフェノール類には 2 L を用いた。

なお、脱塩素剤はハロ酢酸類及びフェノール類にはアスコルビン酸ナトリウム

表1 フェノール類及びハロ酢酸の装置・測定条件

		フェノール類	ハロ酢酸類
GC/MS		Agilent 5975B (アジレント・テクノロジー(株))	Agilent 5973 (アジレント・テクノロジー(株))
分離カラム		ENV-5MS (0.25 mm i.d. × 30 m, 0.25 μm, 関東化学(株))	DB-1 (0.25 mm i.d. × 60 m, 1.0 μm, アジレント・テクノロジー(株))
注入方式		1 μL	2 μL
注入ガス (流量)		スプリットレス	スプリットレス
昇温条件		ヘリウム (1.0 mL/min定流量制御)	ヘリウム (1.0 mL/min定流量制御)
イオン化法		70°C (2 min) → 10°C/min → 185°C → 25°C/min → 280°C	40°C (5 min) → 10°C/min → 250°C
測定法		電子イオン化法 (70 eV)	電子イオン化法 (70 eV)
インターフェイス温度		選択イオン測定法	選択イオン測定法
		250°C	250°C
		フェノール	クロロ酢酸
		定量イオン : m/z 151 確認イオン : m/z 166	定量イオン : m/z 77 確認イオン : m/z 108
		2-クロロフェノール	ジクロロ酢酸
		定量イオン : m/z 185 確認イオン : m/z 200	定量イオン : m/z 83 確認イオン : m/z 85
		4-クロロフェノール	トリクロロ酢酸
		定量イオン : m/z 185 確認イオン : m/z 200	定量イオン : m/z 117 確認イオン : m/z 119
		2,4-ジクロロフェノール	1,2,3-トリクロロプロパン (内部標準物質)
		定量イオン : m/z 219 確認イオン : m/z 234	定量イオン : m/z 75 確認イオン : m/z 110
		2,6-ジクロロフェノール	
		定量イオン : m/z 219 確認イオン : m/z 234	
		2,4,6-トリクロロフェノール	
		定量イオン : m/z 253 確認イオン : m/z 268	
		アセナフテン-d ₁₀ (内部標準物質)	
		定量イオン : m/z 164 確認イオン : m/z 162	
測定イオン			

表2 非イオン界面活性剤及びホルムアルデヒドの装置・測定条件

		非イオン界面活性剤	ホルムアルデヒド
HPLC		LC-20AD ((株)島津製作所)	LC-20AD ((株)島津製作所)
分離カラム		X-Bridge C18 (4.6 mm i.d. × 250 mm, 5.0 μm, 日本ウオーターズ(株))	X-Bridge C18 (4.6 mm i.d. × 100 mm, 3.5 μm, 日本ウオーターズ(株))
注入量		25 μL	20 μL
カラム温度		40°C	40°C
流速		1.0 mL/min	1.0 mL/min
検出器		UV/VIS 510 nm	UV 360 nm
移動相		0.01 mol/L ホウ酸緩衝液・メタノール (62 : 38)	アセトニトリル・精製水 (3 : 7)

表3 保存容器の材質別回収率

項目名	成分名	添加濃度 (mg/L)	PET (%)	PP (%)	PE (%)	PFA (%)
ホルムアルデヒド	Formaldehyde	0.02	99	99	98	98
非イオン界面活性剤	Heptaoxyethylene dodecyl ether	0.005	100	96	102	90
	Phenol		93	92	97	101
	2-Chlorophenol		98	98	100	99
	4-Chlorophenol		98	95	96	97
フェノール類	2,6-Dichlorophenol	0.0005	103	98	96	99
	2,4-Dichlorophenol		100	97	97	99
	2,4,6-Trichlorophenol		100	98	94	97
	Monochloroacetic acid		98	95	95	95
ハロ酢酸類	Dichloroacetic acid	0.01	99	96	96	94
	Trichloroacetic acid		92	92	92	89

(n=2)

