

平成 29 年度

奈良県保健研究センター一年報

No.52

2017

ANNUAL REPORT OF
NARA PREFECTURAL INSTITUTE
OF HEALTH

奈良県保健研究センター

はじめに

平素は奈良県保健研究センターの業務の推進にご理解ご協力を賜り厚くお礼申し上げます。当センターは、県民生活における保健衛生面の安心・安全を確保するために、地域保健対策の一環として、県内保健所や、国の各機関及び全国の地方衛生研究所等と連携・協力を図りつつ、各種調査研究・試験検査・研修指導・情報提供を中心とした業務を実施しております。

感染症関係では、昨年度は冬期における季節性インフルエンザ大流行があったものの、他に大規模な感染症発生事例は無かったと安堵しています。しかし、国内では本年4月に麻しんの輸入感染と感染拡大事例が発生し、大きな問題となりました。交通網が発達した現在のグローバル化社会では、世界各地における病原体の脅威に対する準備が迫られている状況です。また、平成28年度からは感染症GLPも施行され、個々の検査の信頼性を確保するために、精度管理の維持・向上が求められております。

食品衛生関係では、腸管出血性大腸菌による広域的な食中毒事例の発生や、2020年東京オリンピック開催等による我が国の食品輸出促進を見据えた国際標準的な食品衛生管理が求められている等様々な問題に対応するため、平成30年6月に食品衛生法が改正されました。今回の改正により、広域的な食中毒事案への対策強化、HACCPによる衛生管理の制度化、食品用器具・容器包装原材料のポジティブリスト制度導入、営業許可制度の見直し等が図られています。それに伴い、施行後約20年が経過している食品GLPにおいても、国際的整合性の観点から登録検査機関等が認証を受けているISO/IEC17025を基本とした制度導入について本格的に検討されており、今後更なる検査業務の質的向上に向けた取組みが必要になると思われま

さて、平成29年度は、11月に本県で初めて「全国衛生化学技術協議会年会」を奈良春日野国際フォーラム 薨〜I・RA・KA〜で開催いたしました。メイン会場に能楽ホールを使用し、例年とは異なる趣で、記憶に残る年会となっております幸いです。

研究関係について、理化学分野では、主に動物用医薬品や残留農薬の検査項目拡大を目指した一斉分析法について検討いたしました。細菌分野では、レジオネラ属菌の迅速遺伝子検査法における阻害物質の検証や、各菌種での遺伝子検査の充実を図りました。ウイルス分野では、感染症発生動向調査の実施に加え、ウイルス遺伝子の長鎖配列解析の新技术に取り組み、各種ウイルスの検出状況等についても調査を実施いたしました。

今後とも、我々の任務である行政検査を適正に実施するために、また設置目的である地域の科学的・技術的中核機関として機能を継承するため、検査技術の維持・向上に努めていきたいと考えております。

この度、平成29年度に実施した試験検査、精度管理、調査研究等の業務を取りまとめ、年報が出来上がりましたのでお届け致します。

今後とも、関係各位のご理解、ご支援及びご協力を賜りますようお願い致します。

平成30年10月

奈良県保健研究センター
所長 堀 重 俊

目 次

第1章 総 説

1. 沿 革	1
2. 組 織	1
1) 機構と事務分掌	1
2) 職員構成	2
3) 人事記録	2
4) 職員名簿	3
3. 施 設	4
1) 土 地	4
2) 建 物	4
3) 保健研究センター庁舎配置図	5
4. 新規購入備品	6
5. 予算及び決算	6
6. 企画情報関連	8
1) 職員の出席した学会，研究会，講習会，研修会等	8
2) 施設見学	10
3) 保健研究センター職員を講師とする講演会，技術・研修指導	10
4) 奈良県保健研究センター研究発表会	11
5) 保健研究センターホームページによる情報提供	11
6) 夏休みこども科学教室	11
7) 厚生労働科学研究事業への研究協力	12
8) 奈良県公衆衛生学会への協力	12
9) 信頼性確保業務	12
10) 健康危機事象模擬訓練	14
11) 外部評価制度	14
7. 第54回全国衛生化学技術協議会年会の開催	16

第2章 試験・検査概況

食品担当	19
細菌担当	24
ウイルス・疫学情報担当	31
奈良県感染症情報センター	

第3章 調査研究・報告

第1節 報 告

1. 健康危機事象のための QuEChERS 法による食品中の抗凝固剤系殺鼠剤一斉分析法の検討 米田正樹・北岡洋平・樋上 絢・西山隆之・山下浩一・堀 重俊・岡山明子	39
2. UPLC-MS/MS による畜産物中からのテトラサイクリン系抗生物質の一斉分析法の検討 北岡洋平・米田正樹・樋上 絢・西山隆之・山下浩一・堀 重俊	44
3. 県内で分離されたカルバペネム耐性腸内細菌科細菌 (CRE) における薬剤耐性遺伝子検出状況 吉田孝子・田邊純子・橋田みさを・内田美枝	49
4. 奈良県における腸管出血性大腸菌検出状況：2017 年度 佐伯美由紀・田邊純子・橋田みさを・内田美枝	53
5. レジオネラ属菌の LAMP 法における反応阻害物質の影響軽減に関する検討 辻本真弓・久野翔平・河口友理・佐伯美由紀・吉田孝子・田邊純子・橋田みさを・内田美枝	56
6. 奈良県におけるノロウイルス胃腸炎集団発生について—2016/2017 シーズン— 藤谷美沙子・尾西美咲・千葉翔子・稲田真知・中野 守・榮井 毅	59
7. 感染症発生動向調査による患者発生状況：平成 29 年 (2017 年) 藤谷美沙子・稲田真知・尾西美咲・千葉翔子・中野 守・榮井 毅	62
第 2 節 資 料	
1. UPLC-MS/MS による下痢性貝毒の分析法の検討村上友規・仲井菜都希・安藤尚子・堀 重俊	69
2. 奈良県における結核菌の分子疫学調査 (2017 年度)田邊純子・佐伯美由紀・橋田みさを・内田美枝	71
3. ノロウイルス GII.17 および GII.4 の VP1 領域解析について藤谷美沙子・稲田真知・尾西美咲・千葉翔子・中野 守・榮井 毅	73
4. 風しんウイルスの検出と遺伝子型別—平成 29 (2017) 年—稲田真知・尾西美咲・藤谷美沙子・千葉翔子・中野 守・榮井 毅	75
5. 奈良県におけるヒトパレコウイルスの検出状況 2010～2017 年稲田真知・尾西美咲・藤谷美沙子・千葉翔子・中野 守・榮井 毅	77
第 3 節 他誌掲載論文の要旨	79
第 4 節 報告書の要旨	81
第 5 節 研究発表の抄録	83
奈良県保健研究センター年報投稿規定	87

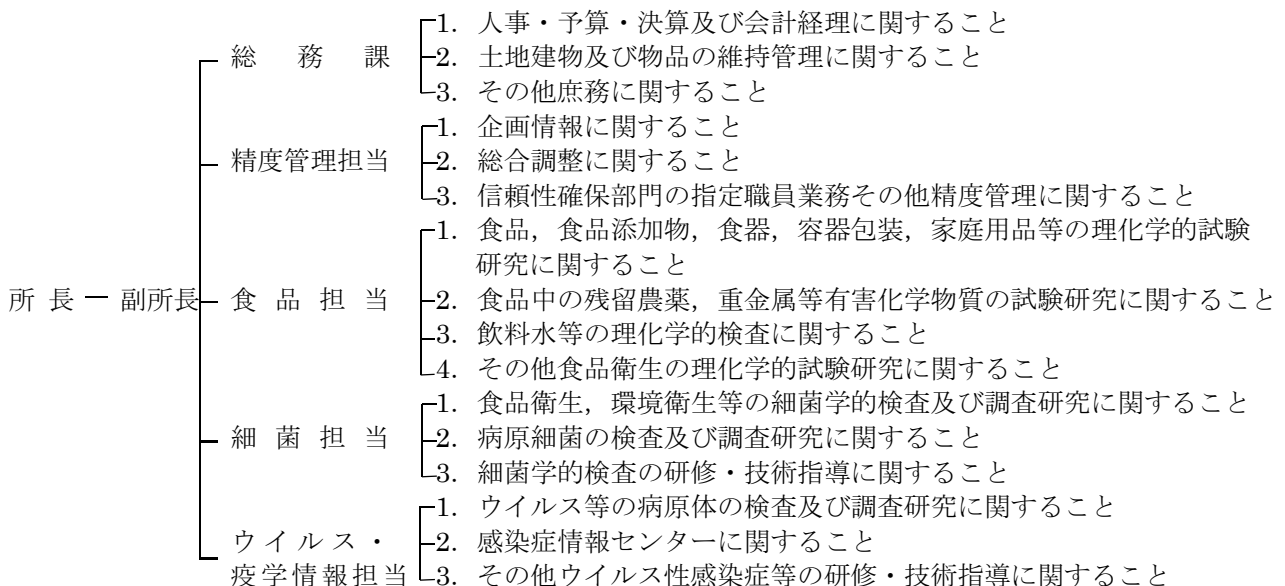
第1章 総説

1. 沿革

- (1) 昭和 23 年 6 月 25 日 奈良県告示第 167 号を以て、奈良市登大路町奈良県庁内に奈良県衛生研究所を設置
- (2) 昭和 28 年 3 月 31 日 奈良県条例第 11 号を以て、奈良市油阪町に庁舎を新築移転
- (3) 昭和 41 年 3 月 30 日 奈良市西木辻八軒町に奈良保健所との合同庁舎を新築移転
- (4) 昭和 46 年 3 月 24 日 奈良市大森町に独立庁舎を新築移転
- (5) 昭和 46 年 5 月 1 日 奈良県行政組織規則の改正により、総務課、環境公害課、予防衛生課の 3 課を設置
- (6) 昭和 48 年 4 月 1 日 奈良県行政組織規則の改正により、食品化学課を新設
- (7) 昭和 50 年 2 月 28 日 前庁舎に接して約 1, 276 m²の庁舎を新築
- (8) 昭和 62 年 4 月 1 日 奈良県行政組織規則の改正により、総務課、公害課、環境課、食品化学課、予防衛生課の 5 課制に編成替え
- (9) 平成 2 年 4 月 1 日 奈良県行政組織規則の改正により、総務課、大気課、水質課、食品生活課、予防衛生課に編成替え
- (10) 平成 12 年 4 月 1 日 県感染症情報センターを所内に設置
- (11) 平成 14 年 4 月 1 日 奈良県行政組織規則の改正により、奈良県保健環境研究センターと名称変更し総務課と試験研究グループ(大気環境担当、水環境担当、食品担当、ウイルス・細菌担当)に編成替え
- (12) 平成 18 年 4 月 1 日 奈良県行政組織規則の改正により、総務課、精度管理担当、大気環境担当、水環境担当、食品担当、ウイルス・細菌担当に編成替え
- (13) 平成 22 年 4 月 1 日 技術担当を置く
- (14) 平成 23 年 4 月 1 日 技術担当を解く
- (15) 平成 25 年 4 月 1 日 桜井市粟殿に新築移転、奈良県行政組織規則の改正により名称を奈良県保健研究センターに改め、総務課、精度管理担当、食品担当、細菌担当、ウイルス・疫学情報担当に編成替え
大気環境担当及び水環境担当は奈良県景観・環境総合センター大気係、水質係に編成替え

2. 組織

1) 機構と事務分掌 (平成 30 年 4 月 1 日現在)



2) 職 員 構 成 (平成 30 年 4 月 1 日現在)

区 分	事務職員	技 術 職 員				計
		薬 学	獣医学	理工農学	臨床検査学	
所 長		1				1
副所長(兼)精度管理担当		1				1
総 務 課	2					2
精 度 管 理 担 当	1				1	2
食 品 担 当		2		6	1	9
細 菌 担 当		4	1	2	1(1)	8(1)
ウイルス・疫学情報担当		4		1	1	6
計	3	12	1	9	4(1)	29(1)

()は育休代替職員

3) 人 事 記 録

退職及び転出

30. 3. 31	所 長	福 田 忠 明	退職
	副 所 長	岡 山 明 子	退職
	総 括 研 究 員	橋 田 み さ を	退職
	主 事	村 田 弘	退職
30. 4. 1	総 括 研 究 員	山 下 浩 一	景観・環境総合センターへ
	主 任 主 査	岡 田 恵 江	奈良文化会館へ

転入及び昇格

30. 1. 1	技 師	平 城 均	新規採用 (育休代替)
30. 2. 1	主 事	村 田 弘	新規採用 (育休代替)
30. 4. 1	所 長	堀 重 俊	統括主任研究員から
	副 所 長	榮 井 毅	統括主任研究員から
	統括主任研究員	立 本 行 江	薬務課から
	統括主任研究員	稲 田 眞 知	総括研究員から
	総 括 研 究 員	米 田 正 樹	指導研究員から
	総 括 研 究 員	田 邊 純 子	指導研究員から
	主 任 主 査	米 川 由 美	農業水産振興課から
	主 任 研 究 員	森 村 実 加	主査から
	主 事	南 浦 茉 奈	新規採用
	技 師	松 本 朋 子	新規採用

4) 職 員 名 簿

(平成 30 年 4 月 1 日現在)

課・係名	職 名	氏 名	課・係名	職 名	氏 名		
総務課 総務係	所 長	堀 重 俊	細菌担当 細菌チーム	統括主任研究員	内 田 美 枝		
	副 所 長	榮 井 毅		総 括 研 究 員	田 邊 純 子		
	課 長	鈴 木 小百合		指 導 研 究 員	吉 田 孝 子		
	(兼)係 長	鈴 木 小百合		主 任 研 究 員	森 村 実 加		
	主 任 主 査	米 川 由 美		主 任 研 究 員	佐 伯 美 由 紀		
	精度管理担当	(兼)統括主任研究員		榮 井 毅	主 任 研 究 員	辻 本 真 弓	
		総 括 研 究 員		森 居 京 美	主 任 技 師	河 口 友 理	
		主 査		本 間 美 樹	主 任 技 師	久 野 翔 平	
	食 品 担 当 食品化学チーム	統括主任研究員		立 本 行 江	ウイルス・ 疫学情報担当 ウイルス・ 疫学情報チーム	技 師	平 城 均
		総 括 研 究 員		安 藤 尚 子		統括主任研究員	稲 田 眞 知
主 任 研 究 員		村 上 友 規	総 括 研 究 員	中 野 守			
生活化学チーム	主 任 主 事	仲 井 菜 都 希	主 任 主 事	千 葉 翔 子			
	総 括 研 究 員	米 田 正 樹	主 任 技 師	藤 谷 美 沙 子			
	指 導 研 究 員	西 山 隆 之	技 師	尾 西 美 咲			
	主 任 研 究 員	樋 上 絢	技 師	松 本 朋 子			
	主 任 研 究 員	北 岡 洋 平					
	主 事	南 浦 茉 奈					

3. 施 設

1) 土 地

(平成 30 年 4 月 1 日現在)

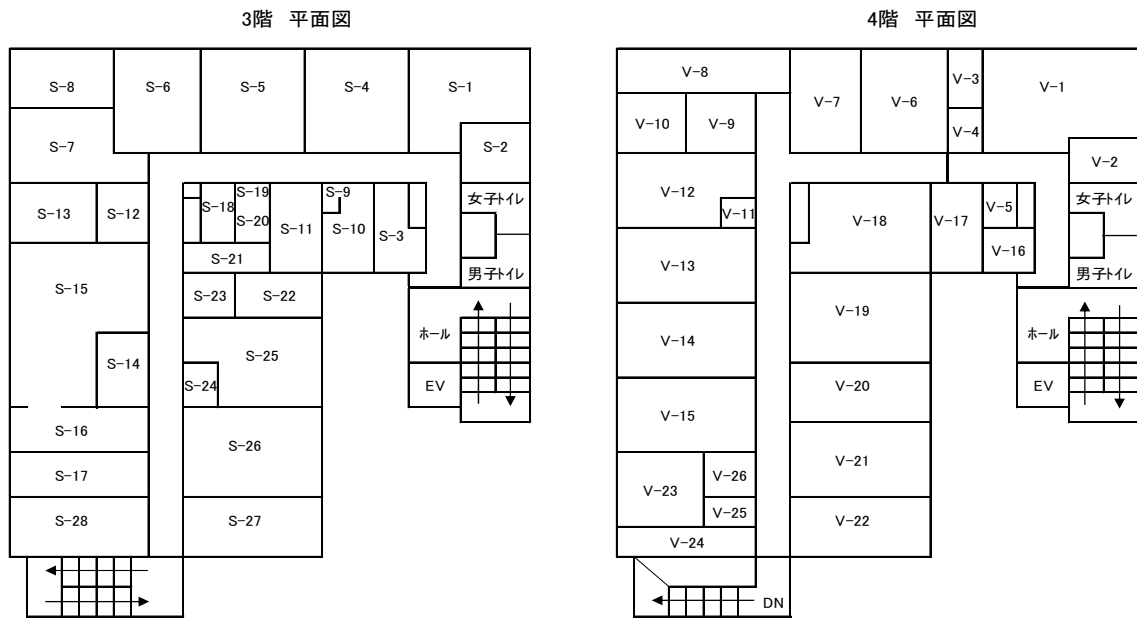
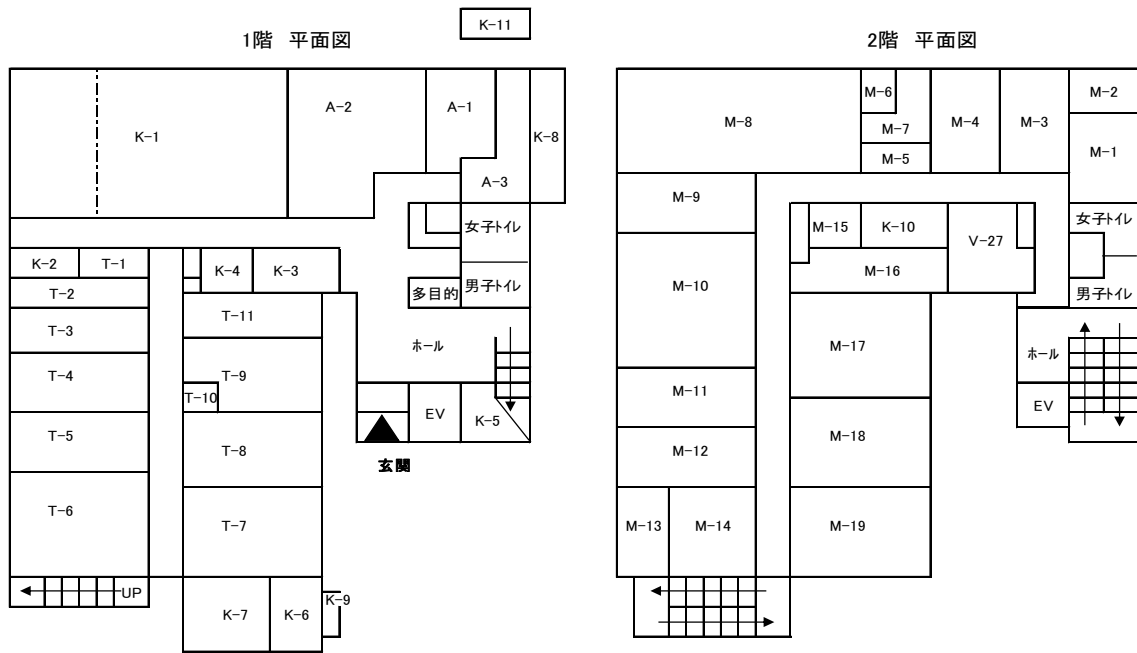
地 名	地 目	面 積	現在の状況	所 有 者
桜井市栗殿 1000 番地	宅 地	3,709.88 m ²	宅 地	奈 良 県

2) 建 物

(平成 30 年 4 月 1 日現在)

施 設	面 積	使用年月日	建物経過年数	所 有 者
本館鉄筋コンクリート 4階	3,264.17 m ²	平成 25 年 4 月 1 日	5 年	奈 良 県
(本 館 1 階)	(860.13)			
(本 館 2 階)	(786.77)			
(本 館 3 階)	(786.77)			
(本 館 4 階)	(786.77)			
(本 館 P1 階)	(43.73)			
倉 庫	7.00	平成 25 年 4 月 1 日	5 年	

3) 保健研究センター庁舎配置図



- | | | | |
|----------------|------------------|------------------|----------------------|
| A-1 所長室 | M-1 水質検体受付室 | S-1 食品担当執務室 | V-1 細菌・ウイルス疫学情報担当執務室 |
| A-2 総務課事務室 | M-2 水質検体保管室 | S-2 理化学GLP管理室 | V-2 感染症情報センター |
| A-3 倉庫 | M-3 水質器具器材庫 | S-3 食品検体受付室 | V-3 微生物GLP管理室 |
| K-1 会議室 | M-4 水質機器分析室 I | S-4 食品検査室 I | V-4 微生物検体受付室 I |
| K-2 委託業者控室 | M-5 環境天秤室 | S-5 食品検査室 II | V-5 微生物検体受付室 II |
| K-3 更衣室(女) | M-6 倉庫 I | S-6 食品検査室 III | V-6 食品細菌検査室 I |
| K-4 更衣室(男) | M-7 倉庫 II | S-7 食品検査室 IV-1 | V-7 食品細菌検査室 II |
| K-5 消化ポンプ室 | M-8 水質検査室 | S-8 食品検査室 IV-2 | V-8 微生物低温室 |
| K-6 廃棄物保管庫 I | M-9 BOD測定室 | S-9 食品検査前室 | V-9 微生物器具器材庫 |
| K-7 廃棄物保管庫 II | M-10 水質機器分析室 II | S-10 食品検査室 V-1 | V-10 保管室 |
| K-8 ポンベ置場 I | M-11 水質機器分析室 III | S-11 食品検査室 V-2 | V-11 ウイルス検査前室 |
| K-9 ポンベ置場 II | M-12 水質機器分析室 IV | S-12 食品選心機室 | V-12 ウイルス検査室 I |
| K-11 ポンベ倉庫 | M-13 水質機器分析室 V | S-13 食品洗浄室 | V-13 ウイルス検査室 II |
| T-1 倉庫 I | M-14 水質機器分析室 VI | S-14 標準品調製室 | V-14 ウイルス検査室 III |
| T-2 大気器具器材庫 | M-15 水質恒温室 | S-15 農業検査室 I | V-15 ウイルス検査室 IV |
| T-3 大気機器分析室 I | M-16 環境洗浄室 | S-16 農業検査室 II | V-16 微生物洗浄室 |
| T-4 大気測定前処理室 | M-17 水質前処理室 I | S-17 食品器具器材庫 | V-17 食品準備室 |
| T-5 大気機器分析室 II | M-18 水質前処理室 II | S-18 食品冷蔵室 | V-18 病原細菌検査室 I |
| T-6 大気検査室 I | M-19 水質前処理室 III | S-19 食品冷凍前室 | V-19 病原細菌検査室 II |
| T-7 大気検査室 II | V-27 水質細菌検査室 | S-20 食品冷凍室 | V-20 病原細菌検査室 III |
| T-8 放射能測定前処理室 | K-10 図書室 | S-21 倉庫 I | V-21 病原細菌検査室 IV |
| T-9 放射能測定室 | | S-22 倉庫 II | V-22 保管室 |
| T-10 保管室 | | S-23 食品天秤室 | V-23 高度安全実験室 |
| T-11 騒音評価室 | | S-24 コンプレッサー室 | V-24 準備室 |
| | | S-25 食品機器分析室 I | V-25 エアロック室 |
| | | S-26 食品機器分析室 II | V-26 機械室 |
| | | S-27 食品機器分析室 III | |
| | | S-28 食品機器分析室 IV | |

4. 新規購入備品 (単価 20 万円以上)

品名	規格	購入年月日
サーマルサイクラー	TC-96GHBC	平成 29 年 5 月 19 日
フレークアイス製氷機	SIM-F140A	平成 29 年 6 月 20 日
超音波ピペット洗浄器	UCL-1730N	平成 29 年 9 月 7 日

5. 予算及び決算 (平成 29 年度)

歳入

(単位 円)

款	項	目	節	説明	予算額	収入
使用料及び 手数料	手数料	保健研究 センター 手数料	保健研究 センター 手数料	1. 食品検査	962,010	761,330
				(1) 一般食品検査	695,330	502,480
				(2) 食品細菌検査	266,680	258,850
				2. 水質検査	4,136,940	3,758,750
				(1) 飲料水検査	3,365,690	2,919,630
				(2) プール水検査	771,250	839,120
				3. 細菌検査	1,040,280	1,117,920
				(1) 結核菌検査	160,920	286,080
				(2) 培養・同定	879,360	831,840
				4. ウイルス検査	1,249,200	1,152,040
5. 臨床病理検査						
6. 衛生害虫検査						
7. その他の試験	1,118,770	949,870				
8. 証明書発行	1,230	4,920				
計					8,508,430	7,744,830

歳 出

(単位 円)

款 ・ 項 ・ 目	予 算 額	支 出 額	残 高
(款) 医療政策費	34,219,994	33,806,144	413,850
(項) 保健予防費			
(目) 保健予防対策費	34,219,994	33,806,144	413,850
(目) 保健研究センター費	2,981,000	2,978,380	2,620
	31,238,994	30,827,764	411,230
(款) くらし創造費	10,132,000	10,127,612	4,388
(項) 消費生活安全費			
(目) 消費生活安全対策費	10,132,000	10,127,612	4,388
(目) 生活衛生指導費	9,823,000	9,821,887	1,113
(目) 動物愛護費	187,000	183,739	3,261
	122,000	121,986	14
合 計	44,351,994	43,933,756	418,238

* 保健研究センター執行分のみ計上 (人件費・大型備品・営繕費を含まず)

6. 企画情報関連

1) 職員の出席した学会、研究会、講習会、研修会等

年・月・日	内 容	開 催 地	担 当
H29. 5.22~23	ライフテクノロジーズジャパンセミナー・ハンズオントレーニング	東 京	ウイルス・疫学情報
5.24	島津マイコトキシン分析ワークショップ	京 都 市	食 品
5.26	e-Loopampスクール2017第一回	大 阪 市	細 菌
5.30	Dionex IC技術説明会 2017	大 阪 市	食 品
5.30	異物解析セミナー 2017	京 都 市	食 品
5.30~31	MassLynx 基礎操作コース	大 阪 市	食 品
6. 1	平成29年度病原体等の包装・運搬講習会	大 阪 市	細 菌
6.21	平成 29 年度衛生関係職員研修会	大和郡山市	食 品 細 菌 ウイルス・疫学情報
6.21	食品衛生検査セミナー	津 市	細 菌
6.27~28	衛生微生物技術協議会第 38 回研究会	東 京	細 菌 ウイルス・疫学情報
6.29	阪神地区感染症懇話会第 1 回講演会	大 阪 市	ウイルス・疫学情報
7. 1	厚生労働科学研究費補助金「成人の侵襲性細菌感染症サーベイランスの構築に関する研究」第 1 回班会議	東 京	細 菌
8. 3	平成 29 年度リスクアセスメントセミナー	大 阪 市	食 品
8.23	初めてのリアルタイム PCR セミナー	大 阪 市	食 品
9. 4	第 28 回奈良県食品安全・安心懇話会	奈 良 市	食 品 ウイルス・疫学情報
9. 8	平成 29 年度滋賀県衛生科学センター講習会	大 津 市	ウイルス・疫学情報
9.19	タカラバイオ技術セミナー「q-PCR の基礎」	京 都 市	細 菌
9.25	平成 29 年度地方衛生研究所全国協議会近畿支部ウイルス部会研究会	和 歌 山 市	ウイルス・疫学情報
9.26~27	日本防菌防黴学会第 44 回年次大会	豊 中 市	細 菌
10. 2	厚生労働科学研究費補助金「食品衛生検査を実施する試験所における品質保証システムに関する研究」第 1 回班会議及び研修会	東 京	食 品
10. 5	ウォーターズ MS フォーラム	大 阪 市	食 品
10. 5~ 6	第 38 回日本食品微生物学会学術総会	徳 島 市	細 菌
10. 8	平成 29 年度獣医学術近畿地区学会	堺 市	細 菌
10.19	全国環境衛生職員団体協議会・事例研究発表会	四 日 市 市	細 菌
10.25	大阪府感染症情報解析委員会	大 阪 市	ウイルス・疫学情報
10.27	GCMS-TQ8050 見学	京 都 市	食 品
10.27	平成 29 年度奈良県予防接種関係機関連絡会	橿 原 市	ウイルス・疫学情報
11. 1	残留農薬分析セミナー 2017 (関西)	桜 井 市	食 品
11. 2	平成 29 年度地方衛生研究所全国協議会近畿支部理化学部会研修会	堺 市	食 品
11. 6~24	国立保健医療科学院【短期研修】33. 細菌研修	武蔵村山市	細 菌
11.16	第 38 回奈良県公衆衛生学会	橿 原 市	総 務 課 各 担 当

11.17	平成29年度地方衛生研究所全国協議会近畿支部細菌部会研修会	大 阪 市	細 菌
11.21~22	第54回全国衛生化学技術協議会年会	奈 良 市	総 務 課 各 担 当
11.24	平成29年度「地域保健総合推進事業」全国疫学情報ネットワーク構築会議	東 京 市	ウイルス・疫学情報
11.28	平成29年度奈良県感染症発生動向調査事業第1回感染症関連講演会	橿 原 市	細 菌 ウイルス・疫学情報
12. 1	平成29年度登録検査機関及び食品衛生検査施設向け講習会	大 阪 市	食 品
12. 1	平成29年度地方衛生研究所全国協議会近畿支部自然毒部会研究発表会	大 津 市	食 品
12. 8	平成29年度地方衛生研究所全国協議会近畿支部疫学情報部会定期研究会	神 戸 市	細 菌 ウイルス・疫学情報
12.15	平成29年度奈良県感染症発生動向調査事業第2回感染症関連講演会	橿 原 市	細 菌 ウイルス・疫学情報
H30. 1. 9	阪神地区感染症懇話会第2回講演会	大 阪 市	ウイルス・疫学情報
1.17	シガトキシン関連資料展示記念ワークショップ	仙 台 市	食 品
1.25~26	第31回公衆衛生情報研究協議会総会・研究会	和 光 市	ウイルス・疫学情報
1.26	平成29年度地方衛生研究所全国協議会衛生化学分野研修会	東 京 市	食 品
1.26	平成29年度地方感染症情報センター担当者会議	和 光 市	ウイルス・疫学情報
2. 1	厚生労働科学研究費補助金「食品衛生検査を実施する試験所における品質保証システムに関する研究」第3回班会議	東 京 市	食 品
2. 1	平成29年度生活衛生関係技術担当者研修会	東 京 市	細 菌
2. 4	厚生労働科学研究費補助金「成人の侵襲性細菌感染症サーベイランスの構築に関する研究」第2回班会議	東 京 市	細 菌
2. 7~ 8	次期感染症サーベイランスシステム研修会	東 京 市	ウイルス・疫学情報
2. 9~11	第29回日本臨床微生物学会学術大会	岐 阜 市	細 菌
2.15	レジオネラ属菌検査技術研修	大 阪 市	細 菌
2.22	GC 及び HPLC 分析基礎セミナー	大 阪 市	食 品
2.27~28	平成29年度希少感染症診断技術研修会	東 京 市	細 菌 ウイルス・疫学情報
3. 1~ 2	第23回世界結核デー記念国際結核セミナー 平成29年度全国結核対策推進会議	東 京 市	細 菌
3. 8	平成29年度奈良県・奈良市コホート検討会	奈 良 市	細 菌
3. 9	日本食品衛生学会 近畿地区勉強会	大 阪 市	食 品
3.14	第29回奈良県食品安全・安心懇話会	奈 良 市	食 品 細 菌 ウイルス・疫学情報
3.14	2017年度レジオネラ属菌検査セミナー	東 京 市	細 菌
3.23	腸管出血性大腸菌の遺伝子型検査研修会	東 京 市	細 菌

(各担当：精度管理，食品，細菌，ウイルス・疫学情報)

2) 施設見学

年・月・日	見学者	人数	担当
H29. 4.20	堺市衛生研究所	2名	総務課
9.26	奈良県立医科大学医学部看護学科	30名	各担当
H30. 2. 2	独立行政法人国際協力機構東京国際センター JICA 国際研修	9名	ウイルス・疫学情報
2.15	堺市衛生研究所 堺市建築都市局建築部	5名	総務課

(各担当：食品，細菌，ウイルス・疫学情報)

3) 当センター職員を講師とする講演会，技術・研修指導

(1) 講演会

年・月・日	会等の名称	内容	発表者
H29.7. 6	生活衛生担当者会議	レジオネラ属菌検査法	細菌 担当：吉田
8.20	新村 新栄会	なら県政出前トーク 「自然毒中毒について」	食品 担当：堀，安藤
9.13	東安堵サロン	なら県政出前トーク 「感染性ウイルスについて」	ウイルス・疫学情報 担当：榮井
11. 7	奈良県消費生活センター 平成29年度くらしの講座	なら県政出前トーク 「感染性ウイルスについて」	ウイルス・疫学情報 担当：榮井
11.28	斑鳩町教育委員会事務局 生涯学習課	なら県政出前トーク 「自然毒中毒について」	食品 担当：堀，村上

(2) 研修指導

年・月・日	内容	対象者	人数	担当
H29. 5.25	県内保健所保健師研修	県庁保健予防課， 県内保健所保健師	17名	細菌 ウイルス・疫学情報
9.12～15	平成29年度奈良県立医科大学 健康政策医学実習	奈良県立医科大学医学部 4年生	15名	各担当
10.31	エルシニア・エンテロコリチカ	地域医療振興協会 市立奈良病院	1名	細菌
H30. 1.19	平成29年度衛生関係職員スキル アップ研修会	消費・生活安全課， 県内保健所衛生関係職員	14名	各担当

(各担当：食品，細菌，ウイルス・疫学情報)

4) 奈良県保健研究センター研究発表会

(1) 平成 29 年 6 月 23 日

発表者	発表演題
中野 守	蚊媒介感染症に関する蚊の調査について
米田 正樹	健康危機管理事象対応のための食品中の抗凝固剤系殺鼠剤一斉分析法の検討
吉田 孝子	レジオネラ属菌における迅速検査法の検討について

(2) 平成 30 年 2 月 23 日

発表者	発表演題
樋上 絢	迅速・簡便な残留農薬一斉分析法の検討
久野 翔平	リステリア・モノサイトゲネス検査について
尾西 美咲	奈良県における A 群ロタウイルスの検出状況 (2016/2017 シーズン)

5) 保健研究センターホームページによる情報提供

平成 13 年 2 月 1 日より奈良県保健環境研究センター（当時）のホームページを公開し、情報提供を行っている。平成 25 年 4 月 1 日より大気、水質に関する環境部門が分離され、保健研究センターホームページとなったが、引き続き当センター研究発表会の概要を掲載する等情報提供を行った。

ホームページのアドレス（平成 29 年 4 月 1 日現在）

奈良県保健研究センター：<http://www.pref.nara.jp/4827.htm>

6) 夏休みこども科学教室

小学 4 年から 6 年生を対象に夏休みこども科学教室を開催した。

日 時	平成 29 年 7 月 29 日 午後 1 時～4 時
参加者	18 名
内 容	<ul style="list-style-type: none">・不思議なスライムどうして作るの？・顕微鏡で何が見えるかな！（ミジンコなど）・上手な「手洗い」ってどうするの ～紫外線ライトを使って手の状態を見てみよう～

7) 厚生労働科学研究事業等への研究協力

(1) 食品の安全確保推進研究事業

- ① 研究課題「食品衛生検査を実施する試験所における品質保証システムに関する研究」
分担研究課題「ISO/IEC17025 認定取得に向けた試験所の検討に関する研究」(食品担当)
- ② 研究課題「食品由来薬剤耐性菌の発生動向及び衛生対策に関する研究」
分担研究課題「全国地方衛生研究所において分離されるヒト，食品由来薬剤耐性菌の情報収集体制の構築」(細菌担当)
- ③ 研究課題「食品での新たな病原大腸菌のリスク管理に関する研究」
分担研究課題「食品での統一的検査法の開発」(細菌担当)

(2) 新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業

- ① 研究課題「食品由来感染症の病原体情報の解析および共有化システムの構築に関する研究」
分担研究課題「EHEC O157 の IS-printing System の精度管理」(細菌担当)
- ② 研究課題「成人の侵襲性細菌感染症サーベイランスの構築に関する研究」(細菌担当)
- ③ 研究課題「国内の病原体サーベイランスに資する機能的なラボネットワークの強化に関する研究」
分担研究課題「結核菌 VNTR 解析の外部精度評価」(細菌担当)

(3) 健康安全・危機管理対策総合研究事業

- 研究課題「公衆浴場等施設の衛生管理におけるレジオネラ症対策に関する研究」
分担研究課題「レジオネラ属菌検査法の標準化に向けた取り組み」(細菌担当)

(4) 日本医療研究開発機構 (AMED) 研究費 新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業

- ① 研究課題「迅速・網羅的病原体ゲノム解析法の開発及び感染症危機管理体制の構築に資する研究」
分担研究課題「地方衛生研究所における感染症危機管理ネットワークの構築」(細菌担当)
- ② 研究課題「薬剤耐性菌サーベイランスの強化及びゲノム解析の促進に伴う迅速検査法開発に関する研究」
(細菌担当)
- ③ 研究課題「ワクチンによって予防可能な疾患のサーベイランス強化と新規ワクチンの創出等に関する研究」
分担研究課題「ムンプスウイルスの流行解析ならびに病原性発現の分子機構」(ウイルス・疫学情報担当)

8) 奈良県公衆衛生学会への協力

奈良県公衆衛生協議会が主催し，平成 29 年 11 月 16 日 (木) 奈良県医師会館で開催された「第 38 回奈良県公衆衛生学会」において，学会事務局として学会開催案内，発表演題募集，発表抄録集作成，開催時の準備などを行った。

9) 信頼性確保業務

(1) 食品関係試験検査事業

「奈良県食品関係試験検査業務管理要項」に基づく食品関係試験検査業務の信頼性確保のため，「内部点検」，「精度管理」，「外部精度管理」を実施している。

① 内部点検

理化学検査 5 項目，細菌検査 2 項目について実施し，結果は全て「適切」であった。

② 精度管理

理化学検査 19 項目，細菌検査 6 項目について実施し，結果は全て「良好」であった。

③ 外部精度管理

i) 一般財団法人食品薬品安全センターの外部精度管理調査に毎年参加している。

理化学調査	クロルピリホス フェントエート
	安息香酸
微生物学調査	黄色ブドウ球菌検査
	大腸菌群検査

ii) 厚生労働科学研究として一般財団法人食品薬品安全センターが実施した精度管理研究に参加した。

厚生労働科学研究	ダイアジノン，クロルピリホス マラチオン，フェニトロチオン
----------	----------------------------------

(2) 感染症関係試験検査事業

① 信頼性確保試験

細菌に関する検査 3 項目，ウイルスに関する検査 4 項目について実施し，結果はすべて「適」であった。

② 外部精度管理

厚生労働省精度管理事業及び厚生労働科学研究各研究班等が実施した精度管理研究に参加した。

厚生労働省 外部精度管理事業	腸管出血性大腸菌
厚生労働科学研究	結核菌遺伝子型別
厚生労働科学研究	レジオネラ属菌
厚生労働省 外部精度管理事業	インフルエンザウイルス核酸検出検査
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	インフルエンザウイルス分離培養・同定技術実態調査
日本医療研究開発機構 (AMED) 研究班	風疹ウイルス遺伝子検査

10) 健康危機事象模擬訓練

「健康危機発生時における近畿2府7県地方衛生研究所の協力に関する協定書」に基づき、兵庫県立健康生活科学研究所の企画により実施された健康危機事象模擬訓練に参加した。

平成29年10月17日（火）に兵庫県立健康生活科学研究所より送付された健康被害事例のシナリオと模擬検体について、センター健康危機管理要領による健康危機管理拡大委員会を開催して協議し、必要な検査を行い、当日中に最終報告を行った。同年12月8日（金）に神戸市で開催された疫学情報部会定期研究会における検証会に参加した。

11) 外部評価制度

(1) 外部評価制度の導入

調査研究業務に客観的かつ公正な評価を加え、調査研究の充実とその成果の普及を図ることを目的に、平成19年度から外部評価制度を導入している。

外部評価委員 (平成29年4月1日現在)

	氏名	所属
委員長	藤井 智康	奈良教育大学
委員	多賀 淳	近畿大学
委員	矢野 寿一	奈良県立医科大学
委員	須崎 康恵	奈良県立医科大学
委員	瀬戸 繭美	奈良女子大学

(2) 平成29年度評価対象となった調査研究

担当	主任研究者	課題名	共同研究者
食品	北岡 洋平	畜産物中のテトラサイクリン系抗生物質一斉分析法の検討	山下 浩一 西山 隆之 米田 正樹 樋上 絢
細菌	辻本 真弓	LAMP法を用いたレジオネラ属菌の検査方法の改良に関する研究	久野 翔平 河口 友理 佐伯美由紀 吉田 孝子 田邊 純子 橋田みさを
ウイルス・疫学情報	藤谷美沙子	プライマーウォーキング法によるノロウイルスの塩基配列の解読について	稲田 眞知 中野 守 千葉 翔子 尾西 美咲

(3) 外部委員による総合評価

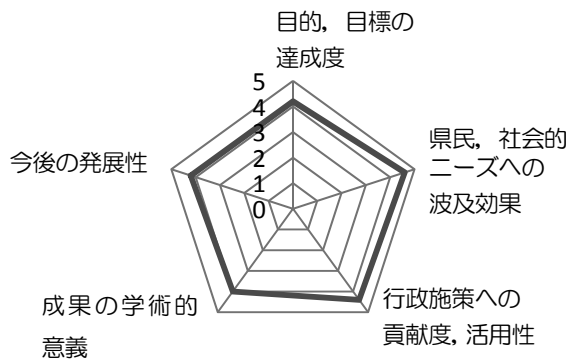
平成 29 年度の調査研究について、全体を通じ次のように評価された。

- ・どの研究も健康に関わる問題であり、大変興味深い内容である。
- ・行政の通常の業務を遂行しながら精力的に研究を行い、学会発表や論文投稿など成果が出ている。
- ・各研究について新たな課題が見つかったので次につなげていただきたい。

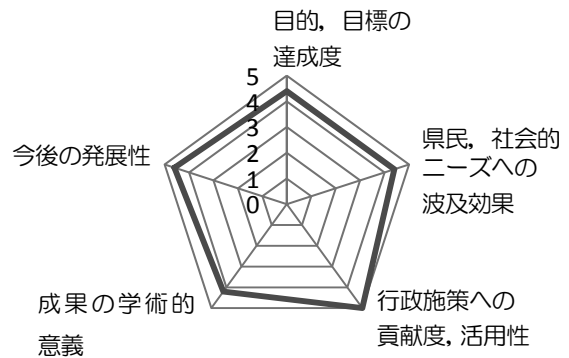
(4) 外部委員による個別評価

外部委員による評価は、①目的・目標の達成度、②県民・社会的ニーズへの波及効果、③行政施策への貢献度、④成果の学術的意義、⑤今後の発展性の観点から行われる。

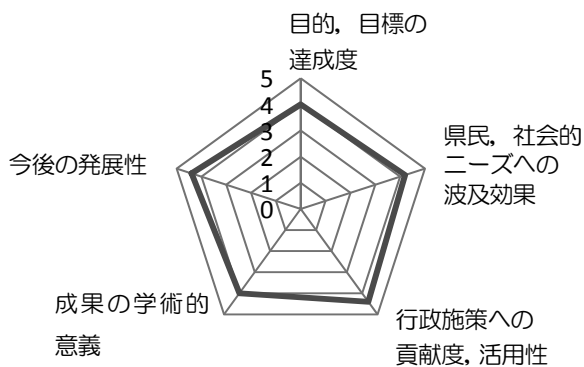
それぞれについて、5段階評価で行い各委員の平均で表した。



畜産物中のテトラサイクリン系抗生物質
一斉分析法の検討



LAMP法を用いたレジオネラ属菌の
検査方法の改良に関する研究



プライマーウォーキング法による
ノロウイルスの塩基配列の解読について

7. 第54回全国衛生化学技術協議会年会の開催

1) 開催概要

日 時：平成29年11月21日（火）10:30～19:30

平成29年11月22日（水）9:00～16:00

場 所：奈良春日野国際フォーラム 薨～I・RA・KA～ 本館，別館

参加機関：81施設（国立医薬品食品衛生研究所及び全国地方衛生研究所等）

参加人数：361名

2) プログラム概要

第1日目 11月21日（火）

【幹事会】

【理事会・幹事会合同会議】

【全国衛生化学技術協議会総会】

（開会挨拶）第54回全国衛生化学技術協議会年会長 奈良県保健研究センター所長 福田 忠明

（会長挨拶）全国衛生化学技術協議会会長 国立医薬品食品衛生研究所長 川西 徹

（閉会挨拶）全国衛生化学技術協議会副会長 山口県環境保健センター所長 調 恒明

【教育講演】

「試験検査の信頼性確保とISO/IEC17025」 東京都市大学 名誉教授 平井 昭司

【1分間プレゼン】（食品部門）（環境・家庭用品部門）

【特別講演】

『万葉集』にみる古代の奈良 奈良県立万葉文化館 上席研究員 井上 さやか

【情報交換会】

第2日目 11月22日（水）

【示説発表】（食品部門）（環境・家庭用品部門）

【口頭発表】（薬事部門）

【部門別研究会】

（食品部門）

テーマ1 残留農薬等試験法開発事業の紹介

小川 麻子（厚生労働省 医薬・生活衛生局 食品基準審査課）

テーマ2 愛知県の精度管理-小規模精度管理の利点と問題点-

猪飼 誉友（愛知県衛生研究所）

テーマ3 埼玉県畜農産物の安全性を高めるための取組み

大坂 郁恵（埼玉県衛生研究所）

テーマ4 東京都における化学物質による食中毒への対応事例

木村 圭介（東京都健康安全研究センター）

テーマ5 近畿における自然毒部会設立の経緯と取組み

神藤 正則（堺市衛生研究所）

テーマ6 フグ食中毒をきっかけとした危機管理体制の構築

岡山 明子（奈良県保健研究センター）

（環境・家庭用品部門）

テーマ1 家庭用品

家庭用品の規制に関する最新情報 河上 強志（国立医薬品食品衛生研究所）

テーマ2 室内空気

室内空気の規制に関する最新情報 酒井 信夫 (国立医薬品食品衛生研究所)

テーマ3 水道水質検査の外部精度管理調査

厚生労働省の精度管理調査の現状と課題 小林 憲弘 (国立医薬品食品衛生研究所)

東京都の精度管理調査の現状と課題 中川 慎也 (東京都健康安全研究センター)

神奈川県 of 精度管理調査の現状と課題 上村 仁 (神奈川県衛生研究所)

千葉県の精度管理調査の現状と課題 横山 結子 (千葉県衛生研究所)

大阪府の精度管理調査の現状 安達 史恵 (大阪健康安全基盤研究所)

兵庫県の精度管理調査の現状と課題 川元 達彦 (兵庫県立健康生活科学研究所)

(薬事部門)

テーマ1 第十七改正日本薬局方第一追補の概要について

福地 準一 (医薬品医療機器総合機構 規格基準部 医薬品基準課)

テーマ2 偽薬及び無承認・無許可医薬品に関する話題

偽薬及び無承認・無許可医薬品の規制について

尾藤 孝弘 (厚生労働省 医薬・生活衛生局 監視指導・麻薬対策課)

C型肝炎治療薬ハーボニー配合錠の偽造品の経緯

辻元 康人 (奈良県医療政策部薬務課)

C型肝炎治療薬ハーボニー配合錠の偽造品の成分分析

内山 奈穂子 (国立医薬品食品衛生研究所)

東京都における無承認無許可医薬品検査の取り組みと偽造医薬品検査事例

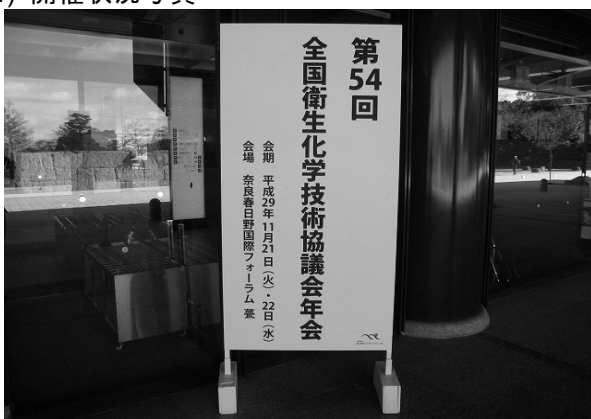
佐藤 美紀 (東京都健康安全研究センター)

3) 年会内容

全国衛生化学技術協議会年会は現在、54回目を迎えている。平成29年度は当センターが年会事務局となって開催した。教育講演の内容は東京都市大学平井昭司名誉教授を招いて、「試験検査の信頼性確保とISO/IEC17025」と題し、講演が行われた。また開催県が奈良県であることから特別講演として奈良県立万葉文化館井上さやか上席研究員による『万葉集』にみる古代の奈良」として万葉集にかかる奈良の歴史についての講演をしていただいた。

示説発表については各部門とも多数の演題が発表され、また部門別研究会においても各部門とも衛生行政に携わる研究員として、身をもって体験した事例に則して研究を実施しており、毒物や、食品の安全性に関するリスクの考え方についての重要性を示された。参加者全員にとって大変有意義な発表研究会となった。

4) 開催状況写真



会場入り口



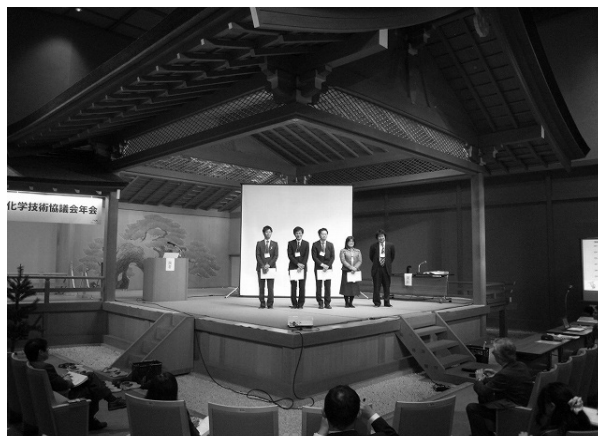
福田所長挨拶



奈良県立万葉文化館 井上さやか上席研究員



東京都市大学 平井 昭司名誉教授



第 2 章 試験・検査概況

食 品 担 当

食品担当では、県民の食の安全・安心を確保するため、食品関係の試験検査、調査研究、研修等を行っている。試験検査では、保健所等の行政機関や給食施設、食品加工業者等からの依頼を受け、市場に流通する食品について、食品の成分規格に関する試験、食品中の添加物、重金属、農薬、動物用医薬品に関する試験などの理化学検査を行っている。また、食品に関する苦情・異物混入事例などの原因調査のための検査も行っている。さらに、飲料水等の一般依頼検査を実施している。

平成 28 年 10 月 27 日付け平成 28 年厚生労働省告示第 382 号「食品、添加物の規格基準の一部を改正する件」にて「釜揚げしらす」及び「しらす干し」に対する使用基準を新たに設定した。また、平成 28 年 10 月 6 日付け生食基発 1006 第 3 号厚生労働省医薬・生活衛生局生活衛生・食品安全部基準審査課長通知「食品中の食品添加物分析法の改正について」にて「過酸化水素」の分析方法が改正された。通知法の注釈のヨウ素滴定法を参考とし、改正を行い滴定の終点が変わりやすく誤差の少ない方法として設定した。今後の収去計画等への反映を進める。

平成 29 年度に実施した業務概況は次のとおりである。

1. 食品化学チーム業務概況

試験検査の概要は、表 1(検体数)及び表 2(項目数)の

とおりであった。

1) 行政検査

(1) 食品収去検査

検査した食品の種類、検査項目を表 3 に示した。その中で食品中の添加物の検査数は延べ 175 項目、成分の定量 36 項目、規格基準 137 項目、暫定基準 8 項目、国及び県の指導基準に関するもの等 14 項目であった。規格基準のうち、51 検体 102 項目は放射性物質の検査であった。

平成 16 年度より行っている遺伝子組換え食品の検査は、豆腐 8 検体について遺伝子組換え大豆の定性を行った結果、4 検体で遺伝子組換え大豆の混入を確認したが、分別生産流通管理が行われており表示は適切であった。

基準違反等の食品を表 4 に示した。うすあげの酸価について県指導基準を超えたものが 1 件あった。

(2) 行政依頼検査

行政指導、食中毒、苦情処理のために保健所等から依頼された検査はなかった。放射性物質の検査は、1 検体 2 項目であった。

2) 依頼検査

依頼検査は 7 検体で、全て学校給食関係であった。

(1) 一般食品

学校給食関係からの検査依頼が 5 検体であった。

(2) 容器包装等

学校給食関係からの検査依頼が 2 検体であった。

表 1 平成 29 年度食品担当食品化学チーム検査一覧 (検体数)

事業区分	検査の種類	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月	合計
行政検査	一般食品	8	23	6	7	12	4	4	6	17	7	10	0	104
	牛乳	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
	食品添加物	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	容器包装等	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	放射性物質	0	12	6	6	4	0	6	6	0	6	6	0	52
	その他	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
小計		8	35	12	13	16	4	10	13	17	13	16	0	157
依頼検査	一般食品	0	0	0	0	0	0	0	2	1	1	0	1	5
	牛乳	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	食品添加物	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	容器包装等	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2
	小計	0	0	0	0	0	0	0	2	1	1	0	3	7
自主検査		66	9	29	153	116	7	7	13	6	1	8	224	639
合計		74	44	41	166	132	11	17	28	24	15	24	227	803

表2 平成29年度食品担当食品化学チーム検査一覧（項目数）

事業区分	検査の種類	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月	合計
行政検査	一般食品	16	40	12	34	18	4	4	8	77	7	52	0	272
	牛乳	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	4
	食品添加物	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	容器包装等	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	放射性物質	0	24	12	12	8	0	12	12	0	12	12	0	104
その他	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
小計		16	64	24	46	26	4	16	24	77	19	64	0	380
依頼検査	一般食品	0	0	0	0	0	0	0	2	1	1	0	1	5
	牛乳	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	食品添加物	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	容器包装等	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	4
	小計	0	0	0	0	0	0	0	2	1	1	0	5	9
自主検査		66	9	29	153	116	23	14	24	20	1	9	291	755
合計		82	73	53	199	142	27	30	50	98	21	73	296	1,144

表3 平成29年度食品担当食品化学チーム取去・買い上げ検査一覧

食品分類	検体数	項目数	不適		食品中の添加物										遺伝子組換え食品	成分の定量	規格基準	暫定基準	指導基準	
			検体数	項目数	甘味料	殺菌料	酸化防止剤	着色料	発色剤	漂白剤	品質保持剤	保存料	防かび剤	その他						
牛乳	1	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0
魚介類	8	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	0
冷凍食品 (加熱-加熱後摂取)	3	6	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
冷凍食品 (未加熱-加熱後摂取)	1	2	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
魚介類加工品	4	4	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
肉卵類及びその加工品	4	4	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
乳製品	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0
乳類加工品	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
アイスクリーム類・氷菓	6	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	0	0
穀類及びその加工品	25	54	0	0	0	5	0	0	0	5	6	0	0	0	0	36	2	0	0	0
野菜類・果物類、その加工品	88	211	1	1	28	0	0	1	0	0	0	52	8	0	8	0	104	0	10	0
菓子類	6	26	0	0	10	0	0	0	0	0	0	12	0	0	0	0	0	0	4	0
清涼飲料水	7	45	0	0	21	0	0	0	0	0	0	8	0	0	0	0	16	0	0	0
酒類	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0
添加物及びその製剤	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
その他の食品	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
器具及び容器包装	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
おもちゃ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
合計	156	378	1	1	67	9	0	1	4	5	6	75	8	0	8	36	137	8	14	0

(内訳) 成分の定量 : 揚げ油の酸価, 過酸化物質価. 油揚げの過酸化物質価. 麺類の水分. 栄養分析
 規格基準 : 乳及び乳製品の比重, 酸度, 乳脂肪分及び無脂乳固形分. アイスクリームの乳脂肪分及び乳固形分. 生あんのシアン. 清涼飲料水のヒ素, 鉛及びスズ. タール色素製剤及び食品添加物の規格試験. 即席めん類の酸価, 過酸化物質価. 放射性セシウム
 暫定基準 : 鮮魚介類の総水銀
 指導基準 : 油菓子の酸価, 過酸化物質価, 油揚げの酸価, 割りばしの防かび剤

表4 平成29年度食品担当食品化学チーム取去・買い上げ検査基準違反等一覧

検体名	検体数	不適項目	検査成績
野菜類・果物類、その加工品	1	うすあげ 県の指導基準	酸価4.3

3) 苦情・相談

電話や来所による相談が8件あった。内容別にみると食品やその他の検査に関する事3件、異物に関する事2件、試験方法に関する事2件、その他の問い合わせが1件であった。延べ6時間要した。

4) 食品検査業務管理 (GLP)

外部精度管理、内部精度管理及び機器の点検を実施した。

(1) 外部精度管理

シロップ中の保存料(安息香酸)の透析-液体クロマトグラフ法による定量試験を行った。

(2) 内部精度管理

漬物中の保存料(ソルビン酸)・甘味料(サッカリンナトリウム)、魚肉ねり製品の保存料(ソルビン酸)、生菓子の保存料(ソルビン酸、安息香酸、デヒドロ酢酸)・甘味料(サッカリンナトリウム、アセスルファムカリウム)、清涼飲料水の保存料(安息香酸)・甘味料(アセスルファムカリウム、スクラロース)、しょう油の保存料(パラオキシ安息香酸)、菓子の甘味料(サッカリンナトリウム)、バナナの防かび剤(チアベンダゾール)及び冷凍食品の甘味料(サッカリンナトリウム)について、試料に一定量の標準物質を添加し、添加回収試験を各1回行った。また、漬物中の保存料(ソルビン酸)、冷凍食品の甘味料(サッカリンナトリウム、アセスルファムカリウム)、しょう油の保存料(パラオキシ安息香酸)及び魚介類中の総水銀について、測定値のバラツキ(精度)を確認するために添加した試料について5回以上の繰り返し検査を行った。

(3) 機器の点検

高速液体クロマトグラフ、ガスクロマトグラフ、原子吸光光度計、水銀分析計、リアルタイムPCR、pHメータ、高速冷却遠心機、分光光度計において、定期点検を各1回と使用時毎における使用時点検を行った。天秤、蒸留水製造装置、ゲルベール乳脂肪分離機については定期点検を行った。異常時点検は、高速液体クロ

マトグラフにおいて4回あった。

5) 調査研究等

(1) 事業に係る技術等検討

事業に係る技術等検討として以下の3題を行った。

- ①魚類食中毒における遺伝子解析による魚種鑑別方法の検討 [安藤尚子他]
- ②テトロドトキシン (TTX) の分析 [村上友規他]
- ③スクラロース分析に係る前処理方法の改良 [仲井菜都希他]

2. 生活化学チーム業務概況

1) 行政検査

検査検体数を表5に、検査項目数を表6に示した。

(1) 農作物中の農薬検査

県内で使用量が多く、過去の検出事例が多い項目を中心に、213検体について延べ24,708項目を検査し、検出事例を、表7に示した。52検体について延べ76項目の農薬を検出したが、残留基準値を超えていたものは1検体で、えんさいからトルフェンピラド0.10ppmを検出した。

(2) 加工食品の農薬検査

輸入加工食品9検体について延べ624項目を検査し、検出事例を表8に示した。1検体について2項目の農薬を検出したが、残留基準値を超えていたものはなかった。

(3) 食肉等の動物用医薬品検査

鶏肉3検体について延べ60項目を検査した結果、全て検出しなかった。また卵4検体について延べ24項目を検査した結果、全て検出しなかった。

2) 依頼検査

食品中の残留農薬等の依頼検査は奈良県産の農作物を中心に、10検体延べ15項目実施した。水質検査は飲料水を中心に、645検体延べ3,898項目実施した。

3) 苦情・相談

電話や来所による相談が8件あった。内容別にみる

表5 平成29年度食品担当生活化学チーム検査一覧(検体数)

区分	業務	検査の種類	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月	合計	
行政検査	食品衛生	農作物の農薬	0	6	37	26	14	20	30	28	23	21	8	0	213	
		加工食品の農薬	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	
		食肉等の動物医薬品	0	0	3	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7
		アフラトキシン	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
		その他	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	0	4
		小計	4	6	40	30	14	20	30	29	23	23	10	5	234	
依頼検査	食品衛生		0	0	2	1	1	0	0	2	2	1	0	1	10	
	水質検査		47	61	91	60	59	45	35	32	42	26	92	55	645	
	小計		47	61	93	61	60	45	35	34	44	27	92	56	655	
自主検査			114	122	78	79	91	86	90	0	294	309	323	96	1,682	
合計			165	189	211	170	165	151	155	63	361	359	425	157	2,571	

表6 平成29年度食品担当生活化学チーム検査一覧(項目数)

区分	業務	検査の種類	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月	合計	
行政検査	食品衛生	農作物の農薬	0	696	4,292	3,016	1,624	2,320	3,480	3,248	2,668	2,436	928	0	24,708	
		加工食品の農薬	394	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	230	624
		食肉等の動物医薬品	0	0	60	24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	84
		アフラトキシン	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
		その他	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	16	16	0	32
		小計	394	696	4,352	3,040	1,624	2,320	3,480	3,249	2,668	2,452	944	230	25,449	
依頼検査	食品衛生		0	0	2	1	1	0	0	2	7	1	0	1	15	
	水質検査		313	284	480	342	381	298	208	218	227	156	589	402	3,898	
	小計		313	284	482	343	382	298	208	220	234	157	589	403	3,913	
自主検査			1,193	1,130	792	604	1,494	593	2,032	0	5,084	4,932	32,592	16,050	66,496	
合計			1,900	2,110	5,626	3,987	3,500	3,211	5,720	3,469	7,986	7,541	34,125	16,683	95,858	

表7 平成29年度農薬検出一覧(農作物)

作物	農薬	濃度(ppm)	基準値*(ppm)	作物	農薬	濃度(ppm)	基準値*(ppm)		
果実類	いちご	クレソキシムメチル	0.01	5	野菜類	えんさい	トルフェンピラド	0.10	0.01
		プロシミドン	0.08	10		オクラ	ペルメトリン	0.05	3.0
	いちご	クレソキシムメチル	0.11	5		きゅうり	アゾキシストロビン	0.01	1
		シメコナゾール	0.04	3		きゅうり	クロルフェナピル	0.06	0.5
		テトラジホン	0.08	1		きゅうり	エトフェンプロックス	0.03	1
	いちご	プロシミドン	0.25	10		きゅうり	エトフェンプロックス	0.02	1
		フェナリモル	0.01	1.0		小松菜	ペルメトリン	0.14	5.0
	いちご	プロシミドン	0.03	10		小松菜	トリフルラリン	0.03	0.05
		テブフェンピラド	0.08	1		だいこんの根	エトフェンプロックス	0.02	2
	いちご	プロシミドン	0.07	10		だいこんの根	エトフェンプロックス	0.01	2
		シフルフェナミド	0.02	0.7		トマト	アゾキシストロビン	0.02	3
	いちご	シメコナゾール	0.23	3		トマト	プロシミドン	0.13	5
		アゾキシストロビン	0.01	10		トマト	アゾキシストロビン	0.11	3
	いちご	シメコナゾール	0.09	3			ブプロフェジン	0.02	1
		ミクロブタニル	0.02	1		トマト	アゾキシストロビン	0.02	3
	いちご	アゾキシストロビン	0.06	10			クロルフェナピル	0.02	1
		シフルフェナミド	0.02	0.7			ジフェノコナゾール	0.02	0.6
	いちじく	アゾキシストロビン	0.10	5		なす	エトフェンプロックス	0.02	2
		クロルフェナピル	0.04	2		なす	クレソキシムメチル	0.02	3
	うめ	ジフェノコナゾール	0.04	3		なす	テブフェンピラド	0.06	0.5
		クレソキシムメチル	0.13	5		なす	トルフェンピラド	0.02	2
	うめ	ジフェノコナゾール	0.07	3		なす	クロマフェノジド	0.05	0.5
		ジフェノコナゾール	0.02	0.7			フェナリモル	0.02	0.5
	かき	ブプロフェジン	0.02	1		なす	クレソキシムメチル	0.03	3
		ジフェノコナゾール	0.07	0.7			トルフェンピラド	0.02	2
	かき	クレソキシムメチル	0.01	5		ねぎ	アゾキシストロビン	0.04	10
		ジフェノコナゾール	0.05	0.7		白菜	トルフェンピラド	0.02	2
	かき	ジフェノコナゾール	0.05	0.7				フェンバレレート	0.05
	かき	ジフェノコナゾール	0.02	0.7		未成熟いんげん	エトフェンプロックス	0.19	2
	かき	ジフェノコナゾール	0.04	0.7		未成熟いんげん	アゾキシストロビン	0.06	3
かき	ジフェノコナゾール	0.04	0.7	ピーマン	ミクロブタニル	0.06	1		
かき	ジフェノコナゾール	0.01	0.7	レタス	トルフェンピラド	0.01	10		
かき	ジフェノコナゾール	0.04	0.7						
かき	ジフェノコナゾール	0.03	0.7						
かき	ジフェノコナゾール	0.01	0.7						
なし	クロルフェナピル	0.01	1						
	シプロジニル	0.01	5						
なし	クレソキシムメチル	0.06	5						
	ジフェノコナゾール	0.04	0.8						
	ピフェントリン	0.01	0.5						
なし	ピフェントリン	0.02	0.5						
バナナ	クロルピリホス	0.06	3						
バナナ	クロルピリホス	0.06	3						
ぶどう	アゾキシストロビン	0.05	10						

*) 基準値は、検出時における値である。

表 8 平成 29 年度農薬検出事例（加工食品）

食品名	農 薬	濃度(ppm)	基準値(ppm)
えだまめ	クロルピリホス	0.04	0.3
	ブプロフェジン	0.01	0.01

と農薬やその他の検査に関することが 3 件，飲料水に関することが 5 件であった。

4) 食品検査業務管理（GLP）

GLP の一環として内部精度管理，外部精度管理及び機器点検を実施した。内部精度管理は野菜の農薬，鶏肉の動物用医薬品について行った。外部精度管理はとうもろこしペースト中のクロルピリホスとフェントエートについて行った。機器点検は，ガスクロマトグラフ，ガスクロマトグラフ質量分析計，液体クロマトグラフ質量分析計の定期点検を各 1 回以上と使用時毎における使用時点検を行った。保冷庫，上皿天秤については定期点検を 2 回ずつ行った。

5) 調査研究等

(1) 食品衛生検査を実施する試験所における品質保証システムに関する研究（厚生労働科学研究事業）

一般財団法人食品薬品安全センター，国立医薬品食品衛生研究所及び地方衛生研究所等他 15 機関による共同研究に協力し，技能試験プログラム（パイロットスタディ）に参加し GC/MS/MS を用いて玄米中の残留農薬の測定を行った。また，会議に参加し情報交換等を行った。

(2) 調査研究

畜産物中のテトラサイクリン系抗生物質一斉分析法の検討 [北岡洋平他]

テトラサイクリン系抗生物質は，動物用医薬品や飼料添加物として広く使用され，畜産物中に残留している可能性がより高い。そこで，畜産物中のテトラサイクリン系抗生物質一斉分析法を検討した。鶏の筋肉及び豚の筋肉については，厚生労働省の通知法より高感度の分析法を確立することができた。

(3) 事業に係る技術等検討

平成 29 年度は以下の 4 課題について検討を行った。

- ① 迅速・簡便な残留農薬一斉分析法の検討－ LC/MS/MS 測定項目－ [山下浩一他]
- ② LC/MS/MS による動物用医薬品の一斉分析法の検討 [西山隆之他]
- ③ QuEChERS 法および収去検査時と同一の LC 条件下での UPLC/MS/MS を用いた食品混入有害物質の迅速検出法の検討 [米田正樹他]
- ④ 迅速・簡便な残留農薬一斉分析法の妥当性評価 [樋上 絢他]

細菌担当

細菌担当では、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(以下、感染症法)、食品衛生法、公衆浴場法等に基づき各種行政検査、一般依頼検査、調査研究、研修等を実施している。

感染症法に関する行政検査では、感染症予防対策事業に基づいて感染症患者から分離された菌株の各種型別・遺伝子検査、感染症起因菌の保菌者検索等の検査を174検体延べ1,217項目実施した。