表4 妥当性評価結果

項目名	成分名	添加濃度 (mg/L)	添加した水	PET		PE	
				真度 (%)	併行精度 (%)	真度 (%)	併行精度 (%)
ホルムアルデヒド	Formaldehyde	0.008	水道水	92	1	93	1
非イオン界面活性剤	Heptaoxyethylene dodecyl ether	0.002	水道水	104	9	88	6
	Phenol			97	4	97	3
	2-Chlorophenol			99	3	99	4
	4-Chlorophenol			100	2	100	3
フェノール類	2,6-Dichlorophenol	0.0001	水道水	97	2	97	1
	2,4-Dichlorophenol			97	2	98	3
	2,4,6-Trichlorophenol			98	5	102	4
	Monochloroacetic acid			103	1	100	1
	Dichloroacetic acid	0.01*	水道水	103	3	98	2
	Trichloroacetic acid			104	5	102	4
ハロ酢酸類	Monochloroacetic acid			103	1	100	1
	Dichloroacetic acid		精製水	103	3	98	2
	Trichloroacetic acid			104	5	102	4
目標値	-	-	-	70~130	≧20	70~130	≧20
							≧25

*水道水の常在成分であるDichloroacetic acid及びTrichloroacetic acidの影響がないとみなせる濃度として各0.01mg/Lとした。

(検査員1名により1日2併行5日間実施)

を、非イオン界面活性剤には亜硫酸水素ナトリウムを、ホルムアルデヒドには塩化アンモニウムを用いた。

6. 試験溶液の調製

公定法に従い、以下に示すとおりに調製した。

(1) ハロ酢酸類

塩化ナトリウム 20 g を試験管に採り、ハロ酢酸類を含む検水 50 mL を量り取った。その後、硫酸 (1+1) 2 mL、MTBE 4 mL を試験管に入れ、2 分振とう後 10 分静置した。その MTBE 層を別の試験管に採り、無水硫酸ナトリウムを加え、脱水した MTBE 層 1 mL をバイアルに採り、内部標準液 20 μ L、ジアゾメタン 100 μ L を加えた。そのバイアルを混和し、室温にて 30 分静置後、40°C で 30 分加温したものを試験溶液とした。

(2) 非イオン界面活性剤

メタノール、精製水各 10 mL で活性化した固相カラムに、ヘプタオキシエチレンドデシルエーテルを含む検水 500 mL を通水した。通水後のカラムに窒素ガスを 40 分以上通気して乾燥させた後、通水と逆方向からトルエン 5 mL で溶出した。その後、溶出液にチオシアノコバルト (II) 酸アンモニウム溶液 2.5 mL、塩化カリウム 1.5 g を加え、5 分間振とう後、遠心分離した。そのトルエン層 4 mL を採り、PAR 試薬 750 μ L を加えた。3 分間緩やかに振とう後、遠心分離 (2500 rpm、10 分) を行い、トルエン層を除去したものを試験溶液とした。

(3) フェノール類

酢酸エチル 10 mL、メタノール、精製水各 10 mL で活性化した固相カラムに、フェノール類を含む検水 500 mL を通水した。通水後のカラムに窒素ガスを 30 分以上通気して乾燥させた後、通水と逆方向から酢酸エチル 5 mL で溶出した。その後、溶出液に無水硫酸ナトリウムを加え、脱水した。その溶出液 1 mL を GC バイアルに採り、BSTFA 50 μ L を加え、さらにマイクロシリンジで内部標準液を 2 μ L 添加した。混和して 1 時間以上静置したものを試験溶液とした。

(4) ホルムアルデヒド

ホルムアルデヒドを含む検水 10 mL にそれぞれリン酸 (1+4) 0.2 mL 及び DNPH 溶液 0.5 mL を加えて混和し、20 分間静置したものを試験溶液とした。

7. 妥当性評価

対象成分を定量下限濃度添加した水道水を容器に入れ、水道水質検査方法の妥当性評価ガイドライン³⁾ (以下、ガイドラインという) に従って、検査員 1 名が、同一の添加試料を 1 日に 2 併行、5 日間試験し、真度、併行精度及び室内精度を求めた。ガイドラインにおいては、添加を行う水は原則として検査対象物を含まない水道水となっているが、ハロ酢酸類においてジクロロ酢酸及びトリクロロ酢酸は水道水の常在成分であるため、その影響がないとみなせる濃度で実施した。また、それと同時に対象成分を添加した精製水を用いて定量下限 (0.002 mg/L) における評価を行った。