食品衛生法に関する行政検査では、食品の検査による安全確認事業に基づいて収去検査、食中毒関連検査、その他苦情、監視員検便等の検査を391検体延べ1,606項目実施した。

公衆浴場法等の生活衛生に関する行政検査では、生活衛生関係営業六法施行事業等に基づいて浴槽水関連検査等を51検体延べ114項目実施した。

その他に一般依頼検査としてヒト糞便の腸内細菌検査、食品等、浴場水等、飲料水およびプール水の細菌検査を実施した。また調査研究として「LAMP法を用いたレジオネラ属菌の検査方法の改良に関する研究」の実施や、厚生労働科学研究事業研究班への参加協力等を行い、平成29年度の総検体数は2,823検体、総検査項目数は7,267項目であった(表1、2)。

平成29年度に実施した業務概況は次のとおりである。

表1 平成29年度細菌担当検査一覧(検体数)

区分	種類	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月	合計	
行政検査	感染症	三類感染症菌株検査	0	0	2	4	4	4	4	1	0	1	2	0	22
		保菌者検索検査	0	0	4	26	4	4	3	0	0	1	4	4	50
		結核菌分子疫学調査	0	8	5	5	8	4	8	8	5	0	22	4	77
		CRE感染症検査	0	2	0	2	3	3	5	1	3	1	0	3	23
		その他の検査	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	2
		小計	0	10	11	37	19	15	20	12	8	3	28	11	174
	食品衛生	収去検査	15	37	27	25	31	14	24	26	28	20	26	0	273
		食中毒関連検査	5	1	4	2	5	0	0	11	4	5	3	23	63
		その他の検査	0	51	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	55
		小計	20	89	31	31	36	14	24	37	32	25	29	23	391
	生活衛生	浴槽水関連検査	0	3	11	4	5	3	7	1	2	0	11	0	47
		その他の検査	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	0	4
		小計	0	3	11	4	5	3	7	1	2	2	13	0	51
	一般依頼検査	腸内細菌検査	81	49	52	65	39	49	63	47	31	41	27	40	584
食品細菌検査		7	2	2	5	5	3	6	8	3	6	5	0	52	
浴場水等検査		4	16	7	4	4	3	5	0	9	0	16	1	69	
飲料水検査		35	28	37	31	40	34	22	25	24	17	65	48	406	
プール水検査		6	8	41	24	14	7	6	6	6	6	6	6	136	
小計		133	103	139	129	102	96	102	86	73	70	119	95	1,247	
調査・研究等		9	55	69	104	66	63	124	32	133	118	41	146	960	
合計		162	260	261	305	228	191	277	168	248	218	230	275	2,823	

表2 平成29年度細菌担当検査一覧（項目数）

区分	種類	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月	合計	
行政検査	感染症	三類感染症菌株検査	0	0	8	16	16	16	16	4	0	4	8	0	88
		保菌者検索検査	0	0	4	30	4	4	3	0	0	2	4	4	55
		結核菌分子疫学調査	0	104	65	65	104	52	104	104	65	0	286	52	1,001
		CRE感染症検査	0	6	0	6	9	9	15	3	9	3	0	9	69
		その他の検査	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	4
		小計	0	110	77	117	133	81	138	115	74	9	298	65	1,217
	食品衛生	収去検査	51	98	75	70	114	42	73	69	76	56	70	0	794
		食中毒関連検査	32	10	39	20	47	0	0	95	40	49	29	188	549
		その他の検査	0	255	0	8	0	0	0	0	0	0	0	0	263
		小計	83	363	114	98	161	42	73	164	116	105	99	188	1,606
	生活衛生	浴槽水関連検査	0	10	29	12	14	7	15	2	2	0	15	0	106
		その他の検査	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	4	0	8
		小計	0	10	29	12	14	7	15	2	2	4	19	0	114
	一般依頼検査	腸内細菌検査	240	147	156	191	117	143	188	141	93	122	81	114	1,733
食品細菌検査		13	2	6	10	15	11	22	15	8	10	11	0	123	
浴場水等検査		4	29	14	4	4	4	6	0	15	0	32	1	113	
飲料水検査		70	55	74	61	80	67	44	49	47	33	130	95	805	
プール水検査		12	16	82	48	28	14	12	12	12	12	12	12	272	
小計		339	249	332	314	244	239	272	217	175	177	266	222	3,046	
調査・研究等		9	98	153	156	104	68	159	38	182	169	69	79	1,284	
合計		431	830	705	697	656	437	657	536	549	464	751	554	7,267	

1. 検査業務概況

1) 感染症関係

(1) 三類感染症菌株検査

腸管出血性大腸菌（EHEC）感染症の患者13名と無症状病原体保有者9名から分離された菌株22株（内2株は当センターで分離）について、性状確認、血清型別、毒素型別、薬剤感受性試験及び分子疫学解析を実施した。菌株は通知に基づき国立感染症研究所細菌第一部（以下、感染研）へ送付し、DNA型別解析結果が還元された（詳細は本年報に別途報告）。

その他の三類感染症菌株の搬入はなかった。

(2) 保菌者検索等検査

三類感染症患者発生に伴う保菌者検索の依頼（他自治体発生事例を含む）が保健所からあり、家族や接触者等関係者の糞便等検査を実施した（表3）。

EHEC感染症患者の接触者45名の検体を検査した結果、患者家族2名のO157陽性を確認した。

また細菌性赤痢患者の接触者5名について検査した結果は、全て陰性であった。

(3) 結核菌分子疫学調査

県内の結核患者から分離された結核菌77株（奈良市依頼分32株を含む）が搬入され、JATA(12)-VNTR法による遺伝子型別を実施して結果を保健所及び本庁に報告した。さらに各菌株のJATA(12)-VNTR型については過去の菌株も含めてクラスター形成を確認し、保健所の患者情報を合わせたデータベースを作成して保健所及び本庁と情報を共有した（詳細は本年報に別途報告）。

(4) カルバペネム耐性腸内細菌科細菌（CRE）感染症検査

カルバペネム耐性腸内細菌科細菌感染症の患者発生に伴い、分離された菌株23株について、β-ラクタマーゼ産生性確認、薬剤耐性遺伝子の保有の有無を検査した。その結果、12株からカルバペネマーゼ遺伝子であるIMP型を検出した。結果については、保健所及び本庁に報告した。

(5) その他の検査

ライム病疑い患者1名の確定診断のため、感染研へ検体（血清及び髄液）を送付し検査を依頼した。結果は陰性であった。

表3 平成29年度保菌者検索等検査

事例番号	検査開始日	保健所	検査項目	検体数	陽性数	備考
1	6月23日	中和	EHEC O157 (VT2)	4	0	
2	7月7日	中和	EHEC O26 (VT1)	14	2	家族2名から検出
3	7月14日	郡山	EHEC O157 (VT1, VT2)	9	0	
4	7月19日	郡山	EHEC O145 (VT2)	3	0	
5	8月14日	中和	EHEC O157 (VT2)	3	0	
6	8月17日	郡山	EHEC O157 (VT型不明)	1	0	
7	9月5日	中和	EHEC O157 (VT1, VT2)	4	0	
8	10月27日	中和	EHEC O157 (VT2)	3	0	
9	1月14日	郡山	EHEC O146 (VT2)	1	0	
10	2月1日	郡山	EHEC O26 (VT1)	3	0	
11	2月10日	郡山	赤痢菌 (<i>S.boydii</i>)	1	0	
12	3月28日	中和	赤痢菌 (<i>S.sonnei</i>)	4	0	
合 計				50	2	

2) 食品衛生関係

(1) 収去検査

平成29年度収去検査実施計画に基づき、県内4保健所が収去した食品等273検体、延べ794項目について、食品衛生法の規格基準、衛生規範、県の指導基準、その他の食中毒菌等について検査した(表4)。

食品衛生法の規格基準に違反する食品はなかった。

洋生菓子の衛生規範について、細菌数が4検体、大腸菌群が2検体で基準に適合しなかった。

県の指導基準について、弁当・そうざい等は細菌数が6検体、E.coliが10検体、黄色ブドウ球菌が1検体で基準に適合しなかった。カットフルーツ・カット野菜は細菌数が1検体、E.coliが2検体で基準に適合しなかった。豆腐は大腸菌群が2検体で基準に適合しなかった。和生菓子は細菌数が2検体で基準に適合しなかった。

上記以外の検出状況として、生食用鮮魚介類の1検体から腸炎ビブリオを検出し、また食鳥肉の1検体からサルモネラ属菌、3検体からE.coli、3検体からカンピロバクターを検出した。

(2) 食中毒関連検査

食中毒疑いの行政検査として、患者の便や吐物、従事者の便や手指拭き取り、食品の残食や検食等、および施設拭き取り等、保健所から搬入された検体について、平成29年度は63検体延べ549項目の検査を実施した(表5)。食中毒菌は、カンピロバクターを21検

体、黄色ブドウ球菌を2検体、サルモネラ属菌を1検体から検出した。

(3) その他の検査

苦情調査に関連した行政検査として、食品4検体が保健所から搬入され、細菌数と大腸菌群について検査を実施した。

また食品衛生監視員等衛生監視に携わる職員の検便51検体について、赤痢菌、サルモネラ属菌および腸管出血性大腸菌O26、O111、O157の検査を実施した。

3) 生活衛生関係

(1) 浴槽水関連検査

平成18年3月29日付け生衛第276号「公衆浴場又は旅館の入浴施設におけるレジオネラ属菌検出時及び患者発生時の対応に関する留意事項について」(奈良県健康安全局長通知)に基づき、県内公衆浴場7施設について、浴槽水24検体、原湯2検体、拭き取り4検体のレジオネラ属菌検査を実施した。培養法を実施した30検体中、浴槽水7検体、拭き取り3検体からレジオネラ属菌を検出した。LAMP法では、浴槽水13検体、拭き取り4検体において検査を実施し、浴槽水9検体、拭き取り1検体で陽性を認めた。

さらに、公衆浴場等の衛生指導のため、県内公衆浴場11施設について、拭き取り17検体のレジオネラ属菌検査を実施した。培養法では2検体からレジオネラ属菌を分離した。LAMP法では拭き取り15検体で検査を実施し、6検体が陽性であった(表6)。

表4 平成29年度食品収去検査

食品名	検体数	項目数	検出状況（検体数）
弁当・そうざい等	154	468	細菌数 (6), E.coli (10), 黄色ブドウ球菌 (1)
漬物（一夜漬）	5	10	
カットフルーツ・カット野菜	5	45	細菌数 (1), E.coli (2)
豆腐	18	36	大腸菌群 (2)
生食用鮮魚介類	4	8	腸炎ビブリオ (1)
食肉製品	4	13	
食鳥肉	3	9	<i>Salmonella schwarzengrund</i> (1), E.coli (3) <i>Campylobacter jejuni</i> (2), <i>C. coli</i> (2)
卵	4	12	
牛乳	1	2	
発酵乳・乳酸菌飲料	2	4	
アイスクリーム類	6	12	
ソフトクリーム	4	8	
清涼飲料水	7	7	
冷凍食品	9	18	
洋生菓子	20	62	細菌数 (4), 大腸菌群 (2)
和生菓子	20	60	細菌数 (2)
生麺	1	3	
ゆでめん	5	15	
食肉（ジビエ）	1	2	
合 計	273	794	

表5 平成29年度食中毒関連検査

事例 番号	検査 開始日	保健所	検体数			項目数			検出状況
			ヒト	食品等	合計	ヒト	食品等	合計	
1	4月4日	中和	1	0	1	10	0	10	
2	4月21日	吉野	2	2	4	20	2	22	<i>C. jejuni</i> (1)
3	5月12日	中和	1	0	1	10	0	10	
4	6月16日	内吉野	3	0	3	29	0	29	
5	6月19日	郡山	1	0	1	10	0	10	<i>C. jejuni</i> (1)
6	7月5日	郡山	2	0	2	20	0	20	
7	8月10日	中和	2	0	2	19	0	19	
8	8月27日	郡山	1	0	1	10	0	10	<i>C. jejuni</i> (1), 黄色ブドウ球菌 (1)
9	8月29日	郡山	2	0	2	18	0	18	
10	11月9日	中和	2	0	2	20	0	20	<i>C. jejuni</i> (1), <i>C. coli</i> (1)
11	11月11日	郡山	3	0	3	30	0	30	
12	11月23日	中和	6	0	6	45	0	45	<i>C. jejuni</i> (3)
13	12月1日	中和	1	0	1	10	0	10	<i>C. jejuni</i> (1)
14	12月22日	郡山	1	0	1	10	0	10	<i>C. jejuni</i> (1)
15	12月31日	中和	2	0	2	20	0	20	
16	1月17日	中和	1	0	1	10	0	10	
17	1月22日	郡山	2	0	2	19	0	19	
18	1月24日	郡山	1	0	1	10	0	10	<i>C. jejuni</i> (1)
19	1月24日	郡山	1	0	1	10	0	10	
20	2月2日	中和, 吉野	3	0	3	29	0	29	
21	3月13日	中和	3	0	3	27	0	27	
22	3月23日	中和	10	4	14	94	9	103	<i>C. jejuni</i> (10), 黄色ブドウ球菌 (1) <i>S. Infantis</i> (1)
23	3月30日	中和, 郡山	6	0	6	58	0	58	
合 計			57	6	63	538	11	549	

※食中毒と判断され厚生労働省に届け出された事例番号：2, 12, 22

表 6 平成 29 年度浴槽水関連検査

検査事由	事例番号	検査開始日	保健所	検体種類別	検体数	項目数（陽性）		検出状況
						培養法	LAMP法	
レジオネラ症患者発生	1	5月26日	中和	浴槽水	3	3	3 (1)	
	2	6月20日	郡山	浴槽水	2	2	2	
			郡山	拭き取り	2	2 (2)	2	<i>L.pneumophila</i> SG2 (1), SG5 (1)
	3	7月4日	吉野	浴槽水	4	4 (3)	4 (4)	<i>L.pneumophila</i> SG3 (1), SG6 (1), SG10 (2), SG15 (2)
	4	8月24日	吉野	拭き取り	2	2 (1)	2 (1)	<i>L.pneumophila</i> SG6 (1)
		8月28日	吉野	浴槽水	1	1 (1)	1 (1)	<i>L.pneumophila</i> SG1 (1), SG6 (1)
	5	8月25日	郡山	浴槽水	2	2 (1)	2 (2)	<i>L.pneumophila</i> SG1 (1), SG6 (1), SG10 (1)
9月15日		郡山	浴槽水	2	2	0		
6	9月15日	吉野	浴槽水	1	1 (1)	1 (1)	<i>L.pneumophila</i> UT (1), <i>Legionella</i> spp. (1)	
7	2月7日	中和	原湯	2	2	0		
		中和	浴槽水	9	9 (1)	0	<i>L.pneumophila</i> SG1 (1)	
衛生指導	1	6月7日	郡山	拭き取り	1	1	1 (1)	
	2	6月7日	郡山	拭き取り	2	2	2 (2)	
	3	6月7日	郡山	拭き取り	2	2 (1)	2 (2)	<i>L.pneumophila</i> SG5 (1)
	4	6月7日	郡山	拭き取り	1	1	1	
	5	6月14日	郡山	拭き取り	1	1	1	
	6	10月16日	郡山	拭き取り	2	2	2	
	7	10月26日	郡山	拭き取り	2	2	2	
	8	10月26日	郡山	拭き取り	1	1	1	
	9	10月26日	郡山	拭き取り	2	2 (1)	2 (1)	<i>L.pneumophila</i> SG5 (1)
	10	11月10日	郡山	拭き取り	1	1	1	
	11	12月8日	中和	拭き取り	2	2	0	
合 計					47	47 (12)	32 (16)	

(2) その他の検査

飲料水 4 検体について一般細菌数及び大腸菌群の検査を実施した。

4) 一般依頼検査

(1) 腸内細菌検査

県内事業所の従事者及び住民からの依頼に対して、腸内細菌検査（赤痢菌，サルモネラ属菌，腸管出血性大腸菌 O157）を実施している。平成 29 年度は 584 検体について延べ 1,733 項目の検査を実施した。

(2) 食品細菌検査

県内の食品製造業，食品流通業界，病院，学校等から依頼のあった各種食品やおしぼり等 52 検体につい

て延べ 123 項目（一般細菌数，大腸菌群，糞便系大腸菌群，大腸菌，黄色ブドウ球菌，サルモネラ属菌，カンピロバクター，腸管出血性大腸菌 O157，真菌数）の検査を行った。

(3) 浴場水・飲料水・プール水検査

県内の公衆浴場，社会福祉施設等から依頼のあった浴場水等 69 検体延べ 113 項目についてレジオネラ属菌，大腸菌群の検査を実施した。

また県内事業者，学校関係，行政機関等から依頼された飲料水 406 検体延べ 805 項目，プール水 136 検体延べ 272 項目について一般細菌数，大腸菌の検査を実施した。

2. 調査研究等

1) 調査研究

LAMP 法を用いたレジオネラ属菌の検査方法の改良に関する研究 [辻本真弓]

浴槽水のレジオネラ属菌検査において、迅速検査法（遺伝子検査法）である LAMP（Loop-mediated Isothermal Amplification）法を用いた際の反応阻害について検証を実施した。反応阻害を軽減するための検査方法を検討し、DNA 抽出法を変更することで、反応阻害の影響を軽減できた。

2) 事業に係る技術等検討

以下の 6 題について実施した。

- (1) 食中毒疑い時のセレウス菌同定のための作業手順書の作製 [橋田みさを]
- (2) 結核菌 VNTR 型別における追加領域分析データの検証 [田邊純子]
- (3) カルバペネム耐性腸内細菌科細菌（CRE）検査体制の強化 [吉田孝子]
- (4) 黄色ブドウ球菌のパルスフィールド・ゲル電気泳動（PFGE）法の検討 [佐伯美由紀]
- (5) 16S rRNA 遺伝子解析を用いたレジオネラ属菌の菌種同定について [河口友理]
- (6) 食品中のリステリア・モノサイトゲネスの汚染調査 [久野翔平]

3) 厚生労働科学研究事業等への研究協力

- (1) 新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業「食品由来感染症の病原体情報の解析及び共有化システムの構築に関する研究」

平成 29 年度近畿ブロック分担研究において、IS-printing System (IS) の精度管理、近畿 IS データベースへの登録及び EHEC O157 のパルスフィールド・ゲル電気泳動の精度管理に参加した。

- (2) 新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業「成人の侵襲性細菌感染症サーベイランスの構築に関する研究」

平成 29 年度分担研究「奈良県における成人の侵襲性肺炎球菌・インフルエンザ菌感染症・劇症型溶血性レンサ球菌感染症・侵襲性髄膜炎菌感染症サーベイランスに関する研究」に協力し、県内の侵襲性肺炎球菌感染症、侵襲性インフルエンザ菌感染症及び劇症型溶血性レンサ球菌感染症の成人患者から分離された肺炎球菌 28 株、インフルエンザ菌 2 株及び溶血性レンサ球菌 9 株を血清型決定等のため感染研へ送付した。還元された結果は分担研究者を通じて協力医療機関へ情報提供された。

- (3) 新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業

「国内の病原体サーベイランスに資する機能的なラボネットワークの強化に関する研究」

平成 29 年度分担研究「結核菌 VNTR 解析の外部精度評価」に参加した。

- (4) 健康安全・危機管理対策総合研究事業「公衆浴場等施設の衛生管理におけるレジオネラ症対策に関する研究」

平成 29 年度分担研究「レジオネラ属菌検査法の標準化に向けた取り組み」において、レジオネラ属菌検査外部精度管理調査に参加し、送付された試料（BioBall）について検査を実施した。

- (5) 食品の安全確保推進研究事業「食品由来薬剤耐性菌の発生動向及び衛生対策に関する研究」

平成 29 年度分担研究「全国地方衛生研究所において分離されるヒト、食品由来薬剤耐性菌の情報収集体制の構築」において、ヒトから分離した腸管出血性大腸菌（EHEC）及び食品から分離したサルモネラ属菌について、CLSI ディスク拡散法により、18 薬剤の薬剤感受性試験を実施した。

- (6) 食品の安全確保推進研究事業「食品での新たな病原大腸菌のリスク管理に関する研究」

平成 29 年度分担研究「食品での統一的検査法の開発」において、13 試験研究機関によるコラボレイティブ・スタディに参加し、食品での腸管毒素原性大腸菌 O159、O148 の免疫磁気ビーズ法及びリアルタイム PCR 法を含めた検査法確立のための検討を実施した。

- (7) AMED 日本医療研究開発機構研究費（新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業）「薬剤耐性菌サーベイランスの強化及びゲノム解析の促進に伴う迅速検査法開発に関する研究」

「カルバペネム耐性腸内細菌科細菌検査を支援するマルチプレックス PCR セットの評価試験」において、カルバペネマーゼ遺伝子及び ESBL 遺伝子を一括で検出できるマルチプレックス PCR 法の評価試験に参加した。

- (8) AMED 日本医療研究開発機構委託研究「迅速・病原体ゲノム解析法の開発及び感染症危機管理体制の構築に資する研究」

分担研究「地方衛生研究所における感染症危機管理ネットワーク構築」において、ヒト及び食品から分離したサルモネラ属菌の DNA を抽出した後、国立感染症研究所に送付し、次世代シーケンシングゲノム解析データの提供を受けた。

4) 検査業務管理 (GLP)

(1) 感染症検査

病原体等検査の業務管理における内部精度管理として、結核菌 VNTR 型別、腸管出血性大腸菌の同定及びカルバペネム耐性腸内細菌科細菌の遺伝子検査を実施した。

(2) 食品検査

GLP の一環として食品検査における外部精度管理及び内部精度管理を実施した。

外部精度管理は、大腸菌群検査と黄色ブドウ球菌検査について実施した。内部精度管理は、一般細菌数について添加回収試験を実施した。

3. 技術相談

電話や来所による相談が 16 件あった。内容は、感染症関連 8 件、食品衛生関連 3 件、生活衛生関連 3 件、その他 2 件であった。

ウイルス・疫学情報担当

ウイルス・疫学情報担当では、行政検査を中心に調査研究、情報発信等を行っている。行政検査は感染症予防対策事業、新型インフルエンザ対策事業、エイズ検査相談事業、食品の検査による安全確認事業等に基づき実施した。また、奈良県感染症発生動向調査事業実施要綱に基づき当センターに設置された感染症情報センターを担当している。

平成 29 年度に実施した業務概況は次のとおりである。

1. 検査業務概況

感染症予防対策事業、新型インフルエンザ対策事業及びエイズ検査相談事業は、「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」において大きな柱に位置づけられている。当センターでは奈良県感染症発生動向調査事業実施要綱に従い、病原体定点医療機関から搬入された検体についてウイルス検査を実施している。また、感染症に関する情報収集の強化を目的として開始された、インフルエンザの指定提出医療機関制度に基づく検査を実施した。さらに感染症発生動向調査事業の一環として実施している流行予測調査事業は、“集団免疫の現況及び病原体検索の調査を行い、予防接種の効果を高め、疾病の流行を予測する”ことを目的としており、当センターではポリオ感染源調査

(環境水からのポリオウイルス分離・同定)を実施した。また、食品衛生法に基づく食中毒検査を行った。検出した病原体に関する情報は、患者への適切な医療の提供と感染症等の発生の予防及びまん延防止のため、感染症情報センターが発信する週報・月報を通じて医療機関及び教育関係機関等に提供した。

1) 感染症発生動向調査事業

奈良県感染症発生動向調査事業実施要綱に従い、各病原体定点医療機関及び指定提出医療機関（奈良市依頼検査を含む）から搬入された臨床検体について検査を行った（表 1, 2, 3, 4, 5）。検体の種類及び数は、咽頭ぬぐい液 355 件(奈良市：42 件)、便 281 件(奈良市：10 件)、髄液 50 件(奈良市：14 件)、血清・その他 47 件の計 733 件であった。これらについて、遺伝子検査および培養細胞 (RD-A, HEp-2, A549, MDCK) を使用しウイルス分離を行った。分離したウイルスについては中和試験・HI 試験及び遺伝子学的検査により同定を行った。

(1) 小児疾患関連ウイルス検出状況

感染症発生動向調査事業によるウイルス検査では、合計 431 株のウイルスを検出した（表 3）。

ヘルパンギーナ、手足口病、無菌性髄膜炎などの原因ウイルスとされるエンテロウイルスは、コクサッキーウイルスA群が16株（2型1株、6型13株、10型2株）、

表 1 平成 29 年度ウイルス検査一覧（検体数）

検査の種類		4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月	計		
行政検査	感染症発生動向調査	ウイルス分離	咽頭ぬぐい液	19	27	27	22	37	12	20	21	26	43	32	27	313
		便	60	38	32	15	20	5	10	12	20	13	9	37	271	
		髄液	1	5	4	10	3	1	2		4		2	4	36	
		血清・他	1	4	7	7	4	1	2	4	3	5	5	4	47	
	集団感染症(ノロウイルス等)			2								3		1	6	
	インフルエンザ施設別発生状況								21	5	5				31	
	流行予測調査(環境水ポリオ)	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	72	
	食品の検査による安全確認	食中毒検査	3		3	12	5		18	29	3	6	4	22	105	
	その他(1から5類感染症疑い)		9	5	1	1	4	5	1	3		1	3	3	36	
	蚊生息密度調査			1	1	1	1	1							5	
小計		99	86	83	74	80	31	80	80	67	77	61	104	922		
依頼検査	感染症発生動向調査(奈良市)	ウイルス分離	咽頭ぬぐい液	1	2	1	1	3	1	1	1	10	5	10	6	42
		便		4		1	2	2			1				10	
		髄液	1	1		1	5		4		1	1			14	
		血清・他														
小計		2	7	1	3	10	3	5	1	12	6	10	6	66		
総計		101	93	84	77	90	34	85	81	79	83	71	110	988		

表 2 平成 29 年度ウイルス検査一覧 (項目数)

検査の種類			4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月	計		
行政検査	感染症発生动向調査	ウイルス分離	咽頭ぬぐい液	76	108	108	88	148	48	80	84	104	172	128	108	1,252	
			便	240	152	128	60	80	20	40	48	80	52	36	148	1,084	
			髄液	4	20	16	40	12	4	8		16		8	16	144	
			血清・他	4	16	28	28	16	4	8	16	12	20	20	16	188	
		集団感染症(ノロウイルス等)			4								6		2	12	
		インフルエンザ施設別発生状況								42	10	10				62	
	流行予測調査(環境水ポリオ)	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	216	
	食品の検査による安全確認	食中毒検査	6		6	24	10		36	58	6	12	8	44	210		
	その他(1から5類感染症疑い)		9	5	1	1	4	5	1	3		1	3	3	36		
	蚊生息密度調査			1	1	1	1	1							5		
小計			357	320	310	260	289	100	233	237	246	281	221	355	3,209		
依頼検査	感染症発生动向調査(奈良市)	ウイルス分離	咽頭ぬぐい液	4	8	4	4	12	4	4	4	40	20	40	24	168	
			便		16		4	8	8			4				40	
			髄液	4	4		4	20		16		4	4				56
			血清・他														
	小計			8	28	4	12	40	12	20	4	48	24	40	24	264	
総計			365	348	314	272	329	112	253	241	294	305	261	379	3,473		

コクサッキーウイルスB群が8株(2型6株, 5型2株), エコーウイルスが19株(3型1株, 6型12株, 9型5株, 30型1株), エンテロウイルス71型を5株検出した。呼吸器系疾患の代表的な原因ウイルスであるインフルエンザウイルスは、計76株を分離・検出した。内訳は、AH1pdm09 18株, AH3 23株, B型(山形系統) 35株であった。2017/2018シーズンは例年とは異なりB型山形系統のウイルスがシーズン始めから多く検出され、シーズンを通してB型山形系統, AH1pdmおよびAH3(香港型)の3種のウイルスが混在する形で流行が認められた。このうち薬剤耐性試験については分離したAH1pdm09株を対象に実施したが、すべて感受性株であった。インフルエンザ以外の呼吸器疾患感染症を疑う検体からはRSウイルス18株, ヒトメタニューモウイルス10株, パラインフルエンザウイルス1型1株を検出した。

アデノウイルスは特に季節性はなく年間を通して検出し、1型10株, 2型9株, 3型10株, 5型3株の計4種32株をHEp-2細胞およびA549細胞で分離した。臨床診断名として扁桃炎・咽頭結膜熱からの検出例が多く、その他、感染性胃腸炎・インフルエンザ様疾患等臨床症状は多彩であった。

感染性胃腸炎を疑う検体(便)からは、多種のウイルスを年間を通して検出した。最も検出が多かったウイルスはA群ロタウイルス86株(G1:2株, G2:43株, G3:20株, G8:7株, G9:12株, NT:2株)であった。ノロウイルスはGIIのみ32株を検出した。その他、サポウイルス3株, アストロウイルス1株, 腸管アデノウイルス40/41型10株を検出した。なお、

前述のアデノウイルス1型4株, 2型3株, 3型5株, 5型2株, エコーウイルス3型1株, 6型2株, 9型1株, 30型1株, コクサッキーウイルスB群2型2株, 5型1株は、感染性胃腸炎患者からの検出であった。

(2) 集団感染症発生状況調査

小学校および高等学校で発生した集団感染症事例は6月, 1月, 3月に発生が認められた(表4)。全体で6検体の依頼があり、すべての検体からノロウイルスを検出した。内訳はGI:3株, GII:3株であった。

(3) 感染症流行予測調査事業

平成26年度よりポリオ感染源調査として流入下水を対象とした環境水サーベイランスを実施している。本調査は経口生ポリオワクチンから不活化ポリオワクチンへの切り替えに伴い、輸入例が想定されるポリオウイルスの監視を目的としている。

県内一カ所の下水処理場において、流入下水を毎月1回採水し、陰電荷膜法により下水を100倍濃縮し、培養細胞によるウイルス分離を行った。今年度より年間を通しての調査を実施した。流入下水ではエンテロウイルス等が副次的に検出されるため、細胞変性効果(CPE)が認められた検体については、ポリオウイルスに特異性のあるL20B細胞に再度接種し、ポリオウイルスの有無の確認を行った結果、いずれの月もポリオウイルスの検出はなかった(表5)。その他の非ポリオウイルスとしてはエコーウイルス3型, 6型, 11型, コクサッキーウイルスB群3型, 4型, 5型を複数株検出した。

表3 平成29年度感染症発生動向調査事業によるウイルス検出状況一覧

病原体	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月	合計
インフルエンザウイルスAH1pdm09	3		1					1	5	7	1		18
インフルエンザウイルスAH3型								4	1	8	8	2	23
インフルエンザウイルスB山形系統							1		3	14	12	5	35
パラインフルエンザウイルス1型									1				1
RSウイルス					3	9		3	1	2			18
ムンプスウイルス		2							1				3
ヒトメタニューモウイルス	2									2	3	3	10
アデノウイルス1型		1	3			2	1		1	1		1	10
アデノウイルス2型	3	2			1		1			1	1		9
アデノウイルス3型	2	3		3	1							1	10
アデノウイルス5型		2										1	3
腸管アデノウイルス40/41型	2	4	1		1		1					1	10
コクサッキーウイルスA群2型						1							1
コクサッキーウイルスA群6型			5	2	6								13
コクサッキーウイルスA群10型					1			1					2
コクサッキーウイルスB群2型				2			3				1		6
コクサッキーウイルスB群5型					1					1			2
エコーウイルス3型					1								1
エコーウイルス6型	2				2	1		7					12
エコーウイルス9型		1			3			1					5
エコーウイルス30型						1							1
エンテロウイルス71型						2	1	2					5
ヒトパレコウイルス4型						2							2
単純ヘルペスウイルス1型										1			1
ヒトヘルペスウイルス6型			2	3	1				1	3	1		11
ヒトヘルペスウイルス7型					1						1		2
ライノウイルス	4	8	13	10	9	4	11	6	2	1	4		72
サイトメガロウイルス	1	1	1	1	1				1	2	2	2	12
パルボウイルスB19			1	1			1		2				5
EBウイルス						1			2				3
水痘・帯状疱疹ウイルス		1		1					1				3
ノロウイルスGII	2	2	8	1	2	1	4	1	5	5		1	32
ロタウイルス(A群)	42	11	4						2	2	7	18	86
サポウイルス		1	1									1	3
アストロウイルス		1											1
合計	63	40	40	24	34	24	24	26	29	50	41	36	431

表4 平成29年度集団感染症発生状況調査

		4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月	計
検体数(便)				2							3		1	6
陽性数	ノロウイルスGⅠ										3			3
	ノロウイルスGⅡ			2									1	3

表5 平成29年度感染症流行予測調査事業(環境水からのポリオウイルス分離・同定)

		4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月	合計
検体数(環境水)		6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	72
ポリオウイルス		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
その他の検索	エコーウイルス3型		1	4		2	1							8
	エコーウイルス6型		3		6	1	5	2	4					21
	エコーウイルス11型										1	2	2	5
	コクサッキーB群3型				3									3
	コクサッキーB群4型									1				1
	コクサッキーB群5型									1				1

表6 平成29年度インフルエンザ集団発生状況調査(初発)

保健所名	検体採取日	検体数	陽性数	検出ウイルス
中和保健所	H29.10.12	9	0	
郡山保健所	H29.10.13	6	4	B山形系統
郡山保健所	H29.10.31	6	6	AH3(香港型)
吉野保健所	H29.12.14	5	5	B山形系統
奈良市保健所	H29.12.15	5	3	B山形系統
内吉野保健所	H30.1.23	5	6	B山形系統 AH3(香港型)

2) 新型インフルエンザ対策事業

インフルエンザ流行の端緒を把握し、早期に対策をとることを目的として、各保健所管轄内で初発のインフルエンザ集団感染事例について、うがい液(36検体)からの検査を実施した(表6)。初発事例は平成29年10月12日、中和保健所管内で発生したがウイルスは検出されなかった。翌13日は郡山保健所管内のうがい液6検体中4検体からB型山形系統のウイルスを検出した。また郡山保健所管内では、10月31日に6検体中すべてからAH3(香港型)を検出した。以降の12月14日吉野保健所管内、12月15日奈良市保健所管内の事例では、いずれもB型山形系統を10検体中8検体から検出した。更に年明け1月23日にはB型山形系統とAH3(香港型)の混合感染事例が内吉野保健所管内で認められた。

3) エイズ検査相談事業

平成17年度から各保健所内での迅速検査・診断が

開始されたため、当センターでのHIV抗体検査は疑陽性検体の確認検査のみとなっている。平成29年度は5月および8月に郡山保健所、中和保健所より偽陽性検体の確認検査2件の依頼があった。そのうちの1件はHIV-1が判定保留となったが他は陰性であった。その他、各保健所で毎週実施するエイズ無料相談・検査時に用いる迅速診断キット、検査試薬及び消耗品等の配布を毎月行った。

4) 1類～5類感染症疑い検査

1類～5類全数把握対象疾患のうち、届出基準として病原体検出が必要な疾患等について、各保健所からの依頼に基づき検査を実施した。平成29年度には37検体の依頼があった(表7)。

(1) 麻しん、風しん疑い検査

麻しん疑い8事例21検体、風しん疑い3事例9検体の検査依頼があり、麻しん1事例、風しん1事例で陽性を確認した。

表7 平成29年度1類～5類感染症疑い検査状況（検体数）

病原体	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月	合計
デングウイルス				1		2							3
SFTSウイルス			1										1
風しんウイルス		3									3	3	9
麻しんウイルス	9	3			2	3		3		1			21
HIV					2								2
A型肝炎ウイルス							1						1
合計	9	6	1	1	4	5	1	3		1	3	3	37

表8 平成29年度食中毒(疑)等検査状況

	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月	計
検体数（便）	3		3	12	5		18	29	3	6	4	22	105
陽性数	ノロウイルスGI									1		4	5
	ノロウイルスGII	1		3	2		2	11	2	3	3	6	33
	ノロウイルスGI+GII											2	2

麻しん患者は3月28日にマレーシアから帰国，その時点で39℃の発熱，咽頭痛，関節痛があり，3月31日に病院受診，その夜から発疹が出現，麻しんウイルスD8型を検出した．風しん患者は海外渡航歴はなく，ワクチン歴は不明の51歳の男性，咽頭ぬぐい液より風しんウイルス1E型を検出した．

(2) デング熱疑いおよび確認検査

海外感染疑い患者3例について検査を実施し3名の陽性を確認した．1例目は医療機関でデング熱と診断（NS1抗原検査陽性），型別のため検査を実施しデングウイルス1型を検出した．2例目はボランディアのため8月28日～9月3日までフィリピンに渡航，帰国後3日目より発熱，関節痛，下痢症状が継続し医療機関を受診，入院となり9月16日にNS1抗原検査陽性となりデング熱と診断された．3例目は9月4日～9月12日までインドニューデリーに滞在，帰国後3日目より発熱，関節痛，倦怠感出現，9月19日医療機関にて迅速キットでNS1抗原がうっすらと陽性を示し翌日，本人解熱・手掌掻痒感出現を確認しデング熱治りかけの症状と判断し確定診断に至った．当センターで型別検査を実施したが2例とも陰性であった．確認のため国立感染症研究所ウイルス第一部第二室（林昌宏先生）に検査を依頼した．結果は蛍光プローブを用いたデングウイルス遺伝子の高感度検出法TaqMan RT-PCRでは2例とも陰性，デングウイルスNS1抗原検査およびデングウイルスに対するIgM抗体検査では陽性となった．以上より患者はデングウイルスによるデング熱と考えられる結果と判断した．しかし血清型の確定には至らなかった．

(3) SFTS 疑い検査

発熱，血小板減少，白血球減少，消化器症状，AST・ALT・LDH値上昇，ダニの刺し口がある等の臨床所見から本疾患疑いで1事例（血清）の検査依頼があったが結果は陰性であった．

(4) A型肝炎ウイルス検査

10月に吉野保健所に海外渡航歴のない1名（男性）のA型肝炎の届出があった．患者は発病前，生ホタテ，鶏の肝の喫食歴があり，発熱，全身倦怠感，食欲不振，肝機能異常があり医療機関における検査で血清IgM抗体の検出が確認された．当センターの遺伝子解析の結果，IAの遺伝子型を確認した．

5) 食中毒(疑)等検査

ウイルスが原因であると疑われた食中毒23事例について検査を行った．検査依頼検体は糞便105検体で，うち33検体からノロウイルスGIIを，5検体からノロウイルスGIを，またGIとGIIの混合感染を2検体から検出した（表8）．なお，11月に郡山保健所管内で発生した食中毒事例及び2月に吉野保健所管内で発生した食中毒疑い事例で遺伝子型検査を実施し，11月の事例ではノロウイルスGII.4を，2月の事例ではノロウイルスGII.17を検出した．

6) 検査業務管理（GLP）

病原体等検査の信頼性を確保することを目的に，外部精度管理事業のインフルエンザウイルスの核酸検出検査（リアルタイムRT-PCR法）による型・亜型診断検査を実施した．また，「麻疹・風疹研究班」による風疹検査に関する外部精度管理および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が実施したウイル

ス分離培養・同定技術実態調査に参加した。

2. 感染症情報センター業務概況

奈良県感染症発生動向調査事業実施要綱・同要領に従い、医療機関等からの患者発生届・報告や病原体検出情報から、感染症の流行状況を把握・解析し、情報発信を行った。

1) 感染症サーベイランスシステム

奈良県感染症発生動向調査事業実施要綱・同要領に従い、医療機関で診断された患者について、FAX等により管轄の保健所に届出・報告され、各保健所で感染症サーベイランスシステム（National Epidemiological Surveillance of Infectious Disease：NESID）に登録される。その内容について、感染症情報センターで確認を行い、中央感染症疫学センター（国立感染症研究所）に送付している。

平成 29 年度には、全数把握対象疾患については、477 件の届出があった（届出基準に合致しない等の理由で削除された 22 件を含む）。定点把握対象疾患については、知事が定点医療機関として指定した延べ 115 件の医療機関から毎週または毎月報告があった。

届出・報告内容について、感染症拡大の未然防止のため、希少感染症の届出・患者数の急増などを把握・解析し、必要に応じて情報発信を行った。また、流行する疾患については、原因病原微生物の詳細解明のため、病原体定点等に依頼して検体を積極的に確保し、その検査結果を併せて情報還元することにより、流行様式について適時に情報提供できたと考えている。

2) 「奈良県感染症情報」の発行

週単位で報告される疾患等について、中央感染症情報センターで集約・還元される全国情報をとりまとめ、「奈良県感染症情報」（週報）として毎週発行している。月単位で報告される疾患については、上記に合わせて月 1 回月報として発行している。毎週の奈良県感染症情報には流行状況を解析し、流行する疾患及びその予防方法について県内概況としてとりまとめ、一般の方々にもわかりやすい情報を提供するように努めた。更に、検出した病原体情報や話題になっている感染症等についても併せて情報提供した（表 9）。また、法改正や全国での流行疾患、国・検疫所等からの注意喚起などについては、トピックスとして紹介した。

発行手段としては、保健研究センター内での掲示、感染症情報センターホームページへの掲載に加え、関係機関（医師会、教育機関、福祉関係施設等）へメールにより配信している。更に医師会から、医師会感染症部理事などで構成するサーベイメーリングリスト

（26 件）や定点医療機関のメーリングリスト（FAX 送信含む）（134 件）で送信され、更に各地区医師会経由でその他の医療機関へメール転送や FAX 送信（251 件）された。当センターから関係機関へ直接メール配信した配信先数は 561 件であった（表 10）。学校欠席者サーベイランスや保健所で実施される講習会で週報配信について周知の機会を得るなどして、増数を図った。今後も配信先の増数を模索していきたい。

表 9 奈良県感染症情報での提供記事

掲載日	タイトル
4月 21日	ゴールデンウィークに海外へ渡航される方へ～感染症にご注意ください～
5月 9日	マダニにご注意を！！
6月 2日	蚊媒介感染症について
6月 30日	気をつけたい夏の感染症
7月 28日	夏休みに海外へ渡航されるみなさまへ
8月 25日	ヨーロッパ地域における麻しん患者報告数の増加に伴う海外渡航者への注意喚起
9月 22日	感染症予防対策
10月 20日	インフルエンザについて
11月 2日	インフルエンザの感染経路
12月 1日	12月1日は「世界エイズデー」
12月 28日	咳エチケット違反していませんか？
1月 26日	咳エチケット
2月 23日	3月1日～3月7日は子ども予防接種週間
3月 23日	ヒトメタニューモウイルス感染症

表 10 配信施設分類

施設	件数	施設	件数
乳児院	2	児童養護施設	6
幼稚園	89	母子生活支援施設	1
保育園	75	特別支援学校	7
こども園	9	障害者支援施設	26
小学校	67	介護保険施設	60
中学校	37	包括支援センター	5
高等学校	29	医療機関	29
中学校・高等学校	3	役所	51
大学	17	公共施設	26
専門学校	7	その他	2
教育委員会	13	合計	561

3) 「保健研究センターだより」及び「気になる話題等」の作成及び奈良新聞への記事提供

微生物検査・研究の状況については「保健研究センターだより」として、また話題の感染症や緊急情報については「気になる話題」として作成し、「奈良県感染症情報」に併せて発行した（表 11）。また平成 26 年度より開始した奈良新聞での感染症コラム等へ記事提供も継続して実施した。感染症発生状況が毎週、また感染症に関するコラムが月 1 回掲載された（表 12）。

表 11 奈良県感染症情報掲載記事一覧

掲載日	タイトル	担当者
5月 19日	今シーズンのA群ロタウイルスの解析状況について	稲田真知
10月 13日	ノロウイルスについて。～その1～	藤谷美沙子
10月 20日	ノロウイルスについて。～その2～	稲田真知
10月 27日	ノロウイルスについて。～その3～	稲田真知
3月 22日	ノロウイルスGⅡ.P17-GⅡ.17の検出状況について	藤谷美沙子

表 12 奈良新聞提供記事一覧

掲載日	タイトル
4月 13日	おたふく風邪
5月 11日	風しんゼロプロジェクト
6月 8日	手足口病
7月 13日	咽頭結膜熱（プール熱）
8月 10日	アニサキス症
9月 14日	結核予防週間
10月 12日	RSウイルス感染症
11月 9日	0157などの腸管出血性大腸菌感染症
12月 14日	インフルエンザワクチン
1月 18日	劇症型溶血性レンサ球菌感染症
2月 8日	麻しん（はしか）
3月 8日	春先に流行するロタウイルス感染症

4) 感染症情報センターホームページ

感染症情報センターは、保健研究センターとは別にIDを取得し、独自にホームページを運営している。「奈良県感染症情報」に関するアーカイブとして、またタイムリーな話題・注意喚起の掲載など、積極的な情報提供を行った。インフルエンザが流行する時期には問い合わせが増えることから、平成 28 年度より開始したインフルエンザ速報値を今年度も掲載した。

平成 29 年度のアクセス数は、51,638 件（トップページ及び週報ページ）で、昨年度より大幅に増加している（表 13）。

5) 問い合わせ状況

感染症に関して、各方面や県民から電話等で問い合わせが 104 件あり、昨年より増加した。その内訳は、県民から 19 件、医療機関から 8 件、教育機関から 2 件、福祉機関から 3 件、報道関係から 35 件、行政機関から 27 件及びその他 10 件であった。報道機関や行政機関からの問い合わせが増加した。

表 13 ホームページアクセス件数

	トップページ 訪問者数	週報 訪問者数
4月	1,761	967
5月	1,545	1005
6月	1,387	1009
7月	1,319	866
8月	1,013	726
9月	1,271	895
10月	2,162	1,258
11月	2,782	1,641
12月	3,951	2,265
1月	8,441	3,558
2月	4,677	2,523
3月	2,806	1,810
合計	33,115	18,523

6) 特記すべき疾患

平成 29 年度は、手足口病およびインフルエンザが警報発令となった。これら警報の発令等については、奈良県感染症情報やホームページ上でわかりやすい周知に努めた。警報の発令等については、誰にでも判断出来るよう、国立感染症研究所が使用する数値を用いて、平成 25 年に当センターでの発令等の基準を定めている。

3. 調査研究等

1) 調査研究

プライマーウォーキング法によるノロウイルスの塩基配列の解読について [藤谷美沙子]

(1)GⅡ.P17-GⅡ.17 の RdRp 領域について

RdRp 領域は増幅が困難な領域とされており、全長（約 1300 塩基）を一度の PCR で増幅できるようプライマー設計を繰り返し試みたが、増幅は確認できなかった。そこで RdRp 領域を 3 つに分けて PCR で増幅させるようプライマー設計を試み、それぞれで増幅が確認できた。シーケンスプライマーは、PCR プライマーの他に 3 本のプライマーを設計・使用し、プライマーウォーキング法を実施、全長を解析することができた。また、全長の配列データを用いて、国内外で検出されている株と系統樹解析を実施し、同時期の流行でも様々なウイルスが本県に流入していたことがわかった。

(2)GⅡ.P17-GⅡ.17 の VP1 領域について

VP1 領域全長（約 1600 塩基）について PCR プライマー及びシーケンスプライマーを設計した。PCR プライマーは 1 組、シーケンスプライマーは 5 本使用し、

全長解析を行うことができた。解読することができた配列データから国内外で検出されている株と系統樹解析を実施したところ、RdRp 領域同様に様々なウイルスが流入し流行していた。

(3) G II.4 について

NV の主流遺伝子型である G II.4 についても VP1 領域の全長解析を実施した。既存のプライマーと設計したプライマーを組み合わせ PCR を実施するなど試行した。シーケンスプライマーは、5 本使用し、全長を解析することができた。得られた配列データからこれまでの G II.4 の流行株と系統樹解析を行ったところ、すべて 2012 年の流行株と近い株であることがわかった。

2) 事業に係る技術等検討

(1) 2010 年及び 2012 年分のヒトパレコウイルスの検出 [稲田真知]

(2) インフルエンザウイルス分離に関する検討 [中野守]

(3) 水中ノロウイルスの検査法確立と河川水中のノロウイルス定量 [千葉翔子]

(4) 奈良県での A 群ロタウイルスの遺伝子解析による継続調査 2016/2017 シーズン [尾西美咲]

3) 狂犬病検査実技演習の実施

「国内動物を対象とした狂犬病検査の実施について」(健感発 0804 第 1 号) の協力依頼により、人を噛んでその後死亡した犬や野生動物、自治体に引き取られ異常死した犬、事故死した野生動物などを自治体が検査することになり、平成 26 年度に検査体制を整備した。平成 29 年度は 2 月 15 日に実地訓練を実施し、中和保健所動物愛護センターにおいて解剖・採材した中枢神経組織(延髄、橋、視床、小脳、海馬)の各部位が冷蔵状態で搬入され、FITC 標識抗体「FITC Anti Rabies Monoclonal Globulin」を用いた直接蛍光抗体法によるウイルス抗原の検索を行った。狂犬病が疑われる場合には、早い段階で狂犬病の診断を進めることが必要である。毎年訓練を行うことにより、狂犬病の臨床診断および本病であった場合の措置等を円滑かつ確実に実施できる体制づくりを確認した。

4) 蚊の生息状況調査

「蚊媒介感染症に関する特定感染症予防指針」(平成 27 年 4 月 28 日策定)に基づき、県内での蚊媒介感染症患者の発生時等に迅速に対応し、まん延を防止することを目的に蚊媒介感染症の平常時の対策として、デング熱を媒介するヒトスジシマカ(雌)の生息調査(定点モニタリング調査)を実施した。方法は 5 月から 9 月の月 1 回、奈良市内公園内で CDC 型捕虫器(ドラ

イアイスでによる誘因)を用いて蚊成虫の捕獲を行った。今回の調査では 5 月および 7 月に目的とするヒトスジシマカ(雌成虫)は一匹捕集されたのみであった。

第3章 調査研究・報告

第1節 報 告

健康危機事象のための QuEChERS 法による 食品中の抗凝固剤系殺鼠剤一斉分析法の検討

米田正樹・北岡洋平・樋上 絢・西山隆之・山下浩一・堀 重俊・岡山明子

Examination of Simultaneous Analysis of Anticoagulant Rodenticides in Foods for Emergency
Response to Health Crisis by QuEChERS Method

Masaki YONEDA・Yohei KITAOKA・Aya HIGAMI・Takayuki NISHIYAMA・
Hirokazu YAMASHITA・Shigetoshi HORI and Akiko OKAYAMA

緒 言

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

健康危機事象発生時は、混入物質の早期特定が原因究明に重要であるが、抗凝固剤系殺鼠剤の分析法の多くは血液や臓器などの臨床検体を対象としたものである¹⁻³⁾。昨年度、食品を対象とした抗凝固剤系殺鼠剤一斉分析法を検討したが、迅速性、操作性および装置の感度等に問題があった⁴⁾。今回これらの問題点の改善のため前処理法に QuEChERS 法および分析装置に UPLC-MS/MS を用いて改善を試みたので報告する。

方 法

1. 試料

加工食品（ししゃも、冷凍ぎょうざ、レトルトカレー、冷凍エビピラフ、冷凍からあげ）5 種および清涼飲料水（スポーツドリンク、緑茶、オレンジジュース、野菜ジュース、コーヒー）5 種と牛乳の計 11 種を用いた。

2. 試薬等

1) 標準品

残留農薬試験用クマテトラリル(CT) (和光純薬工業製)、残留農薬試験用ワルファリン(WA) (和光純薬工業製)、残留農薬試験用プロディファコウム(BF) (関東化学製)、残留農薬試験用ブロマジオロン(BD) (和

光純薬工業製)、残留農薬試験用ジフェチアロン標準液(DF) (関東化学製)、ピンドン標準品(PD) (和光純薬工業製)、残留農薬試験用ダイファシノン(DP) (和光純薬工業製)、農薬分析用高純度クロロファシノン(CP) (アルドリッチ製) を使用した。

2) 標準溶液

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

3) その他試薬

ギ酸は和光純薬製の LC/MS グレードを、アセトニトリルは和光純薬製残留農薬分析用を、無水硫酸マグネシウム、クエン酸 3 ナトリウム 2 水和物、クエン酸水素 2 ナトリウム 1.5 水和物および塩化ナトリウムは全て和光純薬工業製特級を、移動相用の水、メタノールおよび酢酸アンモニウムは全て和光純薬製の LC/MS グレードを使用した。

精製用固相には C18 は Agilent 社製 Bondesil C18, PSA は Agilent 社製 Bondesil PSA および塩基性アルミナは和光純薬工業製を使用した。

3. 装置

Waters 社製 Xevo TQ-S micro を使用してネガティブモードで測定した。

4. 試験溶液の調製

試料からの抽出は QuEChERS 法の欧州メソッド^{5,6)}に若干の改良を加えた。50 mL の遠心管に均質化した試料 2 g を採取した。8 mL 加水した後、5%ギ酸含有アセトニトリル 10 mL を加え 1 分間振とうした。振とう後、塩化ナトリウム 1 g、クエン酸 3 ナトリウム 2 水和物 1 g、クエン酸水素 2 ナトリウム 1.5 水和物 0.5 g、無水硫酸マグネシウム 4 g を加え 1 分間振とうした。遠心分離 (3,500 回転, 5 分, 15°C) 後、アセトニトリル層を分取し、残渣に再度 5%ギ酸含有ア

セトニトリル 5 mL を加え 1 分間振とうし、遠心分離 (3,500 回転, 5 分, 15°C) 後、上清を先のアセトニトリルに併せ 5%ギ酸含有アセトニトリルで 20 mL に定容し抽出液とした。

抽出液からの精製は Vudathala らの方法に若干の変更を加えて行った。あらかじめ PSA 50 mg, C18 150 mg, 塩基性アルミナ 50 mg, および無水硫酸マグネシウム 175 mg を入れた 15 mL 遠心管に抽出液 4 mL を加え、15 秒間ボルテックスミキサーで混合し、5 分間静置後、遠心分離 (3,500 回転, 5 分, 15°C) した。遠心後上清 1 mL を試験管に分取し窒素気流下で乾固後、メタノールで 1 mL に定容した。マトリックス効果の低減および質量分析計への負荷を減らすため、さらに検液をメタノールで 5 倍希釈し UPLC-MS/MS に注入した。フローシートを図 1 に示した。

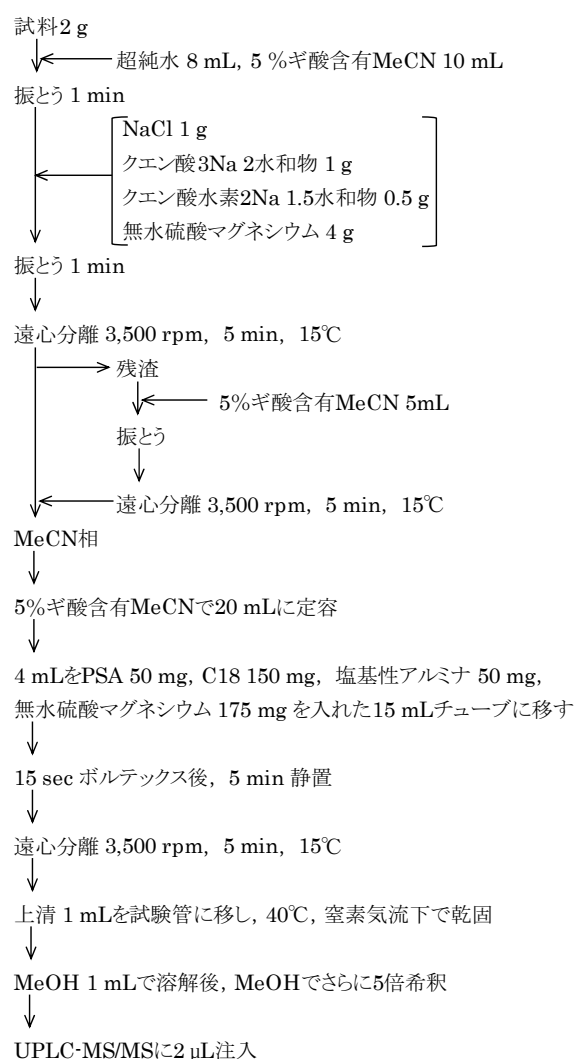


図 1 フローシート

5. 測定条件

LC 条件を表 1 に、MS/MS 条件を表 2 に示す。

表 1 LC 条件

カラム	ACQUITY UPLC®BEH C18 (1.7 μm, 2.1 mm x 100 mm)
カラム温度	40°C
移動相	A:5 mM 酢酸アンモニウム溶液 B:5 mM 酢酸アンモニウムメタノール溶液
流速	0.4 mL/min
グラジエント	B%濃度 : 15%→40%(0.5 min) →40%(1.5 min)→50%(2.5 min) →55%(3.5 min)→95%(8.5 min) →15%(11.5 min)→15%(15.0 min)
注入量	2 μL

表 2 MS/MS 条件

	Prec. Ion	Prod. Ion	CV (V)	CE (V)
CT(定量)	291	141	2	26
CT(定性)	291	106	2	26
WA (定量)	307	161	54	18
WA (定性)	307	250	54	22
BF(定量)	521	135	100	40
BF(定性)	521	79	100	42
BD(定量)	525	250	86	34
BD(定性)	525	93	86	38
DF(定量)	537	79	78	40
DF(定性)	537	151	78	38
PD(定量)	229	116	60	34
PD(定性)	229	88	60	46
DP(定量)	339	167	84	22
DP(定性)	339	116	84	44
CP(定量)	373	201	88	20
CP(定性)	373	145	88	20

なお、イオンソースの各条件について、Source Voltages は Capillary 0.50 kV, Cone 20 V, Source Temperatures は Desolvation Temp 400°C, また Source Gas Flow は Desolvation 800 L/hr, Cone 50 L/hr である。

結果および考察

1. 前処理条件の検討

予備実験の結果、最も添加回収が困難であった冷凍ししゃもを各前処理条件の検討に用いた。なお、以下の実験では全て、検討事項以外の条件は上記に示した条件を用い、評価濃度は 0.1 mg/kg で実施した。

1) 検体採取量

冷凍ししゃも 1 g, 2 g, 5 g および 10 g を採取し, 1, 2, および 5 g 採取した検体はそれぞれ加水して 10 g とした. 上記の試験溶液の調製に従って処理し, メタノールによる 5 倍希釈前の検液から添加回収率を求めた. 結果を図 2 に示した.

検体採取量が増えるに従って, DP, CP および DF の回収率が 50% 以下まで低下し, マトリックスの増加によるイオンサプレッションが疑われた. この結果と健康危機事象発生時では十分な量の検体が入手できないことも考えられることから, なるべく少量の検体でも分析可能とすることを考えた. 1 g 採取では測定値のばらつきおよび最終検液の測定感度が不足するおそれもあったため, 検体採取量は 2 g とした.

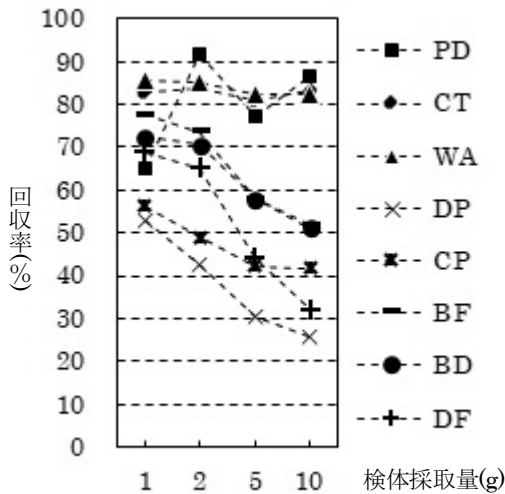


図 2 検体採取量による回収率への影響

2) 抽出溶媒

今回分析対象とした殺鼠剤は酸性化合物であるため, アセトニトリルのみでは抽出されにくいと考えた. 健康危機事象発生時には様々な pH の食品が検査対象になると予想される. 食品の pH によらず抽出可能な方法とするため, アセトニトリルにギ酸を 0, 1, 2 および 5% となるように添加し, メタノールによる 5 倍希釈前の検液から添加回収率を求め, 抽出の最適条件を検索した. 結果を図 3 に示した.

図 3 から, ギ酸添加により PD では回収率の改善がみられた.

また, 検討時に最終検液をメタノールにより 5 倍希釈しマトリックス効果を低減させたものも測定した. その結果, 特に DP と CP で回収率の改善がみられた. これはギ酸添加により, 分析対象物質の抽出量が増加すると同時に, 目視でも確認できる程度に抽出される夾雑物質の増加によりマトリックス効果も上昇し, 見目の回収率が, ギ酸 0% で抽出した場合と 5% で抽出した場合でほぼ同程度になったと考えた.

今回は試料からの対象物質の抽出効率を上げることを優先し, 抽出溶媒のギ酸濃度は 5% とした.

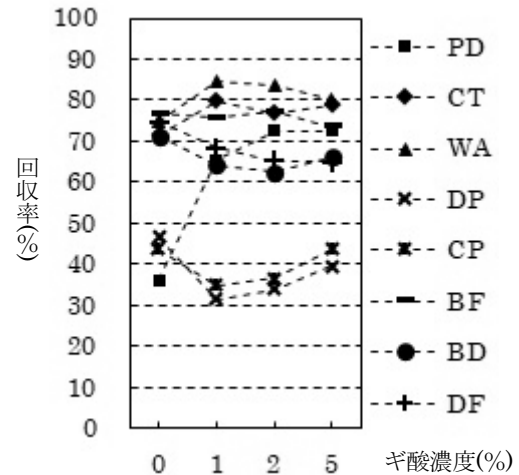


図 3 ギ酸添加による回収率への影響

3) 抽出回数

1 回の抽出では不十分であることも考えられたため, 2 回抽出することを検討した. 但し 2 回目の抽出液量は定容時の操作性から 5 mL とした. 結果を図 4 に示した.

図 4 から 2 回抽出することで, 各殺鼠剤の回収率の改善が見られたので抽出回数は 2 回とした.

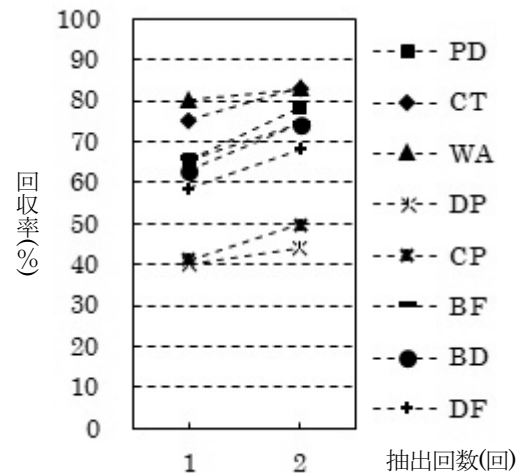


図 4 抽出回数による回収率への影響

4) 精製

Vudathala ら⁷⁾は PSA, フロリジル, C18 および塩基性アルミナを用いて臨床検体からの抗凝固剤系殺鼠剤の精製法を報告しているが, 今回は食品を対象とするため精製に使用する固相を新たに検討した.

フロリジルの使用は DP と CP の回収率の低下が顕著であったため, フロリジルは使用せず, PSA および C18 の量を変更することで最適な条件を検索した. なお塩基性アルミナは 50 mg で固定して検討した. 結果を表 3 に示した.

その結果, C18 の量を増加させた, PSA 50 mg, C18

150 mg および塩基性アルミナ 50 mg で精製した場合が、最も回収率のバランスが良かったため、今回採用した。

表 3 精製条件検討結果 (単位：%)

固相添加量 (μg)			殺鼠剤								
PSA	C18	アルミナ	CT	WA	BF	BD	DF	PD	DP	CP	
50	50	50	131	129	129	120	130	129	93	100	
150	50	50	83	87	78	68	77	83	57	62	
100	100	50	106	109	100	94	100	104	73	83	
50	150	50	109	114	100	97	97	89	77	82	

5) 最終検液の希釈

マトリックスによる質量分析計への負担の軽減および、イオンサプレッションの低下を狙って、メタノール 1 mL で溶解した検液と、さらにこの検液をメタノールで 5 倍希釈したものを測定し、回収率の比較を行った。結果を図 5 に示した。

その結果、メタノールで検液を 5 倍希釈することで回収率は改善した。特に DP および CP の回収率の改善が顕著であった。検液を希釈することで、質量分析計に導入される夾雑物質が減少し、イオン化の際のイオンサプレッションが低下したと考えられた。なお、ぎょうざでも検討したが、同様の傾向であった。

よって、最終検液を 5 倍希釈することとした。

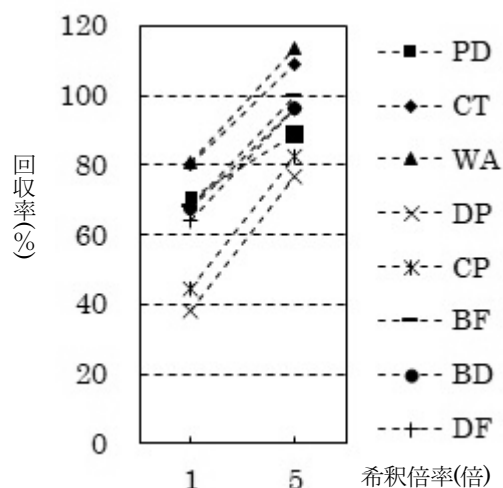


図 5 検液の希釈による回収率への影響

2. 添加回収試験

今回、加工食品 5 種、清涼飲料水 5 種と牛乳の計 11 種を用いて添加回収試験を実施した。試験は 3 試行で実施した。

分析法の評価は、平成 25 年 3 月 26 日付け医薬食品局食品安全部基準審査課事務連絡「加工食品中に高濃度に含まれる農薬等の迅速検出法について」に示されている評価条件に準じて行った。評価濃度は上記事務連絡中で示されている 0.1 mg/kg を評価濃度とした。

その結果、選択性は対象とした試料 11 種全てにおいて、基準を満たした。UPLC-MS/MS での感度は標準溶液 1 ppb で S/N 比 ≥ 10 であった。

表 4 に添加回収率、表 5 に併行精度を示した。回収率は PD で 70% を満たさない試料があったが、その他の試料と化合物の組み合わせでは概ね 70%~120% を満たし 50%~150% 以内には全て収まった。また、併行精度は PD の冷凍エビピラフ、スポーツドリンク以外の全ての組み合わせで RSD% < 15 を満たした。

表 4 添加回収率 (単位：%)

	CT	WA	BF	BD	DF	PD	DP	CP
ししやも	96	100	87	78	80	89	71	71
冷凍ぎょうざ	117	118	108	120	97	90	104	101
レトルトカレー	118	113	114	117	96	75	106	97
冷凍エビピラフ	94	99	101	102	99	61	91	92
冷凍からあげ	117	119	106	117	92	81	100	92
スポーツドリンク	120	124	112	123	106	56	110	111
緑茶	104	107	101	109	94	50	103	101
オレンジジュース	119	120	110	118	105	76	110	108
野菜ジュース	113	119	115	115	104	75	104	108
コーヒー	102	105	101	106	92	58	90	96
牛乳	118	120	113	118	107	73	117	117

表 5 併行精度 (単位：%)

	CT	WA	BF	BD	DF	PD	DP	CP
ししやも	6	6	5	10	9	5	7	7
冷凍ぎょうざ	6	1	3	6	8	9	9	4
レトルトカレー	8	6	6	9	9	7	7	7
冷凍エビピラフ	10	10	9	10	13	20	9	9
冷凍からあげ	10	10	11	8	7	10	9	10
スポーツドリンク	9	7	8	6	9	20	8	9
緑茶	2	3	3	0	5	10	3	2
オレンジジュース	4	3	5	2	1	13	2	2
野菜ジュース	9	9	6	11	12	11	10	8
コーヒー	10	11	8	12	13	11	10	11
牛乳	4	4	3	5	6	14	5	5

3. マトリックス効果

溶媒標準溶液に対するマトリックス標準溶液のピーク面積比 (以下、マトリックス効果と表現する) を表 6 に示した。検討した試料 11 種でのピーク面積比の範囲は 85%~121% であった。PD でコーヒーの夾雑物により若干の正のマトリックス効果が見られたもの、今回検討した精製方法およびメタノールによる希釈の

効果により、検量線作成時にマトリックスマッチングをせずとも、目的物質を測定することが可能と考えられた。

表6 マトリックス効果

	CT	WA	BF	BD	DF	PD	DP	CP
ししやも	100	104	98	102	105	111	85	89
冷凍ぎょうざ	105	103	98	97	100	118	98	100
レトルトカレー	101	104	108	98	107	113	97	99
冷凍エビピラフ	97	104	105	98	108	101	101	101
冷凍からあげ	104	104	101	92	96	93	97	100
スポーツドリンク	102	104	106	98	103	107	99	99
緑茶	101	102	101	94	107	105	95	99
オレンジジュース	101	102	97	100	101	99	92	97
野菜ジュース	102	103	103	95	107	101	93	96
コーヒー	103	103	98	95	101	121	89	94
牛乳	104	103	101	96	105	101	91	99