結果及び考察

1. 合成樹脂製容器による比較

4 種の合成樹脂製容器に対象物質を含んだ検水①を入れ、公定法に従って検査を行い、その結果を表 3 に示した。すべての項目について、4 種の合成樹脂製容器のいずれにおいても回収率は 90~103% と良好で対象物質の吸着は見られず、定量を妨害するような物質の溶出も確認されなかった。

2. 妥当性評価

4 種の合成樹脂製容器のうち、公定法その他項目において採水容器として採用されており、かつ、比較的安価な PE 及び PET を選択し、検水②を用いて妥当性評価を行い、その結果を表 4 に示した。妥当性評価にあたり、対象物質の添加濃度を定量下限値 (ハロ酢酸類では 0.002 mg/L、非イオン界面活性剤では 0.002 mg/L、フェノール類では 0.0001 mg/L、ホルムアルデヒドでは

0.008 mg/L) とし、真度、併行精度及び室内精度を算出した。PET 製容器を用いた場合、真度 92~104%、併行精度 1~9% 及び室内精度 2~15%、PE 製容器では、真度 88~102%、併行精度 1~6% 及び室内精度 2~15% となり、PE、PET とともに妥当性評価ガイドラインの目標値を満たす、良好な結果が得られた。

3. 採水後の保存及び搬送時における影響

PE 及び PET を用い、振動及び温度変化による影響について検討した。

(1) 振動

検水①を用い、4 時間振とう(120 rpm/min)したものと同時間静置したものの回収率を表 5 に示した。PET はすべての項目において良好な結果が得られたが、PE は非イオン界面活性剤において測定値のバラツキがみられた。

(2) 温度変化

検水①を用い、4℃、室温及び 40℃において、それぞれ 24 時間、48 時間及び 72 時間静置後の回収率を表 6 に示した。PET はすべての項目において良好な結果が得られたが、PE は(1)と同様に非イオン界面活性剤においてバラツキがみられた。

以上のことから、採水後の搬送時における影響として、振動及び温度変化について検討した結果、影響の少ない容器は PET であり、すべての項目で採水容器として適用可能であると考えられた。また、PE については非イオン界面活性剤を除く、ハロ酢酸類、フェノール類及びホルムアルデヒドにおいて適用できることが示唆された。

まとめ

水道水質検査試料の採水容器として、4 種の合成樹脂容器を用いて比較検討した。その結果、検討したすべての水道水質基準項目について、4 種の合成樹脂製容器のいず

れの容器においても回収率は良好であった。また、PET 製及び PE 製容器を用いて妥当性を評価した結果、いずれの対象項目でも妥当性評価ガイドラインの目標を満たしていた。採水後の搬送時における温度変化や振動による影響について検討したところ、PET 製容器では 4℃、室温での保存、あるいは振動については、すべての対象物質において吸着は見られず、定量を妨害するような物質の溶出も確認されなかった。しかし、PE 製容器に保存した場合は非イオン界面活性剤で回収率にバラつきが認められた。

以上のことを踏まえ、非イオン界面活性剤、フェノール類、ホルムアルデヒド及びハロ酢酸類の採水容器は、重く破損しやすいガラス製のものに代えて、合成樹脂製の使用が可能であり、すべての対象物質に適用できる点を考慮すると PET 製容器が優れていると考えられた。

本研究により、温度管理を徹底することで、採水容器として合成樹脂製容器が適用可能であることが示唆された。破損の可能性が低い合成樹脂製への変更は、容器の破損による試料損失を防ぐことができ、作業の安全性も確保できることから有用と考えられた。今後も公定法における問題点を提起し、その改善に寄与できる検討結果の蓄積が必要と考えられた。

文 献

- 1) 水質基準に関する省令：平成 15 年 5 月 30 日付け第 101 号厚生労働省令
- 2) 水質基準に関する省令の規定に基づき厚生労働大臣が定める方法：平成 15 年 7 月 22 日付け第 261 号厚生労働省告示
- 3) 水道水質検査方法の妥当性評価ガイドラインについて：平成 24 年 9 月 6 日付け健水発 0906 第 1 号厚生労働省通知