(マトリックス標準溶液のピーク面積/溶媒標準溶液のピーク面積値)

まとめ

抗凝固剤系殺鼠剤の分析法は、中毒患者由来の血液や臓器など臨床検体を対象としたものが多く報告されている^{1-3),7)}。一方、食品を対象とした分析法は農産物の残留分析を目的としたものが報告されている^{8),9)}。これらの分析法は高感度の分析法であるが、高度な精製技術を要することから、前処理操作は煩雑であり熟練を要する。また分析対象も農産物に限定される。

今回、殺鼠剤による高濃度汚染事例を想定して、多様な食品を対象とした分析法を検討した。検討結果を各視点から見た場合、以下のとおり考える。

操作性は、エバポレーターによる濃縮、固相カートリッジによる精製などの手間を要する方法は採用しておらず、混合、遠心分離、上清の回収を繰り返すだけの熟練を要さない簡便な方法である。また、内部標準や検量線作成時にマトリックスマッチングを用いない絶対検量線法による定量が可能である。

費用面は、QuEChERS法を応用しているため、抽出の際は、安価なディスポーザブル容器を使用し、また精製に使用する固相の使用量も少量としたため、カートリッジ型の固相カラムを使用するより条件検討にかかる費用を含めて非常に安価な分析法である。

2～3時間で検査可能であり、迅速性が重視される健康危機事象対応時に有効な方法と考える。

さらに、LC条件を残留農薬分析時と同じ設定にすることで、カラム交換および移動相の交換を伴わず、通常の検査業務の間に分析することも可能であり、装置を複数台所有していない小規模の実験施設でも導入

が容易であると考えられる。

なお、今回検討した分析法は添加回収試験時の添加濃度を0.1 µg/gとして検討した高濃度汚染を想定した危機管理事象対応のための分析法であり、残留分析を目的としたものではない。そのため、農産物等の残留農薬の検査等で求められる妥当性評価¹⁰⁾は実施していない。

今回は分析対象を農薬の一部である殺鼠剤とかなり限定して検討したが、今後は抽出条件や精製条件を変えることで、殺鼠剤以外の農薬を含め、分析可能な薬毒物の拡大を図り、地方衛生研究所としての危機管理対応能力の向上に努めていきたいと考える。

なお、本報告内容は第54回全国衛生化学技術協議会年会(2017年11月21日～22日、奈良市)において発表した。

文献

- 1) Bidny S., Gago K., David M. *et al.*: *J. Anal. Toxicol.*, **39**,219-224(2015)
- 2) Maršálek P., Modrá H., Doubková V. *et al.*: *Anal. Bioanal. Chem.*, **407**:7849-7854(2015)
- 3) Vandebroucke V., Desmet N., De Backer P., *et al.*: *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.*, **869**,101-110(2008)
- 4) 米田正樹, 山本雄也, 山下浩一, 他: 奈良県保健研究センター年報, **51**, 61-62 (2016)
- 5) European Committee for Standardization/ Technical committee CEN/TC 275 (2007), Foods of plant origin: Determination of pesticide residues using GC-MS and/or LC-MS/MS following acetonitrile extraction/partitioning and cleanup by dispersive SPE-QuEChERS method. European Committee for Standardization, Brussels.
- 6) Payá P., Anastassiades M.: *Anal. Bioanal. Chem.*, **389**, 1697-1714(2007)
- 7) Vudathala D., Cummings M., Murphy L.: *J. Anal. Toxicol.*, **34**,273-279(2010)
- 8) 齊藤静夏, 根本了, 松田りえ子: 食衛誌, **52**, 237-243(2011)
- 9) 齊藤静夏, 坂井隆敏, 根本了, 他: 食衛誌, **52**, 244-250(2011)
- 10) 医薬食品局食品安全部長通知「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインについて」, 食安発第1115001号, (平成19年11月15日)

UPLC-MS/MSによる畜産物中からの テトラサイクリン系抗生物質の一斉分析法の検討

北岡洋平・米田正樹・樋上 絢・西山隆之・山下浩一・堀 重俊

Simultaneous determination of Tetracyclines in animal products by Ultra High Performance Liquid Chromatography-tandem mass spectrometry

Yohei KITAOKA・Masaki YONEDA・Aya HIGAMI・Takayuki NISHIYAMA・
Hirokazu YAMASHITA and Shigetoshi HORI

緒 言

動物用医薬品は、畜産動物に対して、疾病の治療を目的に短期間で投与される以外に、飼育効率の改善や発育促進を目的に飼料添加物として飼料に混ぜて長期間に微量投与されている。

そのため畜産動物中で代謝・排泄されずに残留したまま出荷される場合があり、食品衛生法により、食品中の残留基準値が設定されている。特にテトラサイクリン系抗生物質(TCs)は、動物用医薬品や飼料添加物として広く使用され、平成28年度動物用医薬品系統別内訳(農林水産省)において最も販売量が多く、平成27年度食品中の残留農薬等検査結果(厚生労働省)においても検出事例の上位を占めており、畜産物中に残留している可能性が高い。

現在、厚生労働省の通知法は、対象物質がテトラサイクリン(TC)、オキシテトラサイクリン(OTC)、クロルテトラサイクリン(CTC)の3種類で、その試験方法の移動相として使用する緩衝液が高濃度のため、測定機器に負担がかかることや、蛍光検出器を用いたHPLC法のため、疑い物質検出時の物質同定ができないう等の難点が多い。また、ドキシサイクリン(DC)は残留基準値が設定されているが、試験法は示されていない。そこで、今回これらの問題点の改善のため、分析装置にUPLC-MS/MSを用いた畜産物中からのテトラサイクリン系抗生物質の4種類の一斉分析法の検討を行ったので報告する。

方 法

1. 試料

県内流通の鶏の筋肉、豚の筋肉及び牛の筋肉を対象とした。最初に鶏の筋肉について前処理条件の検討を行った後、豚の筋肉及び牛の筋肉について検討を行った。

2. 試薬及び標準物質

TCsの標準物質は、Sigma製のTC、OTC塩酸塩、DC塩酸塩を、CALBIOCHEM製のCTC塩酸塩を使用し、それぞれ、メタノールで1000 ppm溶液を作製後、適宜メタノール等で希釈し使用した。精製用固相カートリッジはジビニルベンゼン-N-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム Waters Oasis HLB(60 mg/3 cc/30 μm)を使用した。

3. 装置

UPLC-MS/MSは、Waters社製ACQUITY UPLC® H-Class及びXevo TQ-S microを使用した。

4. 測定条件及び定量限界値

測定条件は藤田らの報告¹⁾を参考に表1に示した。

表1 装置条件

カラム	ACQUITY UPLC®BEH C18(1.7 μm, 2.1 mm×100 mm)
カラム温度	30℃
移動相	A: 0.1%ギ酸 B: アセトニトリル
グラジエント条件	B%濃度:10%→20%(5 min)→90%(9 min)→90%(9.5 min)→10%(9.5 min)→10%(12.5 min)
流速	0.2 mL/min
注入量	2 μL
イオン化方法	ESI(+)

また、TCsのMS/MS条件(MRM)は標準溶液を用いて機器による自動最適化を行い決定し、表2に示した。

表2 TCsのMS/MS条件(MRM)

物質名	定量			定性		
	MRM Transision (m/z)	Cone Voltage(V)	Collision Energy(V)	MRM Transision (m/z)	Cone Voltage(V)	Collision Energy(V)
TC	445→410	36	18	445→427	36	12
OTC	461→426	4	18	461→443	4	12
CTC	479→444	2	20	479→461	2	16
DC	445→428	4	16	445→410	4	24

本測定条件における保持時間は、TC 5.7分、OTC 4.9分、CTC 7.2分、DC 7.4分、混合標準溶液を用いて検量線を作成したところ、1 ppb~20 ppbの範囲で各成分とも $R^2 > 0.995$ と良好な直線性を示した。厚生労働省の通知法²⁾の定量限界 (TC 0.02 ppm, OTC 0.02 ppm, CTC 0.03 ppm) より低い検体あたり 0.01 ppm 相当濃度である 2 ppb 溶液で S/N 比 ≥ 10 を確保できたので、0.01 ppm を定量限界に設定した。

なお、調製当日に測定した CTC 標準溶液のクロマトグラム (図 1) に対し、調製後日数が経過した CTC 標準溶液のクロマトグラムのピーク面積値が減少した (図 2)。

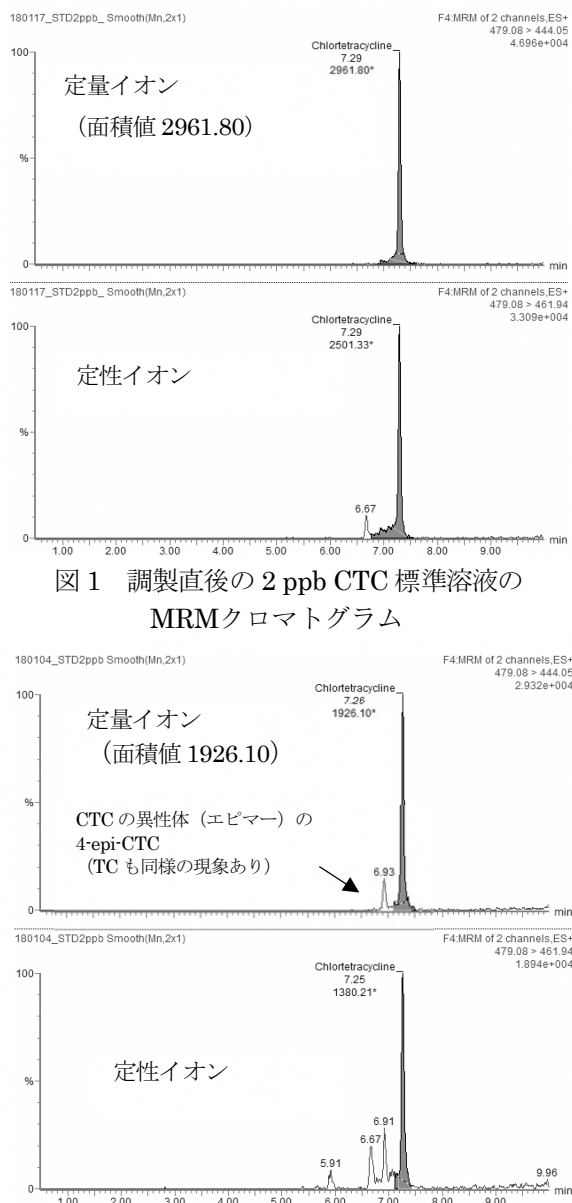


図 1 調製直後の 2 ppb CTC 標準溶液の MRM クロマトグラム

図 2 日数が経過した 2 ppb CTC 標準溶液の MRM クロマトグラム

TC 標準溶液も同様の傾向があり、標準溶液の保存中に異性体化 (エピマー化) することでエピマーのピ

ークが出現し、面積値の低下につながったと考えられた。そこで、使用する標準溶液はすべて用時調製とした。

5. 試験溶液調製

サンプルは脂肪を除去後、フードプロセッサーで均一化し、2.0 g を 50 mL 合成樹脂製遠沈管に正確に量り、EDTA 含有クエン酸緩衝液 20 mL を加えた。粉碎機で 30,000 rpm, 1 分間ホモジナイズした後、12,000 rpm, 15°C で 15 分間遠心分離し上清を No.2 ろ紙でろ過した。残渣に再度 EDTA 含有クエン酸緩衝液を加え、同条件で先のろ液に合わせ、EDTA 含有クエン酸緩衝液で 50 mL に定容し抽出液とした。抽出液 10 mL をあらかじめ、メタノール 3 mL, 水 3 mL でコンディショニングした Oasis HLB に負荷し、5%メタノールで洗浄後、メタノール 2 mL で 15 mL チューブに溶出した。その後、窒素気流下で乾固させ、0.1%ギ酸/アセトニトリル混液(9:1)で正確に 2 mL とし、0.20 μm PTFE メンブレンフィルターでろ過し、試験溶液とした (図 3)。

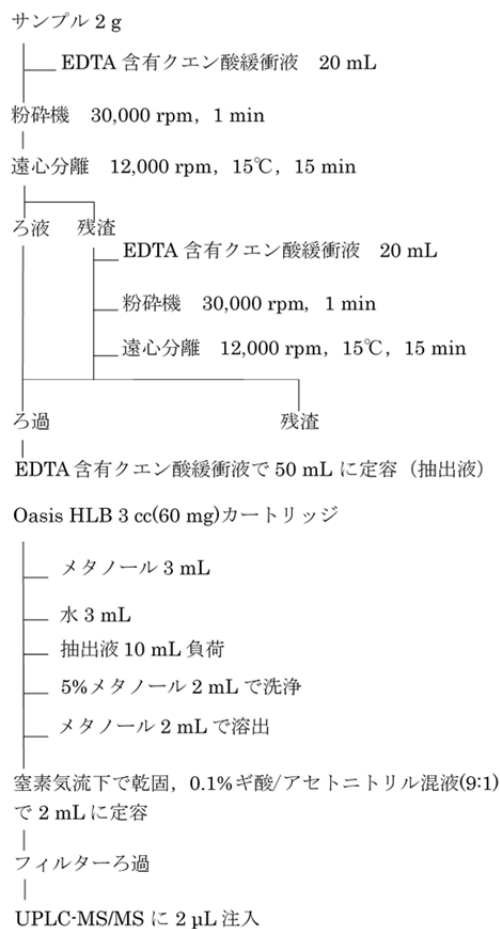


図 3 フローシート

6. 実験方法

1)抽出条件 (粉碎機, 遠心分離機回転数)

粉碎機と遠心分離機の回転数について検討した。粉碎機を 10,000, 20,000 及び 30,000 rpm, 遠心分離機を 4,000, 8,000 及び 12,000 rpm を組み合わせ、ろ過完了時間を比較した。

2)抽出条件（抽出回数）

抽出回数と回収率について、1～3 回抽出での回収率を比較した。

3)精製条件（洗浄液の検討,溶出液量）の検討

混合標準溶液を各成分が 100 ng になるよう抽出液に添加し、Oasis HLB に負荷した。5%, 10%, 20% メタノールでそれぞれ洗浄を行った。溶出液は、0.5 mL ずつ 4 mL まで 8 分画を採取した。

4)妥当性評価

鶏の筋肉を用いて決定した前処理条件で妥当性評価ガイドライン³⁾に基づき、基準値相当濃度で 2 名による 2 試行、3 日の計画で妥当性評価を実施した。鶏の筋肉の TC, OTC, CTC の基準値は 3 物質総和で 0.2 ppm であるため、約 1/3 相当濃度である各 0.06 ppm で実施した。まず、選択性の確認のため妨害ピークの有無を確認し、続いて真度、併行精度、室内精度について確認した。

次に、対象検体として豚の筋肉と牛の筋肉を追加し、鶏の筋肉と同様の計画で行った。牛の筋肉の DC については基準値が設定されていないため、定量限界値 0.01 ppm で実施した。

5)マトリックス効果

試験溶液に含まれる試料由来の成分(マトリックス)が、質量分析時において測定値に正または負の影響を及ぼすマトリックス効果について評価を行った。その方法として今回は論文等^{4,5)}を参照し、ブランク試料か作製した試験溶液(ブランク試験液)で調製した標準溶液と溶媒で調製した標準溶液の測定値の比を算出し、80%～120%の間にあればマトリックス効果はないと判定した。

結果及び考察

1. 抽出条件（粉碎機、遠心分離機回転数）の決定

結果を表 3 に示した。回転数はろ過完了時間が最短であった粉碎機回転数 30,000 rpm, 遠心機回転数 12,000 rpm に決定した。

表 3 粉碎機及び遠心分離の回転数とろ過完了時間

		遠心分離機回転数(rpm)		
		4,000	8,000	12,000
粉碎機 回転数 (rpm)	10,000	13分	17分	20分
	20,000	20分以上	8分	8分
	30,000	20分以上	7分	3分

2. 抽出条件（抽出回数）の決定

結果を表 4 に示した。抽出回数を 2 回とすることで、回収率が 14.3%～18.9%向上していることが確認できたが、3 回の場合でも回収率の向上が見られなかったため抽出回数は 2 回とした。

表 4 抽出回数と回収率

物質名	回数	1回(回収率)	2回(回収率)	3回(回収率)
TC		70.0	85.3	78.0
OTC		77.2	91.5	89.7
CTC		61.4	80.3	78.9
DC		68.6	86.0	94.9

3. 精製条件（洗浄液の検討,溶出液量）の決定

洗浄条件を検討した結果、20%メタノール及び 10%メタノールで溶出が起こっていないことを確認したが、念のため 5%メタノールで洗浄することに決定した。採取した分画を分析した結果、図 4 に示したとおり、溶出液量 1.5 mL までに溶出が完了していることを確認したが、念のため 2 mL で溶出することとした。

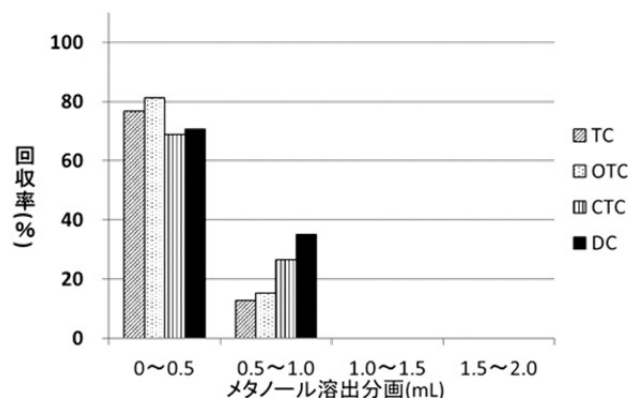


図 4 TCs の溶出挙動

4. 妥当性評価

鶏肉について選択性を確認した結果を表 5 に示した。

表 5 鶏の筋肉の妥当性評価結果（選択性）

物質名	基準値 (ppm)	評価濃度 (ppm)	定量イオン		定性イオン	
			評価濃度での標準溶液の面積値	ブランク試料での試験溶液の面積値	評価濃度での標準溶液の面積値	ブランク試料での試験溶液の面積値
TC	0.2 (3物質総和)	0.06	17165	0	7117	0
OTC		0.06	19214	0	8244	0
CTC		0.06	13109	0	9707	0
DC	0.05	0.05	44126	425	3484	0

DC では定量イオンで妨害ピークが認められたが、定量限界が基準値の 1/3 以下の場合に該当し、基準値に相当するピーク的面積(又は高さ)の 1/10 未満であったため、選択性の基準に適合していることを確認した。次に真度、併行精度、室内精度の結果を表 6 に示

した。

表 6 鶏の筋肉の妥当性評価結果
(真度,併行精度,室内精度)

物質名	基準値 (ppm)	評価濃度 (ppm)	平均値 (ppm)	評価項目		
				真度(%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)
TC	0.2 (3物質総和)	0.06	0.0507	84.5	9.9	11.9
OTC		0.06	0.0468	78.0	6.6	13.9
CTC		0.06	0.0529	88.2	4.4	9.5
DC	0.05	0.05	0.0400	80.0	10.3	11.6

3 評価項目で全て目標値 (真度 70%~120%, 併行精度 15%>, 室内精度 20%>) を満たしていた。

次に豚の筋肉と牛の筋肉について同様の検討を行ったが, 選択性の確認を行ったところ, 最終試験液中の夾雑物が多く, 基準を満たすことができなかつた(表 7)。そこで, 藤田らの報告¹⁾を参考に Oasis HLB カートリッジからの溶出液を, メタノールから 50%アセトニトリルに変更して再度検討を行ったが, 改善することができず, 定性イオンは豚の筋肉, 牛の筋肉ともに夾雑物のピークによって妨害を受け選択性の基準を満たすことができなかった (表 8)。

表 7 豚の筋肉, 牛の筋肉の妥当性評価結果 (選択性)
(メタノール溶出)

試料名	物質名	基準値 (ppm)	評価濃度 (ppm)	メタノール2mL			
				定量イオン		定性イオン	
			評価濃度での標準溶液での面積値	ブランク試料での試験溶液での面積値	評価濃度での標準溶液での面積値	ブランク試料での試験溶液での面積値	
豚の筋肉	TC	0.2 (3物質総和)	0.06	17165	0	7117	9685
	OTC		0.06	19214	0	8244	0
	CTC		0.06	13109	0	9707	0
	DC		0.05	44126	667	3484	0
牛の筋肉	TC	0.2 (3物質総和)	0.06	17165	0	7117	5808
	OTC		0.06	19214	0	8244	0
	CTC		0.06	13109	0	9707	0
	DC		-	0.01	9258	168	727

表 8 豚の筋肉, 牛の筋肉の妥当性評価結果 (選択性)
(50%アセトニトリル溶出)

試料名	物質名	基準値 (ppm)	評価濃度 (ppm)	50%アセトニトリル1mL			
				定量イオン		定性イオン	
			評価濃度での標準溶液での面積値	ブランク試料での試験溶液での面積値	評価濃度での標準溶液での面積値	ブランク試料での試験溶液での面積値	
豚の筋肉	TC	0.2 (3物質総和)	0.06	17101	0	7048	9492
	OTC		0.06	18184	0	7931	123
	CTC		0.06	11216	0	8663	0
	DC		0.05	32232	847	2820	0
牛の筋肉	TC	0.2 (3物質総和)	0.06	17101	0	7048	2983
	OTC		0.06	18184	0	7931	0
	CTC		0.06	11216	0	8663	0
	DC		-	0.01	5899	393	417

そこで, 夾雑物の影響を受けない定性イオンの MRM クロマトグラムを得ることを目的として定性用に採取するイオンを 3 イオンに増やし, 対応することとした (図 5)。次に真度, 併行精度, 室内精度について確認した。結果を表 9 に示す。結果は, 牛の筋肉における CTC の室内精度を除き, 目標値 (真度 70~120%, 併行精度(牛の筋肉の DC 以外 15%>, 牛の筋肉の DC 25%>), 室内精度(牛の筋肉の DC 以外 20%

>, 牛の筋肉の DC 30%>) を達成した。

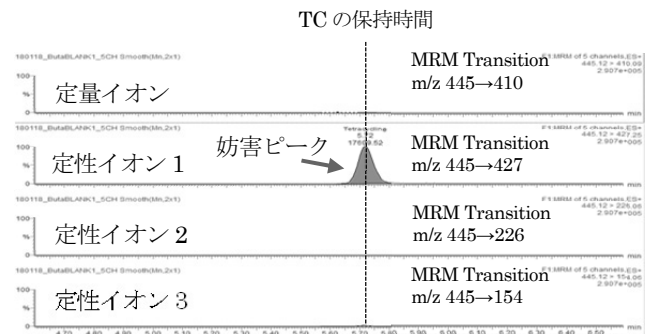


図 5 TC を含まない豚の筋肉から得た試験液の MRM クロマトグラム

表 9 豚の筋肉, 牛の筋肉の妥当性評価結果
(真度, 併行精度, 室内精度)

試料名	物質名	基準値 (ppm)	評価濃度 (ppm)	平均値 (ppm)	評価項目		
					真度(%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)
豚の筋肉	TC	0.2 (3物質総和)	0.06	0.0494	82.4	4.4	10.0
	OTC		0.06	0.0509	84.8	4.3	8.0
	CTC		0.06	0.0467	77.9	6.0	11.7
	DC		0.05	0.05	0.0424	84.8	8.0
牛の筋肉	TC	0.2 (3物質総和)	0.06	0.0489	81.5	6.0	9.8
	OTC		0.06	0.0524	87.3	4.3	9.0
	CTC		0.06	0.0579	96.4	5.0	25.6
	DC		-	0.01	0.0099	99.0	7.6

5. マトリックス効果

マトリックス効果の結果を表 10 に示した。牛の筋肉では 3 検体中 2 検体で 120 を超過した項目があったため, 牛の筋肉では正のマトリックス効果があることを確認した。

表 10 マトリックス効果評価結果

試料名	TC(%)	OTC(%)	CTC(%)	DC(%)
鶏の筋肉1	112.4	116.9	117.2	103.8
鶏の筋肉2	102.9	91.5	83.4	118.9
豚の筋肉1	103.3	105.0	100.4	94.0
豚の筋肉2	111.4	116.1	115.2	103.0
牛の筋肉1	164.1	140.1	198.9	109.4
牛の筋肉2	115.6	118.6	186.0	116.5
牛の筋肉3	109.6	111.1	90.6	110.9

まとめ

妥当性評価の結果から, 鶏の筋肉及び豚の筋肉については, 厚生労働省の通知法より高感度でかつ簡便な分析法を確立することができた。一方で, 牛の筋肉では室内精度が目標値を達成できなかったため精製が不十分であると考えられた。また, マトリックス効果も認められたことから, 今回検討した分析法を牛の筋肉に適用するには精製条件の追加検討が必要であると考えられた。

文 献

- 1) 藤田 瑞香, 柿本 健作, 田口 修三, 他 : 大阪府立公衆衛生研究所報, **45**, 77-81(2007)
- 2) 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」, 食安発第 0124001 号別添, (平成 17 年 1 月 24 日)
- 3) 医薬食品局食品安全部長通知「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインについて」, 食安発第 1115001 号, (平成 19 年 11 月 15 日)
- 4) 齊藤 静夏, 坂井 隆敏, 根本 了, 他 : 食衛誌, **52**, 244-250(2011)
- 5) 丹羽 誠, 薬物動態研究における LC/MS/MS 定量入門, 123(2011)

県内で分離されたカルバペネム耐性腸内細菌科細菌 (CRE) における 薬剤耐性遺伝子検出状況

吉田孝子・田邊純子・橋田みさを・内田美枝

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

Takako YOSHIDA・Sumiko TANABE・Misao HASHIDA and Yoshie UCHIDA

緒言

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

近年、世界規模でのCREの増加が懸念されており、日本でも、海外からの輸入事例の早期探知、国内での感染拡大防止を目的として、2014年9月19日から感染症法の五類全数把握対象疾患に指定された。当センターでは、2015年4月から2016年3月の間、検査体制の構築を目的として4医療機関より収集した菌株についてカルバペネマーゼ遺伝子検査を実施した¹⁾。2016年4月からは、奈良県感染症発生動向調査事業実施要領により、患者から分離されたCREについて、薬剤耐性遺伝子検査を実施することになり、当センターにおいて協力医療機関より菌株を収集し、β-ラクタマーゼ産生性及びβ-ラクタマーゼ遺伝子の保有状況について検査を実施したので結果を報告する。

方法

1. 材料

2016年4月から2017年3月までの間に、県内6医療機関においてCRE感染症として届出された19株について、検査を実施した。なお、患者情報、菌種等は発生届に基づく。

2. ディスク拡散法によるβ-ラクタマーゼ産生性確認試験

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

配置した。ディスク拡散法 (double disk synergy test (DDST)) により、いずれかの薬剤ディスクにおいて、阻止円径の拡張を確認した場合を陽性と判定した^{2,3)}。

基質特異性拡張型β-ラクタマーゼ (ESBL) 産生性確認試験として、セフォタキシム (CTX) と CAZ の間に、アモキシシリン・クラブラン酸 (AMPC/CVA)、及びアンピシリン・スルバクタム (ABPC/STB) のセンシディスクを配置し、CTX と CAZ の阻止円径の比較と、CVA 及び STB による阻害効果を確認した (DDST)。結果については、国立感染症研究所による薬剤耐性菌研修会資料³⁾に記載の判定基準に基づき、CTX-M 型、TEM 型、SHV 型、判定保留の判定を行った。

AmpC β-ラクタマーゼ (AmpC) 産生性確認試験として、CAZ とセフミノクス (CMNX) のセンシディスク及びAmpC活性阻害剤である3-アミノフェニルボロン酸 (APB) 500 μg を添加した CAZ と CMNX ディスクを使用した。いずれかの薬剤ディスクにおいて、阻止円径の拡張が5mm以上ある場合を陽性と判定した⁴⁾。

3. β-ラクタマーゼ遺伝子型確認試験

PCR法によりカルバペネマーゼ遺伝子⁵⁾ (NDM型、KPC型、IMP-1型、IMP-2型、VIM-2型、OXA-48型)、ESBL遺伝子^{6,7)} (TEM型、SHV型、CTX-M-1 group(G)、CTX-M-2 group(G)、CTX-M-9 group(G))、AmpC遺伝子⁴⁾ (MOX型、CIT型、DHA型、ACC型、EBC型、FOX型)の保有の有無を確認した。

4. 薬剤耐性遺伝子の同定

IMP-1型遺伝子を検出した菌株については、IMP-1型シーケンス用プライマー⁵⁾を用い、ダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定し、National Center for Biotechnology Information (NCBI) のBLAST解析により薬剤耐性遺伝子を同定した。

結果

1. 菌株の由来

供試した 19 株の由来は、性別では、男性 14 株、女性 5 株と男性が多かった。年齢は、40 歳未満はなく、80～89 歳が最も多く、60 歳以上の高齢者が 79%を占めた (図 1)。

検出部位は、尿が最も多く 9 株 (47%) であった。次いで、血液 4 株 (21%) で、その他は胆汁、喀痰、膿などであった。

菌種は、*Escherichia coli* が 8 株 (42%) で最も多く、次いで、*Enterobacter aerogenes* が 4 株 (21%)、*Citrobacter freundii* が 3 株 (18%)、*Enterobacter cloacae*、*Serratia marcescens* が各 2 株であった。

2. ディスク拡散法によるβ-ラクタマーゼ産生性確認試験

メタロ-β-ラクタマーゼ産生性確認試験では、阻止円径の拡張が確認できたのは、8 株 (42%) で、その

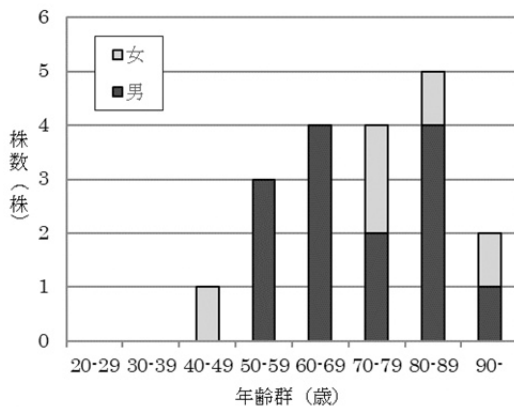


図 1 菌株の由来 (性別年齢分布)

菌種は *E. coli* が 7 株、*E. cloacae* が 1 株であった (表 1)。

ESBL 産生性の確認試験では、CTX-M 型と判定したのは 8 株で、*E. coli* が 7 株、*E. cloacae* が 1 株であった。TEM 型、SHV 型と判定した菌株はなく、判定保留が 1 株あった (表 1)。

AmpC 産生性の確認試験では 10 株が陽性で、*E. aerogenes* が最も多く 4 株、*C. freundii* が 3 株、*S. marcescens* が 2 株、*E. cloacae* が 1 株あった (表 1)。

メタロ-β-ラクタマーゼ産生性が陽性の菌株は、1 株を除いて CTX-M 型陽性 (1 株は判定保留) であった。AmpC 産生性が陽性の菌株は、その他の阻害剤による影響はなかった。

また、いずれのβ-ラクタマーゼ阻害剤でも阻害の効果が認められなかった菌株はなかった。

3. β-ラクタマーゼ遺伝子型確認試験

PCR 法の結果、全 19 株のうち、カルバペネマーゼ遺伝子では、IMP-1 型遺伝子を 8 株 (42%) 検出した。菌種は *E. coli* が 7 株、*E. cloacae* が 1 株であった。

ESBL 遺伝子では、TEM 型と CTX-M-2 G の両方を検出した菌株が *E. coli* で 4 株、CTX-M-2 G のみを検出した菌株が *E. coli* で 2 株、*E. cloacae* で 1 株、CTX-M-9 G を検出した菌株が *E. coli* で 2 株、TEM 型を検出した菌株が *S. marcescens* で 2 株あった。IMP-1 型遺伝子を検出した菌株は、全てから CTX-M 型遺伝子を検出した。

表 1 検査結果

番号	菌種	阻害剤による確認試験			PCR法による検出遺伝子			シーケンス結果
		SMA	CVA, SBT	APB	カルバペネマーゼ	ESBL	AmpC	
1	<i>E. coli</i>	+	CTX-M型	-	IMP-1 型	TEM 型,CTX-M-2G	-	<i>bla</i> _{IMP-6}
2	<i>E. coli</i>	+	CTX-M型	-	IMP-1 型	TEM 型,CTX-M-2G	-	<i>bla</i> _{IMP-6}
3	<i>E. coli</i>	+	CTX-M型	-	IMP-1 型	TEM 型,CTX-M-2G	-	<i>bla</i> _{IMP-6}
4	<i>E. coli</i>	+	判定保留	-	IMP-1 型	TEM 型,CTX-M-2G	-	<i>bla</i> _{IMP-6}
5	<i>E. coli</i>	+	CTX-M型	-	IMP-1 型	CTX-M-2G	-	<i>bla</i> _{IMP-6}
6	<i>E. coli</i>	+	CTX-M型	-	IMP-1 型	CTX-M-2G	-	<i>bla</i> _{IMP-6}
7	<i>E. coli</i>	+	CTX-M型	-	IMP-1 型	CTX-M-9G	-	<i>bla</i> _{IMP-6}
8	<i>E. coli</i>	-	CTX-M型	-	-	CTX-M-9G	-	
9	<i>E. cloacae</i>	+	CTX-M型	-	IMP-1 型	CTX-M-2G	-	<i>bla</i> _{IMP-6}
10	<i>E. cloacae</i>	-	-	+	-	-	EBC 型	
11	<i>E. aerogenes</i>	-	-	+	-	-	-	
12	<i>E. aerogenes</i>	-	-	+	-	-	-	
13	<i>E. aerogenes</i>	-	-	+	-	-	-	
14	<i>E. aerogenes</i>	-	-	+	-	-	-	
15	<i>C. freundii</i>	-	-	+	-	-	-	
16	<i>C. freundii</i>	-	-	+	-	-	CIT 型	
17	<i>C. freundii</i>	-	-	+	-	-	CIT 型,DHA 型	
18	<i>S. marcescens</i>	-	-	+	-	TEM 型	-	
19	<i>S. marcescens</i>	-	-	+	-	TEM 型	-	