表5 振動による影響（回収率の比較）

項目名	成分名	添加濃度 (mg/L)	PET (%)		静置	振とう	静置	PE (%)
			振とう	静置				
ホルムアルデヒド	Formaldehyde	0.02	101	101	101	100	100	100
非イオン界面活性剤	Heptaoxyethylene dodecyl ether	0.005	101	95	95	44	124	124
フェノール類	Phenol	103	103	98	98	96	97	97
	2-Chlorophenol	89	89	91	98	98	100	100
	4-Chlorophenol	93	93	93	99	99	102	102
	2,6-Dichlorophenol	97	97	97	96	96	102	102
	2,4-Dichlorophenol	99	99	98	98	98	103	103
	2,4,6-Trichlorophenol	96	96	96	91	91	100	100
ハロ酢酸類	Monochloroacetic acid	96	96	98	91	91	95	95
	Dichloroacetic acid	94	94	99	96	96	96	96
	Trichloroacetic acid	94	94	92	92	92	92	92

(n=2)

表6 温度による経時変化（回収率の比較）

成分名	添加濃度 (mg/L)	PET (%)						PE (%)												
		4°C		室温		40°C		室温		4°C		40°C								
		24hr	48hr	72hr	24hr	48hr	72hr	24hr	48hr	72hr	24hr	48hr	72hr							
Formaldehyde	0.02	98	95	98	92	96	101	96	101	95	96	101	95	97	96	102	98	96	100	
Heptaoxyethylene dodecyl ether	0.005	111	101	107	89	95	104	92	108	105	96	47	110	101	101	50	118	111	153	136
Phenol	105	95	99	99	96	95	110	98	103	111	98	97	94	99	96	94	102	101	103	
2-Chlorophenol	99	91	96	96	94	96	98	95	98	95	100	98	98	99	96	97	96	94	89	
4-Chlorophenol	98	88	98	93	93	95	98	95	97	95	100	99	98	101	97	97	98	96	94	
2,6-Dichlorophenol	95	85	99	93	93	94	96	95	99	98	99	100	98	98	98	96	94	92	88	
2,4-Dichlorophenol	91	87	98	90	84	92	92	93	87	92	97	97	96	99	97	97	97	96	93	
2,4,6-Trichlorophenol	93	88	97	83	83	84	80	80	81	80	89	98	91	87	99	89	87	85	79	
Monochloroacetic acid	102	109	112	101	104	109	98	100	99	107	108	109	104	111	103	100	100	100	102	
Dichloroacetic acid	106	99	114	102	102	116	103	97	109	104	105	94	104	115	110	104	97	104		
Trichloroacetic acid	99	96	101	89	93	97	90	91	93	99	100	103	97	106	96	87	92	92		

(n=2)

Examination of water sample bottles for tap water quality test samples

Yasuko Hattori, Tomomi Harada, Chika Kato¹, Minae Watanabe, Takashi Tanahashi

¹ Present affiliation: Kasugai Health Center

We considered the influence by the vibration and the temperature at the time of conveying using a container made of four kinds of synthetic resin, *i. e.* the polypropylene (PP), the polyethylene (PE), the polyfurfuryl alcohol (PFA), and the polyethylene terephthalate (PET) in water quality test such as haloacetic acids, nonionic surfactant, phenols, and formaldehyde. As a result, satisfactory recoveries were obtained with all target substance by material of four kinds of synthetic resin, and it is not seen adsorption tendency of targets, no elution of substances that interfered with quantification was confirmed. In addition, when the effects of temperature changes and vibrations during transportation after water sampling were examined, the factors that affect the stability of all target substances for storage at 4 degrees and room temperature or vibrations are did not become for PET containers. However, when stored in PE containers, the recovery rate of nonionic surfactant varied. Based on the above, it was considered a PET container is excellent because it can be applied to all of the target substance, and synthetic resin containers are easier to handle than glass ones for heavy and easily damaged.

Key words : Water sample bottles, Haloacetic acids, Nonionic surfactant, Phenols, Formaldehyde

 他誌掲載論文抄録

Two Cases of Dengue Virus Type 2 (DENV-2) Infection in a Japanese Couple Returning from the Maldives during the 2018 Dengue Outbreak.

Yoshikazu Mutoh¹, Akinari Moriya², Yoshihiro Yasui, Noriko Saito, Tomohiko Takasaki³, Shotaro Hiramatsu¹, Tetsushi Izuchi¹, Takumi Umemura⁴, Toshihiko Ichihara¹

¹ Department of Infectious Diseases, Tosei General Hospital, ² Division of Quarantine and Sanitation, Chubu Airport Branch Quarantine Office, Nagoya Quarantine Station, ³ Kanagawa Prefectural Institute of Public Health, ⁴ Infection Control Team, Tosei General Hospital

Japanese Journal of Infectious Diseases 73(1):58-60, 2020

Annually, more than 1.2 million travelers from other countries visit the Maldives for sightseeing, business, and honeymoon. In 2018, the largest dengue fever outbreak occurred, affecting more than 3,200 people. During this outbreak, we encountered a newly married Japanese couple returning

from the Maldives on their honeymoon in October 2018, both were infected by the dengue virus type 2 during the travel. The number of imported dengue fever cases from the Maldives may increase; hence, physicians should stay up to date on dengue outbreak information worldwide.

Detection of a peramivir-resistant influenza B/Yamagata-lineage virus imported from Indonesia in Aichi, Japan, March 2019

Takashita E¹, Yasui Y, Nagata S¹, Morita H¹, Fujisaki S¹, Miura H¹, Shirakura M¹, Kishida N¹, Nakamura K¹, Kuwahara T¹, Sugawara H¹, Sato A¹, Akimoto M¹, Kaido T², Watanabe S¹, Hasegawa H¹ and The Influenza Virus Surveillance Group of Japan (Saito T, Saito N et al.)

¹Influenza Virus Research Center, National Institute of Infectious Diseases, ²Kariya Toyota General Hospital

Japanese Journal of Infectious Diseases 73(5):386-390, 2020

In Japan, four neuraminidase (NA) inhibitors—oseltamivir, peramivir, zanamivir, and laninamivir, as well as the cap-dependent endonuclease inhibitor baloxavir are used to treat influenza A and B virus infections. We have been monitoring the susceptibility of influenza viruses to these NA inhibitors nationwide since the 2010–11 season. Baloxavir was approved in February 2018 and became the most-used influenza antiviral during the 2018–19 season in Japan, which we also initiated a nationwide monitoring of the

baloxavir susceptibility of influenza viruses. We found that 2.3% (9/395) of A(H1N1)pdm09 and 8.0% (34/424) of A(H3N2) viruses possessed amino acid substitutions associated with reduced susceptibility to baloxavir in the polymerase acidic subunit (PA). However, we did not detect any influenza B viruses that were resistant to the NA inhibitors or baloxavir. In March 2019, we detected the first case of an NA inhibitor-resistant influenza B virus from a patient, who lives in Indonesia and returned briefly to Japan.

Influenza A(H1N1)pdm09 virus exhibiting reduced susceptibility to baloxavir due to a PA E23K substitution detected from a child without baloxavir treatment

Takashita E¹, Abe T², Morita H¹, Nagata S¹, Fujisaki S¹, Miura H¹, Shirakura M¹, Kishida N¹, Nakamura K¹, Kuwahara T¹, Mitamura K³, Ichikawa M⁴, Yamazaki M⁵, Watanabe S¹, Hasegawa H¹, and The Influenza Virus Surveillance Group of Japan (Yasui Y et al.)

¹Influenza Virus Research Center, National Institute of Infectious Diseases, ²Abe Children's Clinic, ³Eiju General Hospital, ⁴Ichikawa Children's Clinic, ⁵Zama Children's Clinic

Antiviral Research 180: 104828, 2020

Human-to-human transmission of PA I38 mutant influenza A(H3N2) viruses with reduced baloxavir susceptibility has been reported in Japan. In December 2019, we detected a PA E23K mutant A(H1N1)pdm09 virus from a child without baloxavir treatment. The PA E23K mutant virus exhibited reduced baloxavir susceptibility

but remained susceptible to neuraminidase inhibitors. Epidemiological data suggest possible transmission of this PA E23K mutant virus among humans, although its growth capability relative to that of the wild-type virus was reduced. Therefore, baloxavir susceptibility monitoring of influenza viruses is essential.