AmpC 遺伝子では、CIT 型と DHA 型の両方を検出した菌株が *C. freundii* で 1 株、CIT 型のみを検出した菌株が *C. freundii* で 1 株、EBC 型を検出した菌株が *E. cloacae* で 1 株あった。

いずれの薬剤耐性遺伝子も検出しなかった菌株が 5 株あった。

4. 薬剤耐性遺伝子の同定

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

考 察

カルバペネム系薬剤耐性メカニズムは、2 つに大別される。1 つは、カルバペネム系薬剤分解酵素であるカルバペネマーゼを産生するカルバペネマーゼ産生菌（carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* : CPE）であり、もう 1 つはカルバペネマーゼを産生せず、AmpC 産生菌や、ESBL 産生菌の外膜蛋白ポーリンが欠損または欠失したことによる薬剤の膜透過性低下である。

CPE については、カルバペネマーゼ産生遺伝子はプラスミド上に存在しており、プラスミドは菌種を超えて水平伝達され、薬剤耐性遺伝子が拡散する可能性がある。さらに、CPE は、カルバペネム系薬剤のみならず、広域β-ラクタム剤を含む他系統の薬剤にも耐性になることが多く、临床上重要視されている。これらの理由で、CRE の中でも CPE については、特にその対策上、検出状況の把握が重要であるが、カルバペネマーゼ非産生菌との鑑別は、表現型だけでは難しく、遺伝子検査が必須となっている⁸⁾。

今回の調査では、医療機関で CRE と判定され、発生届出がされた 19 株のうち、カルバペネマーゼ遺伝子である IMP-1 型遺伝子を検出したのは、*E. coli* が 7 株、*E. cloacae* が 1 株であった。この 8 株の塩基配列を確認したところ、全て *bla*_{IMP-6} であった。この *bla*_{IMP-6} は、イミペネムに対しては、感性若しくは中間型になり、耐性を示さない⁹⁾ことがあるため、初期のスクリーニングで見逃される恐れがあることが、大きな問題として指摘されている。*bla*_{IMP-6} は、日本で多く検出されているカルバペネマーゼ遺伝子の 1 つであり、特に西日本を中心に多く検出されている³⁾。当県においても既報⁷⁾により検出報告をしている。今回、*bla*_{IMP-6} を保有していた菌株は、全て CTX-M 型の遺伝子を保有し、その半数は TEM 型遺伝子を保有していた。これは、国内において、*bla*_{IMP-6} を保有していた *E. coli* 49 株において、全ての菌株で CTX-M 型遺伝子を保有し、

23 株で TEM 型遺伝子を保有していたという報告¹⁰⁾と類似した結果であった。また、*bla*_{IMP-6} と CTX-M-2 G 遺伝子を保有していた複数菌種の腸内細菌科細菌による大規模な院内感染事例¹¹⁾も報告されていることから、国内で拡散傾向のある CPE の広がりには注意が必要である。

カルバペネマーゼ遺伝子を保有していない菌株は、11 株と半数以上存在した。これらの菌株はディスク拡散法で、ESBL 産生株が 1 株、AmpC 産生株が 10 株あった。PCR 法による遺伝子型の確認では、ESBL 遺伝子である CTX-M-9 G、TEM 型を、AmpC 遺伝子では EBC 型、CIT 型、DHA 型を検出した。検出した ESBL 遺伝子、及び AmpC 遺伝子はプラスミド性¹²⁾であり、カルバペネマーゼ遺伝子を保有していない菌株についても、薬剤耐性遺伝子の水平伝播の可能性が危惧される結果であった。

CRE の増加は、临床上、さらに院内感染対策上、重大な問題であるが、現在の届出基準では、カルバペネマーゼ遺伝子を保有していない菌株も届出対象になる。カルバペネマーゼ遺伝子を含むβ-ラクタマーゼ遺伝子保有の有無を確認する上で、地方衛生研究所の果たす役割は大きいと考えられる。

今後も継続して調査を実施し、医療機関等への情報還元を行っていく必要がある。

謝 辞

今回の調査を実施するにあたり、菌株と情報を提供して頂きました県内各医療機関の皆様様に深く御礼申し上げます。

文 献

- 1) 吉田孝子, 河口友理, 佐伯美由紀, 他 : 奈良県保健研究センター年報, 51, 48-50(2016)
- 2) Shibata. N, Doi. Y, Yamane. K, *et al.* : *J. Clinical Microbiology*, 41, 5407-5413 (2003)
- 3) 国立感染症研究所細菌第二部第一室「薬剤耐性菌研修会資料」(2014年9月)
- 4) Javier Pérez-Pérez. F, Hanson. N.D. : *J. Clinical Microbiology*, 40, 2153-2162 (2002)
- 5) 国立感染症研究所「病原体検出マニュアル 薬剤耐性菌」(2016年12月)
- 6) Xu. L, Ensor. V, Gossain. S, *et al.* : *J. Medical Microbiology*, 54, 1183-1187(2005)
- 7) Monstein. H, Ostholm-Balkhed. A, Nilsson. M, *et al.* : *APMIS*, 115, 1400-1408(2007)
- 8) 荒川宜親 : 日本化学療法学会誌, 63, 187-197

(2015)

- 9) Shigemoto. N, Kuwahara. R, Kayama. S, *et al.* : *Diagn Microbiol Infect Dis.* , **72**, 109-112
(2012)
- 10) Yano. H, Ogawa. M, Endo. S, *et al.* :
Antimicrob. Agents Chemother. , **56** ,
4554-4555 (2012)
- 11) 国立病院機構大阪医療センターにおけるメタロ
β-ラクタマーゼ (MBL) 産生腸内細菌科の集積
に関する外部調査報告書(平成28年2月10日)
- 12) 中村竜也 : 臨床と微生物, **42**, 548-552(2015)

奈良県における腸管出血性大腸菌検出状況：2017年度

佐伯美由紀・田邊純子・橋田みさを・内田美枝

Prevalence of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Detected in Nara Prefecture, 2017

Miyuki SAEKI・Sumiko TANABE・Misao HASHIDA and Yoshie UCHIDA

緒言

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

本報では、2017年4月から2018年3月の間に奈良県で届出された EHEC 感染症と、当センターへ搬入または当センターで分離した EHEC 菌株について、患者情報や細菌検査の結果等をまとめたので報告する。

材料と方法

1. 材料

2017年4月から2018年3月の間に奈良県で報告された EHEC 感染者は22例あり、内2例は当センターの接触者検便で菌を検出した。保健所等から搬入された20株と合わせて EHEC 菌株22株を対象として検査を実施した。患者情報は、保健所の調査結果に基づく。

2. 血清型別及びベロ毒素 (VT) 型別

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

3. 薬剤感受性試験

アンピシリン (ABPC)、セフトキシム (CTX)、セフトキシム (CPDX)、ゲンタマイシン (GM)、カナマイシン (KM)、ストレプトマイシン (SM)、テトラサイクリン (TC)、シプロフロキサシン (CPFX)、ナリジクス酸 (NA)、ST 合剤 (ST)、クロラムフェニコール (CP) 及びホスホマイシン (FOM) の12薬剤

について、センチ・ディスク (日本 BD) を用いた感受性試験を CLSI 法に準拠して実施した。

4. 分子疫学解析

O157 株は当センターにおいて IS-printing system (東洋紡、以下 IS) 法による遺伝子型別を実施した。また、感染研へ送付した菌株のうち、O157, O26, O111, O103, O121, O145, O165 及び O91 株は反復配列多型解析 (MLVA) 法、他の O 血清株はパルスフィールド・ゲル電気泳動 (PFGE) 法による分子疫学解析が実施され、結果の情報提供をうけた。

結果

1. 腸管出血性大腸菌の検出状況

月別検出数は7月及び8月が各6株(各27.3%)と最多で、7~9月に15株(68.2%)と例年同様、夏期に多かった(図1)。

年齢は1歳から68歳までと幅広く、性別で見ると男性11人、女性11人であった(図2)。

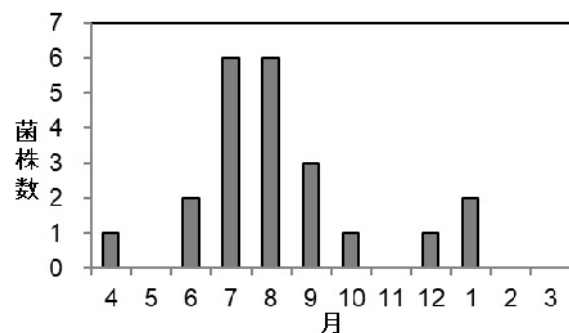


図1 月別検出状況

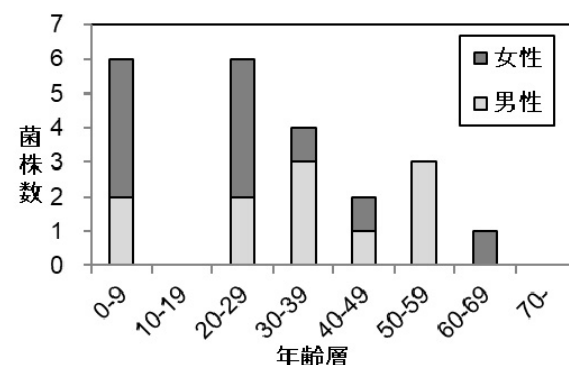


図2 年齢別・性別検出状況

表 1 臨床症状

血清型	菌株数	臨床症状*						
		無症状	腹痛	下痢	血便	発熱	嘔吐	頭痛
O157:H7	10	4	6	6	4	0	1	1
O157:H-	1	0	1	0	1	0	0	0
小計	11	4	7	6	5	0	1	1
O26:H11	8	3	3	5	4	2	0	0
O145:H-	1	0	1	1	0	1	1	0
O146:H-	1	1	0	0	0	0	0	0
O174:H21	1	1	0	0	0	0	0	0
合計	22	9	11	12	9	3	2	1

* 2つ以上の臨床症状が報告された例を含む。

2. 臨床症状

対象とした EHEC 菌株 22 株における感染者の臨床症状を見ると (表 1), O157 感染 11 例中 7 例が有症で, 腹痛 (7 例) と下痢 (6 例) が多く, 血便は 5 例で見られた. O26 感染 8 例中 5 例が有症で, うち 4 例で血便が見られた. O145 感染 1 例は有症で, 血便は見られなかった. O146 感染 1 例と O174 感染 1 例は無症状病原体保有者であった. 溶血性尿毒症症候群 (HUS) 発症例はなかった.

3. 血清型・毒素型

O 血清群は 5 種類あり (表 2), O157 が 11 株 (50.0%) と最も多く, 10 株が O157:H7, 1 株が O157:H- であった. O26 は 8 株 (36.4%) あり全て O26:H11 であった. 他に O145:H-, O146:H-, O174:H21 が各 1 株あった. O146:H- 及び O174:H21 は典型的な大腸菌の生化学的性状を示した. また, セフィキシム・亜テルル酸カリウム (CT) 含有平板培地において, O146:H- は発育が見られず, O174:H21 は発育した.

毒素型は, O157 は VT1&VT2 が 8 株, VT2 単独が

表 2 血清型と毒素型

血清型	VT型	菌株数	変異型VT2遺伝子	
			<i>stx2c</i>	<i>stx2d</i>
O157:H7	VT2	3	1	0
O157:H7	VT1&VT2	7	2	0
O157:H-	VT1&VT2	1	1	0
小計		11	4	0
O26:H11	VT1	8	0	0
O145:H-	VT2	1	0	0
O146:H-	VT2	1	0	1
O174:H21	VT2	1	1	0
合計		22	5	1

3 株であった. VT1&VT2 の 1 株は, 届出時情報では VT1 単独だったが当センターで PCR の結果, VT1 & VT2 と判明した. O26 は全ての株が VT1 単独であった. O145, O146 及び O174 は全ての株が VT2 単独であった. 変異型 VT2 遺伝子は, *stx2c* 遺伝子を O157 の 4 株及び O174 の 1 株から, *stx2d* 遺伝子を O146 の 1 株から検出した (表 2).

4. 薬剤感受性試験

1 剤以上に耐性の菌株は 9 株あり, 5 剤耐性が O157 に 1 株, 4 剤耐性が O145 に 1 株, 3 剤耐性が O157 に 2 株見られた. O146 と O176 の菌株は 12 薬剤に感受性を示した (表 3).

表 3 薬剤感受性試験

O血清群	耐性	耐性薬剤名	菌株数
O157	5剤	ABPC, SM, TC, ST, CP	1
		SM, TC, CP	2
	1剤	SM	1
	なし	—	7
O26	1剤	SM	4
	なし	—	4
O145	4剤	ABPC, SM, TC, CP	1
O146	なし	—	1
O174	なし	—	1

5. 分子疫学解析

O157 菌株 11 株について IS 法を実施し, データを近畿 IS データベースに準じてセット毎に十進数の数値に変換した (IS コード). その結果, 11 株は 9 タイプに分類された. 2 株以上で一致した IS コードは 2 タイプあったが, 2 タイプとも感染研による MLVA type が異なり, 疫学情報でも関連性は見られなかった.

また、O26のうちMLVA法の解析結果が同一のtypeまたはcomplexであった2パターン6株については、いずれも同居家族など疫学的に関連性のある菌株であった。

考 察

全国における2017年1月から12月までのEHEC感染症報告数は全国で3,904例であり、前年の3,645例より増加していた³⁾。奈良県においては2017年4月から2018年3月の間に22例の報告があり、前年の18例より増加した。

2株は患者発生に伴う接触者検便により当センターで検出した。この事例は次女と三女（ともに幼児）が患者であり、接触者検便によって父親と長女（小学生）からO26が検出された。毒素型別、薬剤感受性試験及びMLVA法による遺伝子解析等の結果、分離株の類似度は高く、感染源は同一であると考えられたが、4名は幼児を含む同居家族であり、共通食の他、牧場で動物と接触した共通の機会もあり、感染原因の特定には至らなかった。

保健所による患者調査情報を見ると、有症者13名のうち6名が発症前1週間ほどの間に焼肉等肉料理を喫食していた。中には自家調理で牛の内臓肉を生で喫食した事例もあったが、食品等の残品がなく、原因食品の特定には至らなかった。EHEC感染者減少のためには、かねてから言われているように、食肉の適切な加熱と、焼肉やバーベキューの際は生肉を扱う箸と口に運ぶ箸を使い分けるなどの調理時の二次汚染防止の徹底が重要であると考えられる。

医療機関からの届出時情報ではVT1単独だったが当センターのPCRでVT1 & VT2と判明したO157の1株は、変異型VT2遺伝子である*stx2c*遺伝子を保有していた。VT2cは逆受身ラテックス凝集反応(RPLA)法の検出感度がやや低く、イムノクロマト(IC)法や酵素抗体(EIA)法では検出されない場合があることが知られており⁴⁾、これらのことが医療機関の検査結果との違いに表れたと推察された。

2017年度は、県内分離例として初のO146及びO174のような稀な血清型の菌株や、*stx2d*遺伝子保有株を扱う機会があった。これらの性状等情報を収集・蓄積していき、様々な検査に対応できるように努めていきたい。今後もEHEC感染症事例における分離株について、各種試験の実施やデータ蓄積を継続して、科学的側面から県内感染症の予防と拡大防止に寄与していきたいと考えている。

菌株収集にご協力を頂いた県内医療機関等と保健所

関係者の皆様、そしてDNA型別解析結果を還元して頂いた国立感染症研究所の皆様、誠にありがとうございます。本報告内容の一部は、厚生労働科学研究費補助金新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業の支援を受けて実施した。

文 献

- 1) Cebula TA, Payne WL, Feng P, *et al.* : *J. Clin. Microbiol.*, 33, 248-250 (1995)
- 2) Wang G, Clark CG, Rodgers FG, *et al.* : *J. Clin. Microbiol.*, 40, 3613-3619 (2002)
- 3) 病原微生物検出情報, 39, 71-72 (2018)
- 4) 国立感染症研究所 病原体検出マニュアル

レジオネラ属菌のLAMP法における反応阻害物質の影響軽減に関する検討

辻本真弓・久野翔平・河口友理・佐伯美由紀・吉田孝子・田邊純子・橋田みさを・内田美枝

Studies of the Method of Reducing the Influence of Reaction Inhibitors in the LAMP Method of *Legionella* spp.Mayumi TSUJIMOTO・Syohei HISANO・Yuri KAWAGUCHI・Miyuki SAEKI・Takako YOSHIDA
Sumiko TANABE・Misao HASHIDA and Yoshie UCHIDA

緒言

レジオネラ症は、レジオネラ属菌を起因菌とする細菌感染症で、四類感染症に指定されている。主に公衆浴場等の水系感染を原因とし、免疫力の低下している高齢者や基礎疾患のある人などでは、重篤な場合には死亡することもあるため、公衆浴場等の施設の衛生管理は特に重要とされる。現在、レジオネラ属菌の検出は培養法により行っているが、検査結果を得るまでに7日から10日を要する。そのため、患者発生時の感染源調査では、結果が出るまで利用が継続されることで、感染拡大が懸念される。また、改善措置後の陰性確認の際も、事業者側が入浴施設を長期間利用自粛することとなり、経済的な損失が大きい。このような背景から、迅速検査法の導入が望まれており、迅速検査法の一つに、LAMP (Loop-mediated Isothermal Amplification) 法が挙げられる。LAMP法は培養法に比べて、短時間で検査結果が得られるが、当センターで平成28年度に実施したレジオネラ検査において、培養法陽性の検体がLAMP法で陰性となる事例があり、検体中に含まれる成分により、LAMP法の反応阻害が起こっている可能性が考えられた。遺伝子増幅反応においては、鉄イオンなどの金属イオン、フミン酸などの種々の物質の存在下で反応阻害が起きることが報告されており¹⁾、現状の検査方法では、検体に含まれる成分によってはLAMP法による対応が難しい。そこで、LAMP法における反応阻害物質の影響を軽減する検査方法を確立することを目的に、検討を行ったので報告する。

材料と方法

1. フミン酸及び鉄イオンのLAMP法への影響

1) 材料

(1) フミン酸濃度調製試料

フミン酸濃度を0 mg/L, 0.1 mg/L, 1.0 mg/L, 10 mg/Lと段階的に調製した溶液2 mLに、レジオネラ

属菌の標準株 (*Legionella pneumophila* 長崎80-045株:国立感染症研究所より分与)を低菌数(10^1 CFU/mL)及び高菌数(10^3 CFU/mL)になるように添加した。

(2) 鉄イオン濃度調製試料

鉄イオン濃度を0 mg/L, 2.0 mg/L, 20 mg/L, 200 mg/Lと段階的に調製した塩化鉄(III)溶液2 mLに、レジオネラ属菌の標準株を低菌数(10^1 CFU/mL)及び高菌数(10^3 CFU/mL)になるように添加した。

2) 方法

各濃度調製試料について、Loopamp レジオネラ検出試薬キットE (栄研化学)を用い、付属の説明書に従いLAMP法を実施した。DNA抽出はキット付属の抽出試薬を用い、アルカリ熱抽出法により行った。検出はリアルタイム濁度測定装置LA-320C (栄研化学)を用い、判定を行った。

2. 反応阻害を軽減するDNA抽出法の検討

1) 材料

(1) フミン酸添加試料

フミン酸濃度を1.0 mg/Lに調製したフミン酸溶液2 mLに、レジオネラ属菌標準株を低菌数(10^1 CFU/mL)になるように添加した。

(2) 鉄イオン添加試料

鉄イオン濃度を2.0 mg/Lに調製した塩化鉄(III)溶液2 mLに、レジオネラ属菌標準株を低菌数(10^1 CFU/mL)になるように添加した。

2) 方法

(1) DNA抽出

① アルカリ熱抽出法

Loopamp レジオネラ検出試薬キットE (栄研化学)付属の抽出試薬を用い、付属のプロトコールに従い行った。

② カラム抽出法(NucleoSpin Tissue XS)

NucleoSpin Tissue XS (タカラバイオ)を用い、付属のプロトコールに従い行った。

③ カラム抽出法(QIAamp DNA Mini Kit)

QIAamp DNA Mini Kit(QIAGEN)を用い、付属

のプロトコールに従い行った。

④ キレックス処理

試料 2 mL を 4℃, 13,000×g, 10 分間遠心分離を行い, 上清 1960 μL を除いた。残った濃縮液 40 μL に 10%キレックス溶液を 40 μL 加え, 混合した。95℃ で 10 分間加熱し, 16,000×g, 1 分間遠心分離し, 上清 5 μL を DNA 抽出液とした。

⑤ 低速遠心+キレックス処理

試料 2 mL を 800×g, 1 分間遠心分離し, 上清 1960 μL を新しいチューブに移し, 4℃, 13,000×g, 10 分間遠心分離を行った。上清 1920 μL を除き, 残った濃縮液 40 μL に 10%キレックス溶液を 40 μL 加え, 混合した。95℃ で 10 分間加熱し, 16,000×g, 1 分間遠心分離し, 上清 5 μL を DNA 抽出液とした。

3. 実検体を用いた改良法の検証

1) 材料

平成 28 年度に行政検査として搬入された培養法陽性/LAMP 法陰性の反応阻害が考えられた事例の温泉水 7 検体及び平成 29 年度に行政検査として搬入され, LAMP 法が陽性であった浴槽水 9 検体を用いた。

2) 方法

(1) 浴槽水試料の濃縮

レジオネラ症防止指針に記載されているレジオネラ属菌検出方法に準じて実施した²⁾。すなわち, 浴槽水 500 mL を 0.2 μm の滅菌メンブランフィルター(ミリポア) で吸引ろ過し, ろ過後のフィルターを滅菌蒸留水 2.5 mL が入った遠沈管に入れ, 1 分間ボルテックスにて攪拌し, 200 倍濃縮試料とした。

(2) レジオネラ属菌の検出

培養法は, 酸処理法及び熱処理法を行った。酸処理法は, 濃縮液にレジオネラ検体用前処理液 (0.2M KCl-HCl pH2.2) (極東製薬工業) を等量加え, 5 分間反応の後, GVPC 寒天培地 (日水製薬), GVPC α 寒天培地 (日研生物) 各 1 枚ずつに 250 μL ずつ塗抹した。熱処理法は, 抽出液を 50℃, 30 分間加熱処理し, GVPC 寒天培地, GVPC α 寒天培地各 1 枚ずつに 125 μL ずつ塗抹した。いずれも 37℃, 5~7 日培養した後, レジオネラ様のコロニー数を計測し, 羊血液/BCYE α 寒天培地 (日研生物) に釣菌し, BCYE α 寒天培地にのみ生育したものをレジオネラ属菌と判定した。菌種の同定は, 免疫血清 (デンカ生研) での凝集反応により行った。

LAMP 法はアルカリ熱抽出法及び低速遠心+キレックス処理 (改良法) による DNA 抽出を用い, DNA 抽出以降の操作については, Loopamp レジオネラ検出試薬キット E (栄研化学) 付属の説明書に従い実施した。検出にはリアルタイム

濁度測定装置 LA-320C (栄研化学) を用いた。

結果

1. フミン酸及び鉄イオンの LAMP 法への影響

フミン酸及び鉄イオン濃度調製試料を用いてレジオネラ属菌添加実験を実施した。結果を表 1 及び表 2 に示す。フミン酸では, 低菌数と高菌数を添加したいずれの検体においてもフミン酸濃度 1.0 mg/L 以上で LAMP 法の結果が陰性となった。鉄イオンでは, 低菌数添加の溶液で鉄イオン濃度が 2.0 mg/L 以上, 高菌数添加の溶液では鉄イオン濃度が 20 mg/L 以上で LAMP 法の結果が陰性となった。

表 1 フミン酸による LAMP 法への影響

フミン酸濃度	レジオネラ添加菌数 (CFU/mL)	
	10 ¹	10 ³
0 mg/L	陽性	陽性
0.1 mg/L	陽性	陽性
1.0 mg/L	陰性	陰性
10 mg/L	陰性	陰性

表 2 鉄イオンによる LAMP 法への影響

鉄イオン濃度	レジオネラ添加菌数 (CFU/mL)	
	10 ¹	10 ³
0 mg/L	陽性	陽性
2.0 mg/L	陰性	陽性
20 mg/L	陰性	陰性
200 mg/L	陰性	陰性

2. 反応阻害を軽減する DNA 抽出法の検討

1.の結果を踏まえ, LAMP 法への反応阻害の影響を確認できたフミン酸及び鉄イオン添加試料を用いて, ①アルカリ熱抽出法 (現行法), ②カラム抽出法 (NucleoSpin Tissue XS), ③カラム抽出法 (NucleoSpin Tissue XS), ④キレックス処理, ⑤低速遠心+キレックス処理の 5 種類の DNA 抽出法の違いによる LAMP 法への影響を検討した結果を表 3 に示す。

表 3 DNA 抽出法の違いによる LAMP 法への影響

DNA 抽出法	フミン酸 (1.0mg/L)	鉄イオン (2.0mg/L)
①アルカリ熱抽出法 (現行法)	陰性	陰性
②カラム抽出法 (NucleoSpin Tissue XS)	陰性	陰性
③カラム抽出法 (QIAamp DNA Mini Kit)	陰性	陰性
④キレックス処理	陰性	陽性
⑤低速遠心+キレックス処理	陽性	陽性

フミン酸添加試料については, ⑤低速遠心+キレックス処理による DNA 抽出法でのみ LAMP 法の結果が陽性に転じた。

鉄イオン添加試料については、④キレックス処理及び⑤低速遠心+キレックス処理の2種類でLAMP法の結果が陽性に転じた。

3. 実検体を用いた改良法の検証

1) 反応阻害軽減の検証

平成28年度に反応阻害が考えられた事例の温泉水7検体について、DNA抽出法の違いによるLAMP法への影響を培養法の結果と併せて表4に示す。改良法では7検体中4検体でLAMP法の結果が陽性に転じた。改良法でなお陰性の3検体は、培養法で10~20 CFU/100 mLであり、低菌数の検体であった。

表4 反応阻害が考えられた検体のDNA抽出法の違いによるLAMP法への影響

	培養法結果 (CFU/100 mL)	血清型	LAMP法結果	
			アルカリ熱抽出法 (現行法)	低速遠心+ キレックス処理 (改良法)
No.1	10	L.p 1	陰性	陰性
No.2	20	L.p 1	陰性	陰性
No.3	20	L.p 1	陰性	陰性
No.4	30	L.p 1	陰性	陽性
No.5	30	L.p 1	陰性	陽性
No.6	40	L.p 1	陰性	陽性
No.7	130	<i>Legionella</i> spp.	陰性	陽性

L.p: *Legionella pneumophila*

2) 検出感度の評価

平成29年度に行政検査で搬入された浴槽水検体9検体について、DNA抽出法の違いによるLAMP法への影響を培養法の結果と併せて表5に示す。

表5 行政検査におけるDNA抽出法の違いによるLAMP法への影響

	培養法結果 (CFU/100 mL)	血清型	LAMP法結果	
			アルカリ熱抽出法 (現行法)	低速遠心+ キレックス処理 (改良法)
No.1	<10	L.p 1, 6	陽性	陰性
No.2	<10	L.p 1, 9, 10	陽性	陽性
No.3	<10	L.p 6, 10	陽性	陽性
No.4	70	L.p 1, 6, 10	陽性	陽性
No.5	1,200	L.p 10, 15	陽性	陽性
No.6	1,500	L.p 6, 10	陽性	陽性
No.7	13,000	L.p 1, 6	陽性	陽性
No.8	15,000	L.p 3, 15	陽性	陽性
No.9	78,000	L.p UT <i>Legionella</i> spp.	陽性	陽性

L.p: *Legionella pneumophila*

改良法では、9検体中8検体が現行法と同様にLAMP法陽性となった。改良法において陰性の1検体については、培養法の結果が10

CFU/100 mL未満であった。培養法陽性でLAMP法陰性の検体は無かった。

考 察

今回の検討で、LAMP法におけるDNA抽出法を低速遠心+キレックス処理(改良法)に変更することで、温泉水中で阻害要因となるフミン酸及び鉄イオンの反応阻害の影響を軽減することができることがわかった。フミン酸はアルカリ溶液中で溶解するため、アルカリ溶液を添加しないキレックス処理に、さらに遠心分離で沈殿物を除く工程を加えることで反応阻害を軽減できたと考えられた。鉄イオンについては、キレックス樹脂が金属イオンを選択的に吸着するため³⁾、鉄イオンを除去することで影響を軽減できたと考えられる。実検体を用いた検証では、現行法で検出できなかった検体について、改良法への変更により低菌数の検体を除いて検出可能となった。改良法で陰性であった10~20 CFU/100 mLの3検体については、LAMP法の検出下限値はおおよそ6~60 CFU/100 mLであるとされており⁴⁾、検出下限値付近であるため陰性となったことも考えられる。一方、手法の変更により、検出感度の低下が懸念されたが、改良法は現行法と同程度の感度を維持しながら反応阻害を軽減することができた。また、改良法は操作が簡便で、DNA抽出にかかる時間も短く、コスト的にも優れており、反応阻害が懸念される温泉水の検査時に非常に有用である。今後は、更なる実検体でのデータ集積と解析のため、温泉水について、現行法と併用しながら、検査対応に活用していきたい。

文 献

- 1) Watson RJ, Blackwell B: *Can J. Microbiol*, 46, 633-642 (2000)
- 2) 財団法人ビル管理教育センター: 新版レジオネラ症防止指針(2000)
- 3) Walsh P.S, Metzger D.A, Higuchi R: *Bio Techniques*, 10, 506-513 (1991)
- 4) 安中敏光, 吉野学, 百田隆祥, 他: 日本臨床微生物学雑誌, 13, 19-25 (2003)

奈良県におけるノロウイルス胃腸炎集団発生について -2016/2017 シーズン-

藤谷美沙子・尾西美咲・千葉翔子・稲田真知・中野 守・榮井 毅

Outbreaks of Gastroenteritis Caused by Norovirus in Nara Prefecture : 2016/2017 Season

Misako FUJITANI・Misaki ONISHI・Shoko CHIBA・Machi INADA・Mamoru NAKANO
and Takeshi SAKAI

緒言

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

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

当センターでは奈良県 (奈良市を除く.) における NV の流行状況を詳細に把握するため, 散発事例, 食中毒および集団感染事例を対象とし, NV の遺伝子学的, 疫学的解析を継続的に実施している¹⁾. 今回, 2016/2017 シーズンに発生した事例について解析を実施したので報告する.

方法

1. 調査対象事例

2016年9月から2017年8月の間に当センターにお

いて県外自治体からの調査依頼事例を除く食中毒 (有症苦情を含む) 事例および集団感染事例 (疑い事例を含む) で検査を実施した 29 事例のうち NV を検出した 24 事例を調査対象事例とした.