In vitro Characterization of Multidrug-Resistant Influenza A(H1N1)pdm09 Viruses Carrying a Dual Neuraminidase Mutation Isolated from Immunocompromised Patients

Takashita E¹, Fujisaki S¹, Yokoyama M², Shirakura M¹, Morita H¹, Nakamura K¹, Kishida N¹, Kuwahara T¹, Sato H², Doi I³, Sato Y⁴, Takao S⁵, Shimazu Y⁵, Shimomura T⁶, Ito T⁷, Watanabe S¹, Odagiri T¹ and The Influenza Virus Surveillance Group of Japan (Yasui Y et al.)

¹Influenza Virus Research Center, National Institute of Infectious Diseases, ²Pathogen Genomics Center, National Institute of Infectious Diseases, ³Ibaraki Prefectural Institute of Public Health, ⁴Tsukuba Memorial Hospital, ⁵Hiroshima Prefectural Technology Research Institute, ⁶National Hospital Organization Hiroshimanishi Medical Center, ⁷National Hospital Organization Kure Medical Center

Pathogens 9(9):725, 2020

Influenza A(H1N1)pdm09 viruses carrying a dual neuraminidase (NA) substitution were isolated from immunocompromised patients after administration of one or more NA inhibitors. These mutant viruses possessed an H275Y/I223R, H275Y/I223K, or H275Y/G147R substitution in their NA and showed enhanced cross-resistance to oseltamivir and peramivir and reduced susceptibility to zanamivir compared to single H275Y mutant viruses. Baloxavir could be a treatment option against the

multidrug-resistant viruses because these dual H275Y mutant viruses showed susceptibility to this drug. The G147R substitution appears to stabilize the NA structure, with the fitness of the H275Y/G147R mutant virus being similar or somewhat better than that of the wild-type virus. Since the multidrug-resistant viruses may be able to transmit between humans, surveillance of these viruses must continue to improve clinical management and to protect public health.

地方衛生研究所における AFP 病原体検査の現状と課題

四宮博人¹、山下育孝¹、水田克己²、岸本 剛³、高崎智彦⁴、皆川洋子、飯島義雄⁵、望月清⁶、梶原淳睦⁷、貞升健志⁸、横山栄二⁹

¹愛媛県立衛生環境研究所、²山形県衛生研究所、³埼玉県衛生研究所、⁴神奈川県衛生研究所、⁵神戸市環境保健研究所、⁶岡山県環境保健センター、⁷福岡県保健環境研究所、⁸東京都健康安全研究センター、⁹千葉県衛生研究所

病原微生物検出情報 41(2):27-28, 2020

世界保健機関(WHO)はポリオ対策の観点から急性弛緩性麻痺(AFP)の把握を求めており、わが国も2018年5月から5類感染症(全数把握)対象とされ、地方衛生研究所が病原体検査を担当している。検査項目等について多くの照会があったことから、地衛

研全国協議会感染症対策部会としてすべての地衛研を対象にAFP病原体検査に関するアンケートを実施した。今後行政検査として実施する病原体検査項目を整理する必要性があると考えられる。

2018年と2019年に検査診断されたチクングニア熱症例—愛知県

齋藤典子、皆川洋子、齋藤友睦、廣瀬絵美、中村範子、安達啓一、伊藤 雅、安井善宏、松本昌門

病原微生物検出情報 41(3):49-51, 2020

当所でチクングニアウイルス(CHKV)遺伝子を検出した7例(2016年3例、2019年4例)の遺伝子検査の概要とウイルス遺伝子分子疫学解析結果を報告した。チクングニアウイルス検出マニュアルに基づき Real-time RT-PCR法を実施したところ全7例の全血および1例の尿からCHKV遺伝子が検出された。分子疫学解析は、RT-nested PCR法によりE1領域全長(1320nt)を増幅でき

た6例について塩基配列を決定し系統樹解析を行った結果、1例が(Asian)遺伝子型、残り5例が東・中央・南アフリカ(ESCA)遺伝子型に分類された。CHKV遺伝子情報は少なく、アジア地域には詳細な遺伝子情報が入手できない国も存在することから、今後も輸入例の分子疫学解析の重要性は増すと考えられる。