2. ウイルス RNA 抽出および NV 遺伝子解析

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

結果

1. NV による食中毒・集団感染事例の発生状況

食中毒・集団感染事例の検体採取月別発生状況は, 2016年10月3事例, 11月14事例, 12月4事例, 2017年3月1事例, 6月1事例, 7月1事例であった

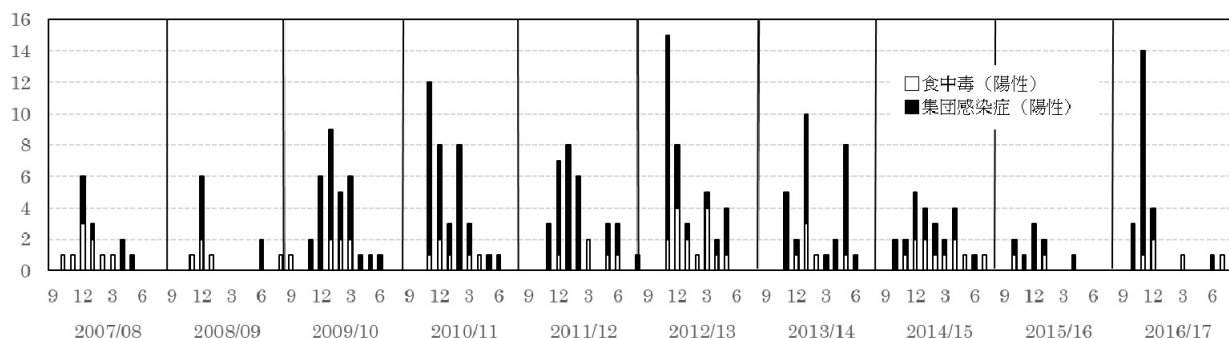


図1 ノロウイルスによる食中毒・集団感染事例数 (当センター検出事例)

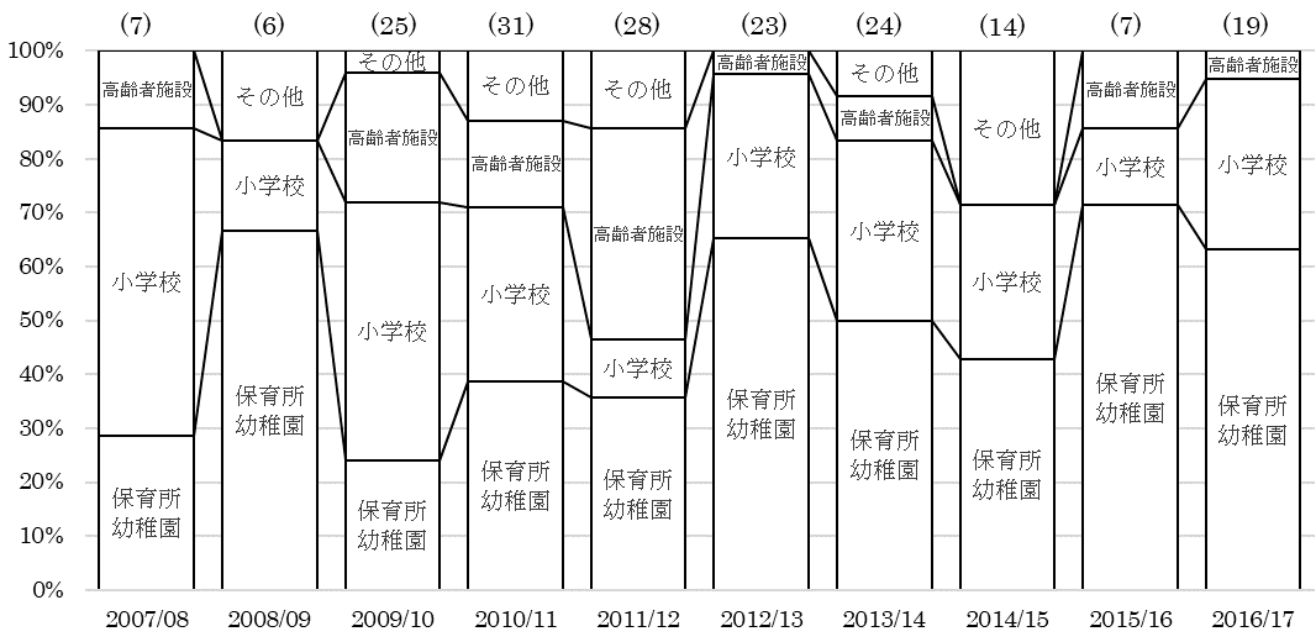


図2 ノロウイルスによる集団感染症事例の発生施設別内訳
 図上段 () 内の数字は事例数を示す

(図1). 食中毒事例は5事例発生したが、昨年に続き少なかった。集団感染事例は、10月中旬から12月初旬にかけて短期間に集中し、19事例発生した。

集団感染事例を発生施設別に区分すると、保育園・幼稚園12事例(63%)、小学校6事例(32%)、高齢者施設1事例(5%)であった(図2)。

2. 遺伝子型解析結果

2016/2017シーズンに検出したNVの遺伝子型を表1に示した。24事例の内訳は、GII単独によるものが23事例(96%)、GIとGIIの両方を検出した事例が1事例(4%)あり、これまでの状況と同様にGIIによる事例が多かった。

ダイレクトシーケンスを行った結果、24例のうちGII.2単独によるものが21事例(88%)で最も検出数が多かった。その他には、GII.4によるものが2事例(8%)、GI.6とGII.2を検出した事例が1事例(4%)あった。最も検出数の多かったGII.2について系統樹解析を行った結果、大きく分けて3つの異なるクラスターに分類された(図3)。またGII.4は、系統樹解析の結果、2事例とも同一のクラスターに分類され、Sydney/NSW0514/2012/AUに近い株であった(図4)。2014/2015シーズンから検出のあったGII.17の検出は1例もなかった。

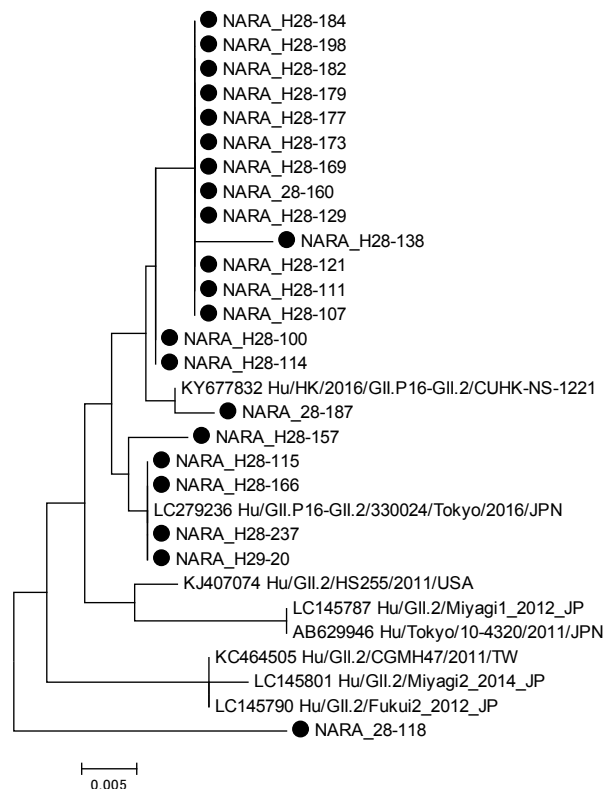


図3 GII.2株のキャプシド領域の塩基配列を用いた系統樹

考察

2016/2017シーズンの奈良県内におけるNVによる食中毒・集団感染症事例について調査した。今シーズンは、GII.2が保育園・幼稚園を中心に流行し、集団

表1 ノロウイルスによる食中毒・集団感染事例数（当センター検出事例数）

	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	遺伝子型別合計
GI.6							1						1
GII.2		3	14	3			1			1			22
GII.4				1							1		2
事例数合計		3	14	4			1			1	1		

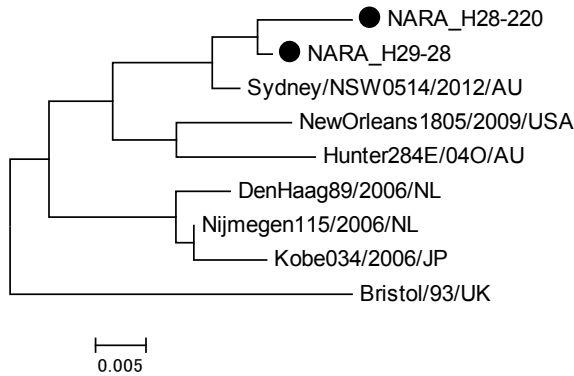


図4 GII.4株のキャプシド領域の塩基配列を用いた系統樹

- 2) 医薬食品安全部監視安全課長通知「ノロウイルスの検出法について」, 食安監発第 1105001 号(平成15年11月5日)
- 3) 稲田真知, 藤谷美沙子, 尾西美咲, 他: 病原微生物検出情報, 39, 11-12(2018)

感染事例が増加した。食中毒事例は昨シーズンに続き少なく、大規模事例もなかった。

2016/2017シーズンは、検出遺伝子型の9割をGII.2が占めたことが特徴的であった。GII.2は、10月中旬から12月中旬まで検出が続き、その後急速に減少した。急速な減少の理由の一つは、11月に感染性胃腸炎の警報発令に伴い、十分な注意喚起を行った結果であると考えられる。また系統樹解析の結果、検出した株は複数のクラスターに分類されたことから、突発的なGII.2の流行は、単一の株によるものではなく複数の株が同時に流行している可能性が高いと考えられた。その後のGII.2の詳細な解析については文献3を参照されたい。

主流遺伝子型であるGII.4は2事例から検出され、いずれも2012年に流行したSydney/NSW0514/2012/AUに近い株であった。2006年に流行したNijmegen115/2006/NLの近縁株は、昨シーズンに続き検出はなく、県内で流行しているGII.4はSydney/NSW0514/2012/AUの近縁株にシフトした可能性がある。

本報告が示すように長期にわたって調査を継続し、様々な疫学情報を蓄積することは、NVの長期的な発生動向を把握するために必要であると考えている。

文 献

- 1) 藤谷美沙子, 杉本大地, 千葉翔子, 他: 奈良県保健研究センター年報, 51, 51-63 (2016)

感染症発生動向調査による患者発生状況：平成29年（2017年）

藤谷美沙子・稲田眞知・尾西美咲・千葉翔子・中野 守・榮井 毅

Status of Infection Diseases in Nara Prefecture, 2017

Misako FUJITANI・Machi INADA・Misaki ONISHI・Shoko CHIBA・Mamoru NAKANO
and Takeshi SAKAI

緒言

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

今回、本県の平成29年の患者発生状況についてとりまとめたので報告する。

方法

全数把握対象疾患は、診断した全ての医師が保健所に届出を行い、発生状況を把握している。また、定点把握対象疾患は、知事が指定した定点医療機関（のべ115医療機関）を受診した患者数を把握することで流行状況を調査している。

平成29年に届出された全数把握対象疾患及び報告された定点把握対象疾患について、感染症サーベイランスシステム（NESID）より情報を収集・解析した。

結果

1. 全数把握対象疾患の発生状況

平成29年の全数把握対象疾患の患者届出は延べ478件であった（表1）。なお、現時点（平成30年4月時点）では速報値であり、後日変更されることがある。

1) 一類感染症

届出はなかった。

表1 平成29年 全数把握対象疾患 届出数

類別	疾患名	届出数
二類	結核	285
三類	腸管出血性大腸菌感染症	21
四類	E型肝炎	1
	A型肝炎	1
	つつがむし病	1
	デング熱	4
	レジオネラ症	18
五類	アメーバ赤痢	9
	ウイルス性肝炎	1
	カルバペネム耐性腸内細菌感染症	27
	急性脳炎	5
	クロイツフェルト・ヤコブ病	3
	劇症型溶血性レンサ球菌感染症	10
	後天性免疫不全症候群	7
	ジアルジア症	1
	侵襲性インフルエンザ菌感染症	3
	侵襲性肺炎球菌感染症	40
	水痘（入院例）	5
	梅毒	29
	播種性クリプトコックス症	2
	破傷風	2
	風しん	2
	麻疹	1

診断日による集計

2) 二類感染症

結核は285例の届出があり、昨年266例から増加した。類型は、患者172例、疑似症患者3例、無症状病原体保有者110例であった。患者の病型は、肺結核が121例、その他の結核（結核性胸膜炎、リンパ節結核、粟粒結核等）が36例、肺結核及びその他の結核が15例であった。全届出の年齢階層は、0歳6例、1～10歳未満6例、10代2例、20代13例、30代13例、40代19例、50代32例、60代41例、70代56例、80代72例、90代25例で、80代の届出が最も多く、70歳以上が全体の54%を占めていた。

3) 三類感染症

腸管出血性大腸菌感染症 21 例の届出があった。類型は、患者 13 例、無症状病原体保有者が 8 例で、その年齢階層は、10 歳未満が 6 例、10 代が 1 例、20 代 5 例、30 代 4 例、40 代 2 例、50 代 3 例であった。血清型・検出病原体は、O157 が 11 例 (VT1&VT2 が 8 例、VT2 が 3 例)、O26 が 7 例 (VT1 が 6 例、VT2 が 1 例)、O111 が 1 例 (VT1 が 1 例)、O145 が 1 例 (VT2 が 1 例)、O 型別不能が 1 例 (VT2) であった。推定感染経路は、経口感染が 10 例、接触感染 4 例、不明が 7 例であった。経口感染が推定されている事例には、バーベキューや牡蠣・ホルモン、生センマイを喫食した記載のある事例が含まれていた。接触感染が推定されているものは、いずれも家族内感染が疑われる事例であった。

4) 四類感染症

E 型肝炎 1 例、A 型肝炎 1 例、つつが虫病 1 例、デング熱 4 例、レジオネラ症 18 例の届出があった。

E 型肝炎は 70 代男性から 1 例の届出があり、感染経路等は不明とされている。

A 型肝炎は、20 代男性からの届出が 1 例あった。生ホタテ、鶏の肝の摂食が推定感染経路とされている。

つつが虫病は 70 代男性で、ダニによる刺し口が確認されており、IgM 抗体も検出されている届出であった。

デング熱は、4 例届出があり全て海外感染事例であった。患者の病型は 4 例ともデング熱型で、感染地域は、インドネシアバリ島が 1 例、フィリピン サンパレス州スービック近郊が 1 例、インド ニューデリーが 1 例、マレーシアまたはラオスが 1 例あった。ウイルス遺伝子検査が実施されたバリ島の患者から 1 型、マレーシアまたはラオスの患者から 2 型が検出されている。

レジオネラ症 18 例の病型は肺炎型 17 例、無症状病原体保有者 1 例であった。無症状病原体保有者は、マイコプラズマ性肺炎により入院する際の尿検査でレジオネラを検出した。性別は男性が 16 例 (40 代 1 例、50 代 5 例、60 代 3 例、70 代 4 例、80 代 1 例、90 代 2 例)、女性が 2 例 (70 代 1 例、80 代 1 例) であった。推定感染経路は水系感染が 5 例、不明が 13 例となっている。

5) 五類感染症

アメーバ赤痢 9 例、ウイルス性肝炎 1 例、カルバペネム耐性腸内細菌科細菌感染症 27 例、急性脳炎 5 例、クロイツフェルト・ヤコブ病 3 例、劇症型溶血性レンサ球菌感染症 10 例、後天性免疫不全症候群 7 例、ジ

アルジア症 1 例、侵襲性インフルエンザ菌感染症 3 例、侵襲性肺炎球菌感染症 40 例、水痘 (入院例) 5 例、梅毒 29 例、播種性クリプトコックス症 2 例、破傷風 2 例、風しん 2 例、麻しん 1 例の届出があった。

アメーバ赤痢の病型は、腸管アメーバ症 8 例、腸管外アメーバ症 1 例であった。患者は、9 例すべて男性 (40 代 2 例、50 代 2 例、60 代 4 例、70 代 1 例) で、推定感染経路は性的接触 (同性間) 1 例、経口感染 2 例、不明 6 例で、推定感染地域は、奈良県 1 例、県外 (都道府県不明含む) 6 例、国外 (シンガポールまたはマレーシア、タイまたはマレーシア) 2 例であった。

70 代からの届出は、平成 26 年にアメーバ性肝腫瘍での入院歴があり、健康保菌者であったと考えるとの記載があった。シンガポールまたはマレーシアが推定感染地域とされる事例は、他にも平成 28 年にカンボジア、インド、フィリピンへの渡航歴も記載されていた。

ウイルス性肝炎 1 例は 70 代女性で、病型は B 型であり、B 型肝炎ワクチンの接種歴はなかった。推定感染経路は不明であった。

カルバペネム耐性腸内細菌科細菌感染症は、男性 18 例 (50 代 6 例、60 代 1 例、70 代 5 例、80 代 4 例、90 代 2 例)、女性 9 例 (70 代 2 例、80 代 3 例、90 代 4 例) であり、80 代女性のうち 1 例は感染死亡者が含まれている。病原体検出部位・菌種としては、血液 5 例 (*Enterobacter aerogenes* 2 例、*Klebsiella pneumoniae* 1 例、*E. coli* 1 例、大腸菌 1 例)、尿 8 例 (*E. coli* 4 例、*Enterobacter aerogenes* 1 例、*Klebsiella pneumoniae* 1 例、*Raoultella ornithinolytica* 1 例、大腸菌 1 例)、血液・尿 2 例 (*Serratia marcescens* 1 例、*Enterobacter cloacae* 1 例)、胆汁 1 例 (*Citrobacter braakii* 1 例)、PTGBD カテーテル先端 1 例 (腸球菌 クレブシエラ 1 例)、喀痰 2 例 (*Klebsiella pneumoniae* 1 例、*E. coli* 1 例)、膿 4 例 (*Enterobacter aerogenes* 4 例)、咽頭ぬぐい液 1 例 (*Klebsiella pneumoniae* 1 例)、胆汁・創部ドレーン 1 例 (*E. coli* 1 例)、喀痰・尿 1 例 (不明 1 例)、検出部位不明 1 例 (*Escherichia coli* 1 例) 推定感染経路は以前からの保菌が 16 例、中心静脈カテーテルからが 1 例、尿路カテーテルからが 2 例、PTGBD カテーテルからが 1 例、手術部位 (手術手技) が 2 例、移植後免疫不全 1 例、耐性獲得 1 例、不明 3 例であった。

急性脳炎は、1 月に 6 歳男児、2 月に 2 歳女児、4 月に 0 歳男児、5 月に 77 歳女性、12 月に 1 歳女児の計 5 例の届出があった。原因病原体は、6 歳男児がインフルエンザ A、2 歳女児は不明とされている。また 0 歳男児はヘルペスウイルス 6 型であり、77 歳女性は

ヘルペスウイルスの潜伏感染によるウイルスの再活性化が原因と推定されている。1歳女児は感染死亡者とされており、インフルエンザ AH1pdm が検出され、家族内感染したとされている。

クロイツフェルト・ヤコブ病は、1月に60代男性、5月に70代男性1例ずつ、8月に80代男性の届出があった。3例とも病型は、古典型クロイツフェルト・ヤコブ病(CJD)であり、すべての事例で進行性認知症、ミオクローヌスを呈していた。

劇症型溶血性レンサ球菌感染症は、昨年より倍増し10例の届出があり、過去10年の中で最も多い届出数であった。1月届出の60代男性の血清群はA群で発病7日後に死亡、2月の届出は50代男性と60代男性が1例ずつで60代男性は発病日に死亡、いずれも血清群は不明である。3月の届出は80代男性で血清群はB群、4月の届出は80代男性で血清群はG群であり、発病9日後に死亡、5月は40代男性で血清群は不明で発病1日後に死亡、6月の届出は80代女性で血清群はG群であった。8月の届出は70代女性で血清群はG群、12月の届出は70代男女一例ずつで、血清群は男性がG群、女性はB群であった。4例の死亡例の推定感染経路は、いずれも不明であった。またすべての事例がショック症状を呈していた。

後天性免疫不全症候群の届出は7例あった。3月の届出は23歳男性で、病型は無症状病原体保有者、5月には2例の届出があり38歳と43歳男性で43歳男性の病型はAIDSであった。6月の届出は31歳女性で病型は無症状病原体保有者、7月の届出は26歳男性で病型は無症状病原体保有者、8月の届出は37歳男性で病型はAIDS、9月の届出は43歳女性で病型はAIDSであった。AIDSと診断した指標疾患はクリプトコッカス症（肺以外）1例、ニューモシスチス肺炎2例であった。推定感染経路は、性行為感染（同性間性的接触）が2例、性行為感染（異性間性的接触）3例、不明2例であった。

ジアルジア症1例は80代男性で、推定感染経路は経口感染とされているが詳しい記載はなかった。

侵襲性インフルエンザ菌感染症は、2月に70代男性、5月に0歳男児、7月40代女性の計3例の届出があった。3例いずれも推定感染経路は不明であり、70代男性はヒブワクチンの接種歴無し、40代女性は不明、0歳男児は一回の接種歴はあるが、接種年月日は不明と記載されていた。

侵襲性肺炎球菌感染症の届出は40例あり、報告が開始された平成25年4月以降最多であった。男性22例、女性18例で、0歳児1例、1歳児4例、3歳児1

例、4歳児2例、20代1例、30代1例、40代2例、50代4例、60代3例、70代10例、80代6例、90代5例であった。60代3例の内1例は発病2日後に死亡している。小児8例は、いずれも肺炎は呈していないが、内5例は菌血症を呈していた。また7例にワクチン接種歴の記載があった。成人のワクチン接種歴のあるものは2例であった。

水痘（入院例に限る）5例の病型は全て検査診断例であった。0歳男児1例、30代男性2例、40代男性1例、50代女性1例であった。ワクチン接種歴を確認できている症例はなかった。推定感染経路は、家族内感染が疑われる事例が2例、不明が3例であった。

梅毒は平成26年より届出数の増加が続いていたが、昨年よりやや減少し、29例の届出であった。男性20例、女性9例、年齢層は、男性は20代7例、30代3例、40代6例、50代2例、60代1例、70代1例で、女性が10代1例、20代6例、40代1例、60代1例であった。患者の病型は、早期顕症梅毒24例（I期：男性7例、女性2例、II期：男性10例、女性5例）、無症候（無症状病原体保有者）5例（男性3例、女性2例）であった。感染経路は性的接触が27例（同性間3例、異性間18例、不明6例）、不明2例であり、同性間は男性のみであった。推定感染地は、奈良県16例、奈良県以外（都道府県不明を含む）10例、国外（フランス）1例、不明2例であった。なお、28歳女性の推定感染経路は、性的接触とともに刺青の針等の鋭利なものの刺入による感染も記載されていた。

播種性クリプトコックス症は、平成28年に初めて届出があり、平成29年も2例の届出があった。届出は67歳の男性と52歳女性で、52歳女性は副腎性Cushing（副腎性クッシング症候群）疑いと記載されていた。

破傷風2例は、80代男性と60代男性1名ずつであった。2例とも臨床決定（症状及び受傷歴等）であり、開口障害があり、推定感染経路は創傷感染とされている。

風しん2例はいずれも50代男性であった。1例は臨床診断、もう1例は検査診断例であった。ワクチン接種歴は無または不明であり、推定感染経路は奈良県とフィリピンであった。

麻疹1例は、19歳男性でワクチン接種歴がなかった。推定感染地域は、マレーシアのクアランプールとされている。症状は発疹を呈していたが、コプリック斑の記載はなかった。遺伝子型はD8を検出している。

2. 定点把握対象疾患の流行状況

県内の定点医療機関数を表2に示す。

表2 患者定点医療機関数

地区	北部		中部		南部		合計
	奈良市	郡山	中和(東)	中和(西)	内吉野	吉野	
インフルエンザ定点	14(5)	14(1)	11(3)	10(3)	2	3(1)	54(13)
小児科定点	9(4)	9(1)	7(2)	6(3)	1	2(1)	34(11)
眼科定点	3	3	2(1)	2	-	1	10(1)
基幹定点	1(1)	2(1)	1(1)	1(1)	-	1(1)	6(6)
性感染症定点	3	3	2	3	-	-	11

()内は、病原体定点数

1) 週単位報告対象疾患（週報）

週報告対象の19疾患について、週別患者報告数を表3に示す。突発性発しんの定点当たり報告数及び県の出生率（人口千対：2016年）を基に小児科定点把握対象疾患に限り定点当たり報告数を修正し比較すると、全国レベルよりも多いもの、少ないもの、全国並のものに分けられた。全国より多かった疾患は、RSウイルス感染症、水痘であった。平成29年の年間定点当たり報告数で、上位5疾患の①インフルエンザ、②感染性胃腸炎、③A群溶血性レンサ球菌咽頭炎、④手足口病、⑤RSウイルス感染症について、以下に発生状況を述べる。

(1) インフルエンザ

1年を通して、全国より少なかった。平成29年の初めは第5週まで報告数は増加し、その後減少した。第48週に流行の目安となる1を超え、第52週に全国より1週遅れて注意報開始基準値の10を超えた(図1)。

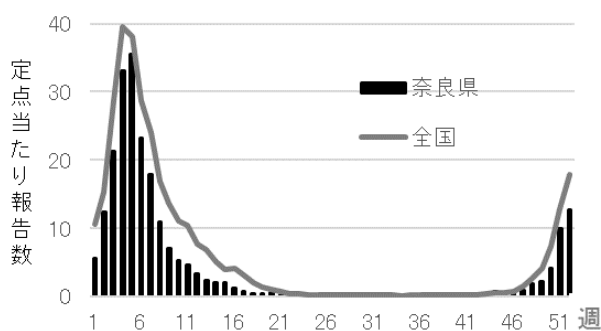


図1 インフルエンザ

(2) 感染性胃腸炎

警報を発令した平成28年とは異なり、大きな流行はみられず、最も報告の多かった第24週でも定点当たり報告数は8.97に留まった。また過去10年間の奈良県の定点当たり報告数と比較して、最も少なかった(図2)。

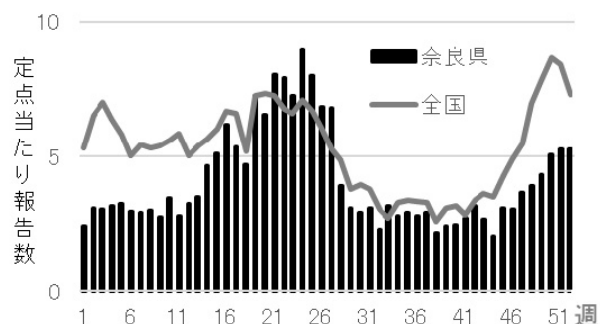


図2 感染性胃腸炎

(3) A群溶血性レンサ球菌咽頭炎

全国と同様の推移であった(図3)。

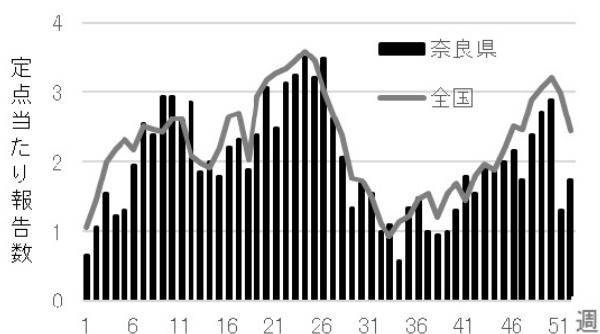


図3 A群溶血性レンサ球菌咽頭炎

(4) 手足口病

第27週に定点当たり報告数が警報開始基準値の5を超え、第35週まで警報が続いた。流行状況は、全国とほぼ同様であった(図4)。

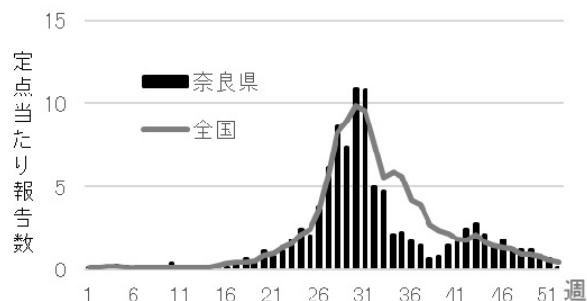


図4 手足口病

表3 平成28年 週単位報告対象疾患 報告数

定 点	疾患名\週	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29																												
		299	28	5	22	36	86	102	93	117	95	110	119	158	174	210	182	159	246	223	273	269	246	305	272	233	231	133	105	
小児科	インフルエンザ	299	28	5	22	36	86	102	93	117	95	110	119	158	174	210	182	159	246	223	273	269	246	305	272	233	231	133	105	
	RSウイルス感染症	28	5	22	36	86	102	93	117	95	110	119	158	174	210	182	159	246	223	273	269	246	305	272	233	231	133	105		
	咽頭結膜炎	5	7	17	8	20	17	12	17	18	5	16	19	30	23	31	50	32	52	48	54	52	57	49	51	42	30	16	17	
	A群溶連菌咽頭炎	22	36	52	41	44	66	86	81	100	100	88	97	63	68	61	75	79	64	81	104	84	106	110	119	109	118	89	70	45
	感染性胃腸炎	82	105	103	108	110	101	99	102	93	117	95	110	119	158	174	210	182	159	246	223	273	269	246	305	272	233	231	133	105
	水痘	12	11	7	6	6	7	1	7	7	11	4	5	8	13	9	6	14	7	19	25	12	22	21	19	20	10	19	9	8
	手足口病	4	3	6	8	7	5	4	5	3	13	4	5	3	0	1	5	12	23	16	38	26	38	59	83	68	130	208	293	252
	伝染性紅斑	0	1	2	2	0	3	1	2	2	3	2	1	2	2	4	0	5	1	1	3	1	4	1	6	6	3	3	3	3
	突発性発しん	9	15	19	15	12	13	14	13	11	16	18	9	17	12	12	22	21	21	19	29	20	19	18	15	22	16	17	12	9
	百日咳	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	ヘルパンギーナ	0	1	1	1	0	1	3	0	0	0	0	2	1	0	5	1	1	3	2	10	9	6	9	14	9	41	43	54	41
	流行性耳下腺炎	37	37	39	23	48	22	24	23	26	32	35	30	20	28	20	22	14	24	11	28	20	13	24	22	24	10	16	7	7
急性出血性結膜炎	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
流行性角結膜炎	4	11	12	2	2	1	3	0	5	6	2	3	6	6	4	2	3	3	9	11	11	7	8	6	9	9	8	3	8	
細菌性髄膜炎	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	3	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	
無菌性髄膜炎	0	2	2	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	2	2	3	0	0	0	1	1	2	0	0	
マイコプラズマ肺炎	4	4	4	5	1	4	3	4	5	4	9	1	2	6	1	4	5	1	6	2	3	1	0	3	0	3	1	0	0	
クラミジア肺炎	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
感染性胃腸炎(ロカイルズ)	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	3	2	8	10	6	3	2	5	3	3	0	1	0	1	0	0	0	0	

定 点	疾患名\週	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29																												(全国) (修正・県定相当*)	
		30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	合計	(県) 定相当	(全国) 定相当				
小児科	インフルエンザ	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	合計	(県) 定相当	(全国) 定相当				
	RSウイルス感染症	30	38	31	70	42	97	88	124	99	84	92	61	63	47	86	68	76	73	109	122	76	63	688	12092	223.93	326.02				
	咽頭結膜炎	20	23	15	12	11	21	17	20	15	12	7	12	12	15	15	15	16	15	9	10	22	25	8	16	1150	33.82	29.21			
	A群溶連菌咽頭炎	57	34	37	19	45	50	34	32	34	44	61	52	66	63	68	73	59	81	92	98	44	59	3512	103.29	116.31	87.07				
	感染性胃腸炎	99	105	79	107	96	99	100	74	82	84	92	107	91	69	105	103	125	133	147	172	179	180	7287	214.32	275.94	180.66				
	水痘	13	9	11	8	20	5	16	10	27	13	14	16	14	12	48	18	34	31	32	29	37	30	20	792	23.29	19.04	19.63			
	手足口病	370	368	168	159	72	76	57	48	22	28	48	60	82	93	71	47	60	42	39	41	29	22	5	3329	97.91	113.68	82.53			
	伝染性紅斑	2	2	2	1	1	1	4	2	1	3	1	3	4	2	3	2	2	2	2	2	2	0	3	111	3.26	3.94	2.75			
	突発性発しん	17	12	15	16	23	20	21	20	13	18	22	13	17	17	18	13	16	11	18	19	11	15	10	840	24.71	23.21	20.83			
	百日咳	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	11	0.32	0.53	0.27		
	ヘルパンギーナ	51	48	22	45	24	23	29	25	17	14	13	9	23	16	11	8	11	12	7	8	5	9	3	691	20.32	27.26	17.13			
	流行性耳下腺炎	12	9	5	16	5	11	5	8	4	4	4	6	7	8	9	5	3	4	3	1	3	1	3	822	24.18	24.67	20.38			
急性出血性結膜炎	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0.2	0.64					
流行性角結膜炎	2	2	4	6	6	8	7	5	8	7	8	5	6	8	8	8	6	5	1	5	2	4	4	2	283	28.3	38.48				
細菌性髄膜炎	0	0	1	1	1	1	0	0	3	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	19	3.17	1.09				
無菌性髄膜炎	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	28	4.67	2				
マイコプラズマ肺炎	2	3	3	0	4	2	1	0	2	2	1	2	3	0	7	2	1	2	0	1	0	1	3	128	21.33	17.5					
クラミジア肺炎	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.17	0.56				
感染性胃腸炎(ロカイルズ)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	2	55	9.17	10.42				

※インフルエンザ A群溶連菌咽頭炎は A群溶連菌咽頭炎と表示している
 *人口千対出生数からみた新生児数の全国との比較：全国 7.8、奈良県 7.0 (ともに2016年値)、突発性発しんからみた捕捉割合を 23.21/24.71として、本県の定相当たり報告数に、(23.21/24.71×7.0/7.8) を乗じて計上してみた。

(5) RS ウイルス感染症

第30週頃より増加が始まり、第37週にピークを迎えた。その後、全国同様に減少するように思われたが、再度報告数は増加し、第50週には第37週と同程度の2度目のピークがみられた(図5)。

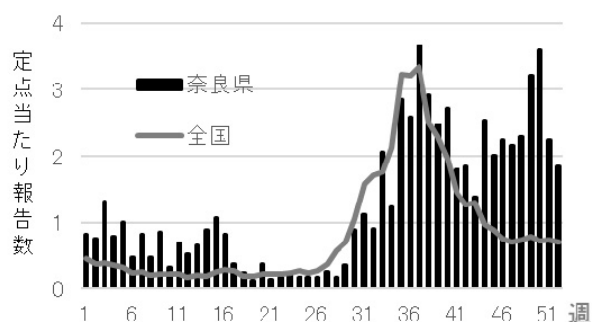


図5 RS ウイルス感染症

した。また蜂蜜を原因とした乳児ボツリヌス症の死亡事例もあった。いずれも稀な事例ではあるが、情報提供および注意喚起に努めた。

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

謝 辞

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

2) 月単位報告対象疾患(月報)

月報対象の性感染症4疾患及び薬剤耐性菌感染症3疾患について月別の報告数を表4に示す。

性感染症は、4疾患とも昨年からはほぼ横ばいで、15歳未満からの報告はなかった。薬剤耐性菌感染症3疾患とも70歳以上が最も多かった。

考 察

平成29年は、マレーシアに滞在していた患者から麻しんウイルスを検出した。ヨーロッパで麻しん患者が増加していたこともあり、海外渡航者への注意喚起を繰り返し実施した。

県外では、体調不良のネコから咬傷歴のあるヒトが重症熱性血小板減少症候群(SFTS)を発症し、死亡

表4 平成29年 月単位報告対象疾患 報告数

		1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	総数	
性 感 染 症	性器クラミジア感染症	男 女	5 9	5 3	6 2	6 4	4 3	8 8	6 6	7 4	7 6	8 4	5 12	11 6	78 67
	性器ヘルペスウイルス感染症	男 女				1 6	2 7		1 3	1 4	1 3	1 4	1 3	2 6	10 40
尖 圭 コ ン ジ ロ ー マ		男 女	1 5	2 5	3 2	4 4	1 1	1 3	4 4	2 2	2 1	3 3	2 1	5 2	30 33
	淋菌感染症	男 女	6 6	3 3	7 2	4 1	1 1	1 1	4 1	2 2	2 1	7 2	2 1	5 7	44 7
薬 剤 耐 性 菌	メチシリン耐性黄色ブドウ球菌感染症	男 女	27 13	13 12	21 15	25 16	20 12	24 16	20 11	27 12	22 18	35 12	22 17	25 23	281 177
	ペニシリン耐性肺炎球菌感染症	男 女	5 5	1 1	3 1	4 3	3 4	2 2	3 2	2 1	2 1		1 2	4 3	30 19
	薬剤耐性緑膿菌感染症	男 女		1 1			1 1					1 1		3 1	

第3章 調査研究・報告

第2節 資 料

UPLC-MS/MS による下痢性貝毒の分析法の検討

村上友規・仲井菜都希・安藤尚子・堀 重俊

Determination of Diarrhetic Shellfish Poisoning Toxins by Ultra High Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry : Single-Laboratory Validation.