2018/19シーズンに愛知県で分離されたクレード3C.3aに分類されるAH3亜型インフルエンザウイルス

齋藤友睦、齋藤典子、皆川洋子、伊藤 雅、安井善宏、松本昌門

病原微生物検出情報 41(3):51-52, 2020

2018/19 シーズンに全国地方衛生研究所で分離された AH3 亜型ウイルス株は、主に 3C.2a に属していたが、当所では主に欧米・中東から検出報告のあった 3C.3a 株が分離された。当所で 2018 年 42 週～2019 年 23 週までに AH3 亜型分離株 205 株のうち 40 株

の遺伝子解析の結果、2019 年 11 週～14 週に、県西部を除く比較的広範囲に位置する医療機関において採取された検体から 3C.3a 株が 7 株分離された。前後の分離株は 3C.2a 株であったことから 3C.3a 株の市中流行は一時的と推測された。

麻疹の抗体保有状況—2019 年度感染症流行予測調査（暫定結果）

多屋馨子¹、鈴木 基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 41(4):58-59, 2020

感染症流行予測調査における麻疹の感受性検査は 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を対象とし、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。2019 年度はわが国における麻疹排除認定（2015 年 3 月）4 年後の調査となり、抗体保有状況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。2019 年度の調査において、麻疹の抗

体保有率は 2014 年度調査以降、6 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、すべての年齢層に低い抗体価の者が存在することから、麻疹の排除状態を維持するため、引き続き麻疹患者が 1 人発生した時の迅速な感染拡大予防策に加え、渡航前の麻しん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。

2019 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、森野紗衣子¹、多屋馨子¹、新井 智¹、高梨さやか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 41(9):162-164, 2020

感染症流行予測調査における風疹感受性検査は 1971 年度からほぼ毎年、乳幼児から高齢者まで幅広い年齢層を対象とし、予防接種状況ならびに抗体保有状況について調査されてきた。2019 年度調査において、風疹含有ワクチンの接種歴が不明であった者

の割合は 20 歳以上群では男性 68%、女性 52%と高かった、風疹 HI 抗体保有率は 40～50 代男性が女性と比較して低く、本調査の継続により 2019 年から 3 年間実施されている風疹の定期接種（第 5 期）の効果を評価していくことが重要と考えられた。

パロキサビル未投与患者からのパロキサビル耐性PA E23K変異インフルエンザウイルスの検出

高下恵美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、秋元未来¹、佐藤 彩¹、菅原裕美¹、渡邊真治¹、長谷川秀樹¹、安倍 隆²、三田村敬子³、市川正孝⁴、山崎雅彦⁵、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あべこどもクリニック、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市川こどもクリニック、⁵座間小児科診療所

病原微生物検出情報 41(9): 169-170, 2020

国立感染症研究所と全国地方衛生研究所は共同で、2017/18シーズンからパロキサビルに対する耐性株サーベイランスを実施しており、日本国内でのパロキサビル使用量が急増した2018/19シーズンには、A (H1N1) pdm09亜型で2.3%、A (H3N2) 亜型で8.0%のPA I38変異ウイルスを検出した。2019年12月にPA E23K変異を持つA (H1N1)

pdm09ウイルスが検出された。この株はパロキサビルに対する感受性が7.3-9.4倍低下しており、パロキサビル感受性低下株と判定される。パロキサビル耐性変異ウイルスの発生動向の監視は、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、国内外に向けて速やかに情報提供を行っていく。

2019/20 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、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、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第一室・WHOインフルエンザ協力センター

病原微生物検出情報 41(11):195-200, 2020

2019/20 のインフルエンザシーズンは、日本を含め多くの国で A 型・B 型ウイルスともに流行したが A(H1N1)pdm09 の流行が A(H3N2)より大きかった。B 型ウイルスは主に Victoria 系統の流行であり、山形系統の流行は小さかった。国立感染症研究所では

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株総数の約 10%について分与を受け、ヘマグルチニン(HA)およびノイラミニダーゼ(NA)遺伝子系統樹解析および抗原性解析を行い、個々の成績は毎週地衛研に還元されている。

抗インフルエンザ薬耐性株の検出と性状

高下恵美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、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第一室・WHO インフルエンザ協力センター

病原微生物検出情報 41(11):200-201, 2020

国立感染症研究所では地方衛生研究所と共同で、薬剤耐性株サーベイランスを実施している。A(H1N1)pdm09 ウイルスでは、ノイラミニダーゼ (NA) 阻害剤について 2489 株を解析し、H275Y 変異を持つオセルタミビル・ペラミビル耐性株が 40 株 (1.6%) 検出された。バロキサビルについては、831 株

のうち PA に E23K 変異を持つ耐性変異株が 1 株 (0.12%) 検出された。A(H3N2) ウイルスでは、NA 阻害剤およびバロキサビル耐性変異株は検出されなかった。B 型では、NA 阻害剤、バロキサビルとも既知の耐性変異をもつ株は検出されなかった。

2019 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

森野紗衣子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 41(11):201-204, 2020

インフルエンザ感受性調査はインフルエンザ流行シーズン前かつワクチン接種前に採取された血清を用いてインフルエンザに対する国民の抗体保有状況を把握し、抗体保有率が低い年齢層に対する注意喚起等を目的としている。調査の結果、A(H1N1)pdm09

亜型および A(H3N2) 亜型では 5 歳～24 歳、B 型（山形系統）では 15～39 歳、B 型（Victoria 系統）では 10～59 歳の抗体保有率が他の年齢層と比較して高い傾向が見られた。

Single-Tube Multiplex Polymerase Chain Reaction for the Detection of Genes Encoding Enterobacteriaceae Carbapenemase.

Masanori Watahiki¹, Ryuji Kawahara², Masahiro Suzuki³, Miyako Aoki, Kaoru Uchida¹, Yuko Matsumoto⁴, Yuko Kumagai⁵, Makiko Noda⁶, Kanako Masuda⁷, Chiemi Fukuda⁸, Seiya Harada⁹, Keiko Senba¹⁰, Masato Suzuki¹¹, Mari Matsui¹¹, Satowa Suzuki¹¹, Keigo

Shibayama¹², Hiroto Shinomiya¹⁰

¹Department of Bacteriology, Toyama Institute of Health, ²Division of Microbiology, Osaka Institute of Public Health, ³Present Address: Department of Microbiology, School of Medicine, Fujita Health University, ⁴Microbiological Testing and Research Division, Yokohama City Institute of Public Health, ⁵Hygiene Division, Bacteriology Section, Akita Prefectural Research Center for Public Health and Environment, ⁶Department of Infectious Diseases, Gifu Prefectural Research Institute for Health and Environmental Sciences, ⁷Hiroshima Prefectural Technology Research Institute, Public Health and Environment Center, ⁸Department of Microbiology, Kagawa Prefectural Research Institute for Environmental Sciences and Public Health, ⁹Department of Microbiology, Kumamoto Prefectural Institute of Public Health and Environmental Science, ¹⁰Department of Microbiology, Ehime Prefectural Institute of Public Health and Environmental Science, ¹¹Antimicrobial Resistance Research Center, National Institute of Infectious Diseases, ¹²Department of Bacteriology II, National Institute of Infectious Diseases

Japanese Journal of Infectious Diseases 73(2):166-172, 2020

A multiplex PCR assay in a single tube was developed for the detection of the carbapenemase genes of Enterobacteriaceae. Primers were designed to amplify the following six carbapenemase genes: *bla_{KPC}*, *bla_{IMP}*, *bla_{NDM}*, *bla_{VIM}*, *bla_{OXA-48-like}*, and *bla_{GES}*. Of 70 *bla_{IMP}* variants, 67 subtypes were simulated to be PCR-positive based on in silico simulation and the primer-design strategy. After determining the optimal PCR conditions and performing in vitro assays, the performance of the PCR assay was evaluated using 51 and 91 clinical

isolates with and without carbapenemase genes, respectively. In conclusion, the combination of multiplex PCR primers and QIAGEN Multiplex PCR Plus Kit was used to determine the best performance for the rapid and efficient screening of carbapenemase genes in Enterobacteriaceae. The assay had an overall sensitivity and specificity of 100%. This PCR assay compensates for the limitations of phenotypic testing, such as antimicrobial susceptibility testing and the modified carbapenem inactivation method, in clinical and public health settings.

愛知県衛生研究所報

第 71 号

令和 3(2021)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)