Yuki MURAKAMI・Natsuki NAKAI・Naoko ANDO and Shigetoshi HORI

緒言

下痢性貝毒であるオカダ酸(以下 OA)及びジノフィシトキシシン 1(以下 DTX1)は、プランクトンの一種である有毒渦鞭毛藻等が産生する毒素である。有毒渦鞭毛藻等を摂食するなどして毒化した二枚貝を人が喫食する事で食中毒が発生する。これまで、下痢性貝毒の検査にはマウス試験法が用いられてきたが、国際的に機器分析への移行を推進している状況にあり、平成 27 年 3 月 6 日の厚生労働省通知により高速液体クロマトグラフ質量分析計を用いた機器分析法が示され、オカダ酸群に対して 0.16 mgOA 当量/kg の規制値が定められた。また、通知によると下痢性貝毒の検査を行うには各機関での妥当性確認を実施することが求められている。そこで、UPLC-MS/MS を用いて、当センターにおける下痢性貝毒検査法を検討し、ホタテガイを用いて妥当性確認を実施したので報告する。

調査方法

1. 試料

ホタテガイ 200 g 以上を細切後、ホモジナイザーで均質化し、2 g ごとにポリプロピレン製遠沈管に小分けして -20°C で保存した。試験毎に小分けしたサンプルを自然解凍して用いた。

2. 試薬

OA は和光純薬工業(株)製生化学用を、DTX1 は国立研究開発法人 産業技術総合研究所が製造した認証標準物質を使用した。OA 及び DTX1 の標準品をメタノールで溶解し、それぞれ 1000 ng/mL 及び 200 ng/mL の標準原液を調製した。アセトニトリルは和光純薬工業(株)製 LC/MS 用を、その他の試薬は和光純薬工業(株)製試薬特級を使用した。

3. 装置および測定条件

装置 : ACQUITY UPLC H-Class Xevo TQ-S micro
カラム : ACQUITY UPLC BEH C18

(粒径 1.7 μm , 2.1 \times 100 mm)

移動相 :

A : 0.1%ギ酸 10 mM ギ酸アンモニウム

B : アセトニトリル

グラジエント条件 :

B : 0~1 min (30%), 1~8 min (30%→90%), 8~11 min (90%), 11~15 min (30%)

流速 : 0.2 mL/min, 注入量 : 5 μL

イオン化モード : ESI(-), イオン源温度 : 150°C ,
脱溶媒ガス温度および流量 : N_2 , 400°C , 1000 L/h,
OA 及び DTX1 の MS/MS 条件は表 1 に記載

表 1 MS/MS 条件

Analyst	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Cone(V)	Collision(eV)
OA	803.5	113 (定性)	10	70
	803.5	255 (定量)	10	55
DTX1	817.5	113 (定性)	40	65
	817.5	255 (定量)	40	45

4. 試験溶液の調製

試料 2 g をポリプロピレン製遠沈管(50 mL 用)に採取し、メタノール 8 mL 加えてポリトロンでホモジナイズした。遠心分離(3000 rpm, 5 min)後、上清のみを共栓付き試験管に採取した。ポリプロピレン製遠沈管内の残留物に 90%メタノールを 8 mL 加え、振とう器で 5 分間振とうし、遠心分離(3000 rpm, 5 min)後、上清のみを先の液に合わせ、メタノールで正確に 20 mL とし、これを抽出液とした。

抽出液より 2 mL をポリプロピレン製遠沈管(15 mL 用)に正確に分取し、2.5 mol/L 水酸化ナトリウムを 0.25 mL 加えて 76°C の沸騰水浴中で 40 分間加熱した。放冷後、2.5 mol/L 塩酸を 0.25 mL 加えて中和し、pH 試験紙で中性であることを確認後、水を 3 mL 加えて加水分解液とした。

ODS カートリッジに加水分解液を全量負荷し、40%メタノール 4 mL で洗浄後、メタノール 4 mL で 50 mL

ナス型フラスコに溶出した。溶出液を 40℃でエバポレーターを用いて減圧濃縮し、全量をメタノールで正確に 2 mL とした。この液を 0.2 μm のメンブレンフィルターでろ過し、これを試験溶液とした。

なお、通知法では加水分解液を ODS カートリッジに負荷する前にヘキサン分配による脱脂操作が行われているが、山口²⁾らはヘキサン分配の有無でピーク面積へ影響は無いとの報告している。そこで、本検討でもヘキサン分配を実施せずに試験溶液を調製した。

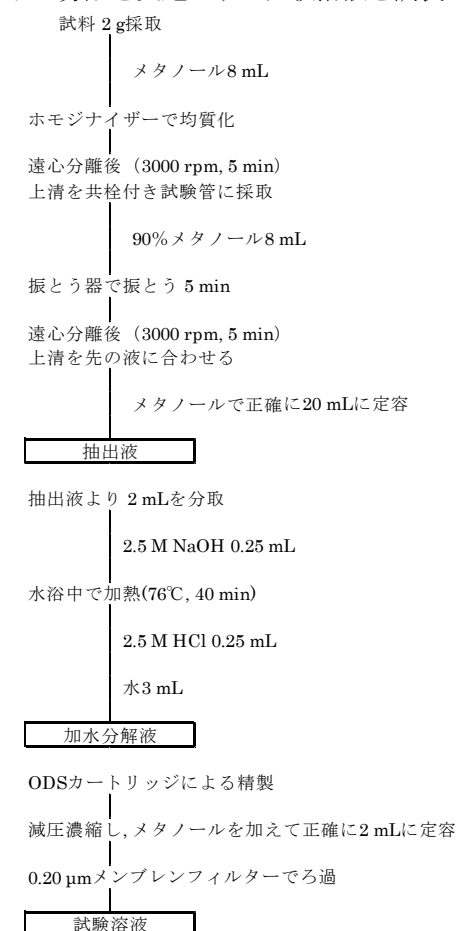


図 1 試料溶液の調製フロー

5. 検量線の作成

OA 及び DTX1 の標準原液をメタノールで混合希釈し、各 2, 4, 10, 20 及び 40 ng/mL の混合標準溶液を調製した。別にホタテガイのオカダ酸群を含まない試料(ブランク試料)を「4. 試験溶液の調製」に従って加水分解液を ODS カートリッジにより精製し、減圧濃縮しメタノールで正確に 1 mL としたブランク試料溶液を調製した。各混合標準溶液とブランク試料溶液が 1:1 となるように混合し、それぞれ UPLC-MS/MS で測定しマトリックス検量線(検量線範囲は 1~20 ng/mL)を作成した。相関係数は 0.999 以上であり、良好な直線性を示した。なお、DTX2 については国内産二枚貝の汚染の可能性は低いこと及び標準品の供給が

不十分であることから、通知¹⁾に従い OA よりも遅れて溶出するピークをモニターすることとした。

結果

1. 選択性

ホタテガイのブランク試料を分析法に従って分析し、妨害ピークの面積が試料中のオカダ酸群濃度 0.01 mg/kg に相当するピーク面積の 1/10 未満であることを確認した。

2. 真度及び精度

妥当性確認ガイドライン³⁾に従い、分析者 2 名、2 併行 3 日間の試験を実施した。結果を表 2 に示す。真度、併行精度及び室内精度全てにおいてガイドラインの目標値を満たしていた。

表 2 妥当性確認結果

試料	OA			DTX1		
	真度 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)	真度 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)
ホタテガイ	94.3	7.4	12.4	92.0	3.6	7.2
目標値	70~120	15≥	20≥	70~120	15≥	20≥

3. 定量限界

ホタテガイのブランク試料から調製した試験溶液に 1 ng/mL(ホタテガイ中 0.01 mg/kg 相当)となるように標準品を添加した結果、S/N 比が 10 以上であることを確認し通知に示されている定量限界 0.01 mg/kg を満たした。

まとめ

ホタテガイを検体として OA 及び DTX1 について UPLC-MS/MS による妥当性確認を実施したところ、ガイドラインの目標値を満たした。この結果より、本法は下痢性貝毒(オカダ酸群)の行政検査を行う性能基準を有する分析法と考えられる。

文献

- 1) 医薬食品局食品安全部基準審査課長、監視安全課長通知「下痢性貝毒(オカダ酸群)の検査について」、食安基発 0306 第 3 号、食安監発 0306 第 1 号(平成 27 年 3 月 6 日)
- 2) 山口瑞香, 山口貴弘, 柿本健作, 他: 食衛誌, 57, 19-22 (2016)
- 3) 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確認ガイドライン」、食安発 1222 第 7 号、(平成 26 年 12 月 22 日)

奈良県における結核菌の分子疫学調査（2017 年度）

田邊純子・佐伯美由紀・橋田みさを・内田美枝

Molecular Epidemiological Research of *Mycobacterium tuberculosis* in Nara Prefecture (2017)

Sumiko TANABE・Miyuki SAEKI・Misao HASHIDA and Yoshie UCHIDA

緒言

結核は、国内患者数および罹患率（人口 10 万人に対する新登録結核患者数）が減少傾向にあるものの、2016 年の新登録結核患者数は 17,625 人報告されており、我が国の主要な感染症である（厚生労働省：平成 28 年結核登録者情報調査年報集計結果、<http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000175095.html>）。奈良県における 2016 年の新登録結核患者数は 191 人で前年（230 人）より減少した。罹患率は 14.1 で、前年値（16.8）より減少したものの未だ全国値（13.9）を上回っている。

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

今回、2017 年度に当センターへ搬入された結核菌について、VNTR 型別を実施した結果をまとめたので報告する。

材料と方法

1. 材料

医療機関等で結核菌と同定され、2017 年 4 月から 2018 年 3 月までに当センターへ搬入された 77 株を用いて試験を実施した。患者情報は届出内容及び保健所調査情報に基づいた。

2. 方法

1) VNTR 型別

結核菌からの DNA 抽出方法は既報¹⁾のとおり。

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

おりとし、得られた PCR 産物は、マイクロチップ電気泳動装置 MultiNA (MCE-202; 島津製作所) およびアガロースゲルによる電気泳動を実施し、測定値から各領域の反復数を算出した。全 12 領域の反復数が完全に一致した菌株群は、同一クラスターと判定した。

2) 遺伝系統の推定

VNTR 型別結果のパターンから遺伝系統を推定するツール³⁾を利用した。

結果

1. 検体

結核菌 77 株の患者年齢階級別および性別菌株数を表 1 に、保健所別搬入菌株数を表 2 に示す。性別では、男性患者株が女性患者株の 2 倍以上を占めていた。年齢階級別で見ると、70 歳以上が 53 株 (68.8%) あり、半数以上が高齢者由来であった。保健所別では奈良市保健所からの菌株が最も多く、南和地域は 5 株と少なかった。

表 1 患者年齢階級別および性別菌株数

年齢階級	男性	女性	計
0~19	0	0	0
20~29	5	1	6
30~39	1	2	3
40~49	3	1	4
50~59	5	1	6
60~69	5	0	5
70~79	11	6	17
80~89	20	4	24
90~	6	6	12
計	56	21	77

表 2 保健所別搬入菌株数

保健所	菌株数
奈良市	32
郡山	22
中和	18
吉野	4
内吉野	1
計	77

表3 JATA(12)-VNTR型におけるクラスター形成

No.	菌株番号	JATA(12)-VNTR												疫学情報	奈良県クラスターID
		J01	J02	J03	J04	J05	J06	J07	J08	J09	J10	J11	J12		
1	tb17064	2	3	1	3	4	2	5	4	3	12	5	3		12TB15012
	tb17075	2	3	1	3	4	2	5	4	3	12	5	3		
2	tb17007	3	3	3	4	7	3	7	5	5	7	2	5		12TB14008
	tb17041	3	3	3	4	7	3	7	5	5	7	2	5		
3	tb17018	4	1	3	2	6	2	7	4	4	7	8	5		12TB17018
	tb17023	4	1	3	2	6	2	7	4	4	7	8	5		
4	tb17025	4	1	3	2	7	4	9	4	5	7	8	5		12TB17025
	tb17063	4	1	3	2	7	4	9	4	5	7	8	5		
5	tb17043	4	3	3	3	3	3	7	4	5	7	8	5		12TB15019
	tb17068	4	3	3	3	3	3	7	4	5	7	8	5		
6	tb17032	4	3	3	3	6	3	7	4	5	8	8	5		12TB14003
	tb17076	4	3	3	3	6	3	7	4	5	8	8	5		
7	tb17002	4	3	3	3	7	3	7	4	5	7	8	5		12TB17002
	tb17070	4	3	3	3	7	3	7	4	5	7	8	5		
8	tb17005	4	3	4	3	5	3	7	4	5	7	9	3	2株は県外集団事例関連	12TB14043
	tb17013	4	3	4	3	5	3	7	4	5	7	9	3		
	tb17058	4	3	4	3	5	3	7	4	5	7	9	3		
9	tb17055	4	3	5	2	7	3	7	4	5	7	10	5	夫婦	12TB14041
	tb17056	4	3	5	2	7	3	7	4	5	7	10	5		

2. VNTR 型別

VNTR 型別の結果、結核菌 77 株は 67 パターンの JATA(12)-VNTR 型に分かれ、19 株 (24.7%) が 9 クラスターを形成した (表 3)。

3. 遺伝系統の推定

JATA(12)-VNTR 型から遺伝系統を推定した結果、非北京型 13 株 (16.9%)、北京祖先型 47 株 (61.0%)、北京新興型 17 株 (22.1%) であると推定された (表 4)。患者年齢を見ると、69 歳以下では北京新興型が多く、70 歳以上は北京祖先型と非北京型が多かった。

表 4 遺伝系統の推定

遺伝系統	菌株数	年齢層別菌株数	
		0-69	70-
非北京型	13	0	13
北京祖先型	47	10	37
北京新興型	17	14	3
計	77	24	53

考 察

2017 年度、JATA(12)-VNTR 型が全て一致した菌株群は 9 クラスターあった。そのうち 2 クラスターは疫学的関連情報のある菌株を含んでおり (表 3)、それぞれ同一感染源の可能性が高いと考えられた。

一方で疫学的関連情報がなく一致した菌株群は 7 クラスター見られた。JATA(12)-VNTR 法は、疫学的関連性の低い菌株を含むサーベイランス分析において分離できず同一型になる菌株が多く見出されている。これらの菌株をより厳密に異同判定するため、解析領域

を追加し分解能を向上させる方法もある。しかし全て識別することは困難であり、クラスター形成株については実地疫学情報の有無が重要になる。今後は取得済み患者情報の比較や追加疫学調査について、保健所や主管課と検証していく必要があると思われる。

2013 年度から開始した事業により、2017 年度までに結核菌 235 株の JATA(12)-VNTR 型別結果が得られた。2017 年度までのクラスター形成率は 45.5% (107 株/235 株) で、2016 年度まで (39.9%) より増加した。遺伝系統の推定も含めて、県内患者由来株についてさらに解析を進めたいと考えている。

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

謝 辞

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

文 献

- 1) 辻本真弓, 田邊純子, 橋田みさを, 他: 奈良県保健研究センター年報, 51, 65-66 (2016)
- 2) 前田伸司, 村瀬良朗, 御手洗聡, 他: 結核, 83, 673-678 (2008)
- 3) Seto J, Wada T, Iwamoto T, et al.: *Infect. Genet. Evol.*, 35, 82-88 (2015)

ノロウイルス GII.17 および GII.4 の VP1 領域解析について

藤谷美沙子・稲田眞知・尾西美咲・千葉翔子・中野 守・榮井 毅

Analysis of Norovirus VP1 Genes by the Primer Walking Method

Misako FUIJITANI・Machi INADA・Misaki ONISHI・Shoko CHIBA・Mamoru NAKANO
and Takeshi SAKAI

緒 言

ノロウイルス(NV)は、一本鎖 RNA ウイルスであり、全長はおよそ 7500 塩基からなり、3つの翻訳領域 ORF (open reading frame1~3) で構成され、ウイルスキャプシドおよび主要抗原である VP1 蛋白は ORF2 にコードされている。遺伝子群は 7 つ (GI~GVII) 存在し、ヒトには主に GI と GII が感染する。GI は 9 種類 (GI.1~GI.9), GII は 22 種類 (GII.1~GII.22) の遺伝子型に分類される。NV はこれまで、VP1 の N 末端領域の約 300 塩基を標的にして遺伝子型分類が行われてきた。しかし、この分類法では分別できない遺伝子型が増加し、全長塩基配列の解読が重視されつつある¹⁾。

また NV の数多くある遺伝子型のなかで、これまでの NV の主流遺伝子型は GII.4 であった。しかし、2014 年に検出された GII.17 がこれまでの GII.17 とは異なる塩基配列であることが発見され、GII.4 に迫る勢いで検出数が増加した。また 2017 年には大規模食中毒の原因となり注目を集めた。

本研究ではプライマーウォーキング法により、GII.17 および GII.4 の VP1 領域全長 (約 1600 塩基) の塩基配列解読を行い、得られた全長塩基配列データの蓄積および疫学解析を実施したので報告する。

対象と方法

1. 検査対象

奈良県感染症発生動向調査および行政検査で搬入された糞便検体のうち、GII.17 は 2014/2015 シーズンと 2015/2016 シーズンに VP1 の N 末端領域解析から GII.17 と判明した 29 例を対象とした。GII.4 は 2016 年に検出したもののうち N 末端領域解析から GII.4 と判明している 10 検体を対象とした。

2. 検査方法

糞便検体から QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) を用いて、添付のプロトコールに従いウイルス RNA を抽出した。プライマーの設計には Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) を使用し、独自に設計したプライマーや既存のプライマーを用い、RT-PCR 法により VP1 領域全長を増幅した。得られた遺伝子増幅産物について、独自に設計したプライマーおよび G2-SKF, G2-SKR を用い、プライマーウォーキングを行い、全長塩基配列の解読を行った。解読できた全長塩基配列について、最尤法 (ML 法) により参照株を用いた系統樹解析を実施した。

結 果

1. GII.17 について

設計したプライマーにより 29 検体のうち 14 検体で全長増幅が確認できた。増幅可能であった 14 検体についてプライマーウォーキングを行った結果、10 検体について 1677 塩基の解読ができた。全長解読できた 10 検体について参照株を用いた系統樹解析を行った結果を図 1 に示す。

2014/2015 シーズンおよび 2015/2016 シーズンに検出した株すべてが同一のクラスターに分類された。

2. GII.4 について

COG2F と独自に設計したプライマーにより 10 検体のうち 9 検体で全長増幅ができた。増幅可能であった 9 検体についてプライマーウォーキングを行った結果、7 検体について 1607 塩基の解読ができた。この 7 検体について系統樹解析を行った結果を図 2 に示す。

7 検体すべてが 2012 年に大きな流行を起こした Sydney/NSW0514/2012/AU の近縁株であった。

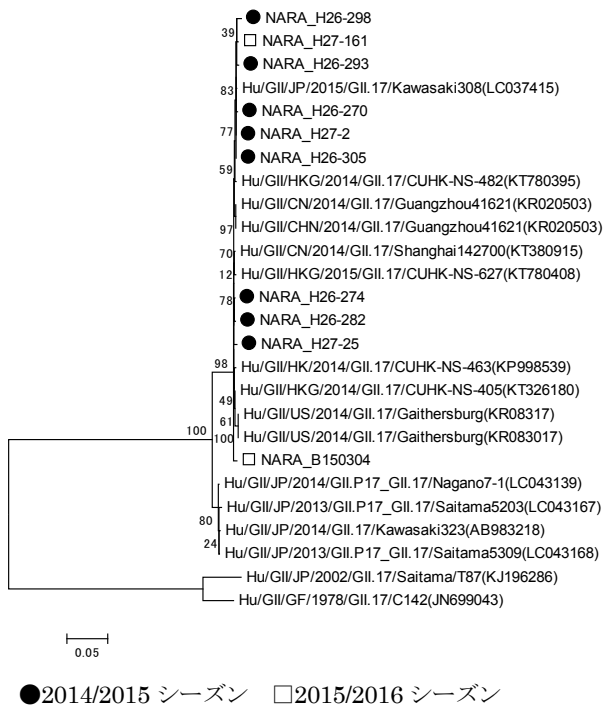


図1 GII.17のVP1領域における系統樹

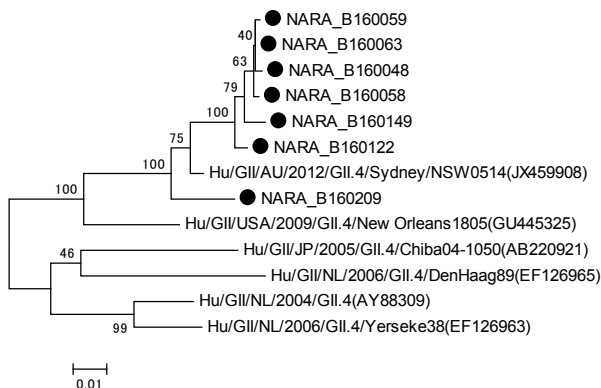


図2 GII.4のVP1領域における系統樹

考察

本県で検出した GII.17 の 10 株は、すべて同一のクラスターに分類された。この 10 株は、2014/2015 シーズンと 2015/2016 シーズンの 2 シーズンにわたり検出している株であるが、2 シーズンで異なるクラスターに分類されることはなかった。また分類されたクラスターには Kawasaki308 株も属している。Kawasaki308 株は、Kawasaki323 株よりも進化の観点から新しい株とされており²⁾、GII.17 は Kawasaki323 から Kawasaki308 へと進化をしつつ流行を維持したと考えられている³⁾。本県で検出した株は、Kawasaki308 株の近縁株だけでなく、香港や台湾で検出されている株の近縁株もあり、同時期の流行であるが同一のウイルスではなく様々なウイルスが流

入し流行していたことがわかった。

GII.4 の 7 検体については、これまでも検出の多かった Sydney/NSW0514/2012/AU の近縁株であった。GII.4 についても GII.17 と同様に同じウイルスではなく、様々なウイルスが流入していることがわかった。

本研究により、プライマーウォーキングによる VP1 領域の全長塩基配列データの蓄積を行うことができた。単年のデータを基にした疫学解析は、全長塩基配列データであっても得られる知見は少ない。そのため、今後も全長塩基配列データを蓄積し、長期にわたる調査を行っていきたいと考えている。

文献

- 1) 片山和彦, 木村博一: ノーウォークウイルス (ノロウイルス) の遺伝子型 (2015 年改訂版), 病原微生物検出状況 (IASR) インターネット版 (掲載日 2015.9.8)
- 2) Matsushima Y, Ishikawa M, Shimizu T, *et al.*: *Euro Surveil*, 20(26), pii : 21173(2015)
- 3) 宗村佳子, 木本佳那, 小田真悠子, 他: 病原微生物検出状況, 38, 5-6(2017)

風しんウイルスの検出と遺伝子型別—平成 29 (2017) 年—

稲田眞知・尾西美咲・藤谷美沙子・千葉翔子・中野 守・榮井 毅

Detection of Rubella virus and Genotyping

Machi INADA・Misaki ONISHI・Misako FUJITANI・Shoko CHIBA・Mamoru NAKANO
and Takeshi SAKAI

緒 言

風しんウイルスは、Togavirus 科 Rubivirus 属のプラス RNA ウイルスで、飛沫感染により拡大する。2～3 日の潜伏期間を経て、発熱、発疹、リンパ節腫脹の 3 主徴を呈する急性発疹性感染症である。まれに、血小板減少性紫斑病や急性脳炎などの合併症も見られるが、ほとんどは軽症で経過し、予後も良好な感染症とされる。ただし、風しんウイルスに免疫が無い女性が妊娠初期に罹患した場合、その出生児に先天性風しん症候群(Congenital Rubella Syndrome : CRS)が見られることがあり、大きな問題となる。

我が国では、平成 24～25 (2012～2013) 年に輸入例からの地域流行が拡大し、全国的な大流行となった。風しん患者数の増加に比例し、CRS の報告も増加した。さらに、世界保健機関 (WHO) 等が、2020 年までに麻疹および風しんの排除達成を目標としていることから、我が国でも CRS の発生をなくし、平成 32 (2020) 年度までに風しん排除を達成することを目標として、平成 26 (2014) 年に「風しんに関する特定感染症予防指針」(以下「予防指針」)(平成 26 年 3 月 28 日厚生労働省告示第 122 号) が策定された。その後の予防指針の一部改正により、平成 30 (2018) 年 1 月 1 日からは、①風しんの届出は診断後直ちに行うこと、②風しん患者全てについて積極的疫学調査を行うこと、③原則として全例に地方衛生研究所によるウイルス遺伝子検査を行うことが定められた。このウイルス遺伝子検査には、リアルタイム PCR による迅速なウイルス遺伝子の検出及び(可能な限りとはされているが)風しんウイルスの遺伝子配列の解析によるウイルス遺伝子型の特定が記載された。

平成 29 (2017) 年度に風しんウイルスを検出した事例について、ウイルス量が少ない臨床検体から遺伝子型を特定できたので報告する。

対 象

平成 29 (2017) 年 5 月に血清 IgM 抗体の検出による検査診断例の届出があった。患者は、県外へ通勤する 50 歳代男性で、海外渡航歴は無かった。検体は、発症 10 日目の咽頭ぬぐい液、凝固防止末梢血液、尿が搬入された。なお、届出当時は予防指針の改正前であり、抗体検査による検査診断例には遺伝子検査は必要では無かったが、管轄保健所の依頼があったことから、リアルタイム PCR から実施した。

検査方法及び結果

既に風しんと検査診断されていた症例のため、風しんウイルスのみを検査対象とし、血液は血漿を検査に用いた。検体の前処理、ウイルス RNA 抽出及びリアルタイム PCR については、病原体検出マニュアル¹⁾(<https://www.niid.go.jp/niid/ja/lab-manual.html>) に従い実施した。結果、咽頭ぬぐい液のみ陽性 (Ct=38.0) となった。

風しんウイルスの遺伝子型分類は、WHO により E1 遺伝子領域内の配列 739bp を解析し、参照株の配列と比較解析することによると定められている。一般に E1 遺伝子領域は一度に増幅させることが困難なため、2 断片に分けて RT-nestedPCR で増幅させた後、遺伝子配列解析するが、ウイルス遺伝子量が十分でないと PCR により増幅できないため、検体にはウイルス分離を行った分離サンプルを用いるとされている。今回の陽性となった検体は、ウイルスコピー量でリアルタイム PCR の検出限界に近かったことから、ウイルス分離を行うこととした。細胞培養には、Vero 細胞(平成 25 年感染研から分与を受けたもの)を 25 cm² フラスコに 80%シートしたものをを用いた。維持培地には、1%FBS を含む Eagle's MEM 培地を使用し、35°C の炭酸ガス培養器で培養した。初代継代時にバクテリアの繁殖が見られたため、一旦凍結融解し、上清を 0.20 μm 駒形フィルター (DISMIC-13CP020AS) でろ過

して再接種した。接種翌日には上清を交換することとして7日間観察し、継代した。3代目継代後、培養上清についてウイルス RNA 抽出を行い、NS 遺伝子の検出を実施したが増幅は見られず、ウイルスは培養できていなかった。そこで咽頭ぬぐい液から直接、E1 遺伝子を検出するため、QIAamp Viral RNA mini Kit を用いてウイルス RNA の濃縮抽出を行った。つまり、キャリア RNA に検体を添加したものを3本分を1つのスピナラムに添加し、Kit のプロトコールに従い処理した後、BufferAVL での溶出は 40 μ L (通常は 60 μ L) で行った。E1 遺伝子の検出は、マニュアル¹⁾に従い逆転写し、1stPCR の cDNA 及び nestedPCR の 1stPCR 産物ともに倍量を添加した。また、PCR はともに 35 (マニュアル¹⁾では 30) サイクルとした。PCR 産物にエチジウムブロマイドを添加した 1.5%アガロースゲルを用いて電気泳動したところ、5'断片では増幅が見られたが、3'断片では増幅が見られなかった。3'断片検出のため、特異プライマーによる逆転写を行う One Step RT- nested PCR を行った。PrimeScript One Step RT-PCR Kit Ver.2 (Takara Bio) を用いて、2 \times buffer 12.5 μ L, Forward Primer E1-7F (10 μ M) 1.5 μ L, Reverse Primer E1-12R (10 μ M) 1.5 μ L, Enzyme Mix1 μ L に濃縮抽出した鋳型 RNA8.5 μ L を加えた計 25 μ L を、50 $^{\circ}$ C30min \rightarrow 94 $^{\circ}$ C3min \rightarrow 98 $^{\circ}$ C30sec \cdot 61 $^{\circ}$ C30sec \cdot 72 $^{\circ}$ C1min を 40cycle \rightarrow 72 $^{\circ}$ C10min で One Step RT-PCR を実施し、続いて、PerfectShot Ex-Taq (Takara Bio) 25 μ L に Forward Primer E1-3F (10 μ M)2.0 μ L, Reverse Primer E1-3R (10 μ M)2.0 μ L, RNase free water16 μ L に 1stPCR 産物 5.0 μ L

を加えた合計 50 μ L を、94 $^{\circ}$ C3min \rightarrow 98 $^{\circ}$ C10sec \cdot 66 $^{\circ}$ C30sec \cdot 72 $^{\circ}$ C45sec を 35cycle \rightarrow 72 $^{\circ}$ C3min で nestedPCR を行った。アガロースゲル電気泳動により増幅が確認できたため、これをシーケンスに用いた。5'断片及び 3'断片の遺伝子配列をつなぎ合わせて遺伝子型決定領域 739bp の配列を得ることができた。マニュアル¹⁾に従い、参照株との系統樹解析により、1E型と特定した(図)。また、解析できた配列は DDBJ に登録した (Accession No. LC317008)。

考 察

今回の事例は国内感染事例で、管轄の保健所により感染性のある期間に妊婦との接触が無い事は確認されているが、この患者への感染源は確認できておらず、推定感染地域は奈良県とされている。平成 25 年に流行した際も、患者の中心は 20~50 歳代の男性で、職場などで感染が拡大し、大きな問題となった。また、風しんは不顕性感染が小児で 30~50%、成人で 15%程度存在するとされ、全て患者の把握は困難とされる。海外から持ち込まれる輸入例の発生は続いていることから、国内で流行していなくても、特に妊娠可能女性やその家族は、ワクチン接種により感受性を低下させることが必要であると思われた。今回の事例を教訓として、今後も積極的な周知を行っていきたい。

文 献

- 1) 病原体検出マニュアル 風疹 第3.2版 平成29年8月：国立感染症研究所

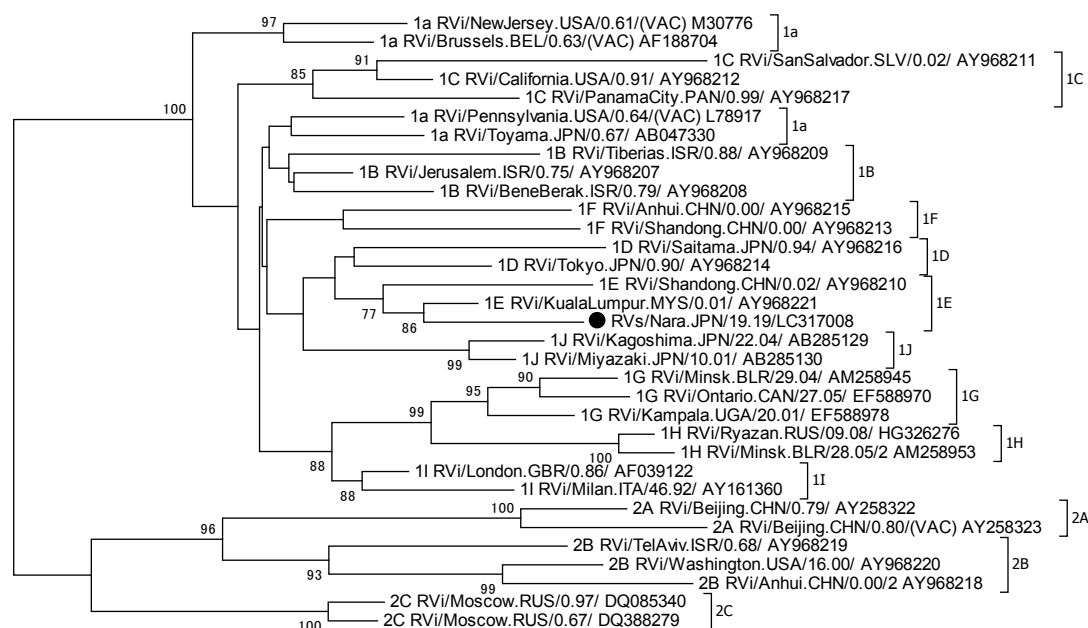


図 風しんウイルス参照株と検出株(●)による系統樹

奈良県におけるヒトパレコウイルスの検出状況 2010～2017年

稲田真知・尾西美咲・藤谷美沙子・千葉翔子・中野 守・榮井 毅

Detection of Human Parechovirus in Nara Prefecture

Machi INADA・Misaki ONISHI・Misako FUJITANI・Shoko CHIBA・Mamoru NAKANO
and Takeshi SAKAI

緒言

ヒトパレコウイルス (Human parechovirus : HPeV) は、主に小児の胃腸炎や呼吸器疾患患者から検出されるウイルスで、ピコルナウイルス科パレコウイルス属に分類される¹⁾。現在までに17種類の遺伝子型が報告されているが、我が国では、1型と3型の感染例が多く報告されており、特に数年おきに検出がある3型は、乳幼児、特に新生児では敗血症や脳炎を引き起こすことがあり、軽視できないウイルスである。

本県では2014年より検索を開始しており、その後の検出状況は本年報に毎年報告している。また、全国で3型の流行が見られた2011年及び2013年の状況については、別途報告²⁾した。今回、これまで検査対象としてこなかった2010年及び2012年の遡り調査を実施し、さらに2017年の状況を加え、2010年以降の奈良県での検出状況について取りまとめたので報告する。

対象及び方法

2010年4月から2017年12月までに、奈良県感染症発生動向調査事業により病原体定点等から提供された検体のうち、2015年3月分までは、エンテロウイルスなど病原体の検出がない検体を対象とした。2015年4月以降の検体については、臨床診断名や臨床症状からHPeV感染が疑われるもの(エンテロウイルス陰性の脳脊髄膜炎症状、重症呼吸器感染症症状、発疹、

感染性胃腸炎等のあるもの)を対象とした。検体は、1491例1733検体(咽頭ぬぐい液等呼吸器系検体1020検体、便等腸管系検体508検体、髄液124検体、血液他41検体、その他尿等40検体)で、年別では、2010年から2017年まで順に、242例268検体、325例356検体、282例312検体、220例249検体、164例191検体、113例144検体、97例135検体、48例78検体であった。これらについて既報²⁾に従い検査を実施した。

また、2017年に検出した4型については、国内の調査で使用されることが多いVP1領域の塩基配列を解読するため、既報で用いたVP3/VP1を検出するHarvalaらのプライマーのうちouter sense primer(2090)及びinner sense primer(2159)を上流に用い、下流側にIto³⁾らのouter antisense primer (HPeV-VP1-AS2)及びinner antisense primer (HPeV-VP1-AS)をそれぞれ使用したone-step nested PCR法(1st one-step PCR: RT反応50°C30min→95°C1min→94°C1min+42°C1min+72°C90secを40cycle→72°C10min, nestedPCR: 95°C1min→94°C1min+42°C1min+72°C90secを35サイクル→72°C10min)により約930bpの増幅産物を得た。これを既報²⁾に従いダイレクトシーケンスを実施し、塩基配列を解読した。

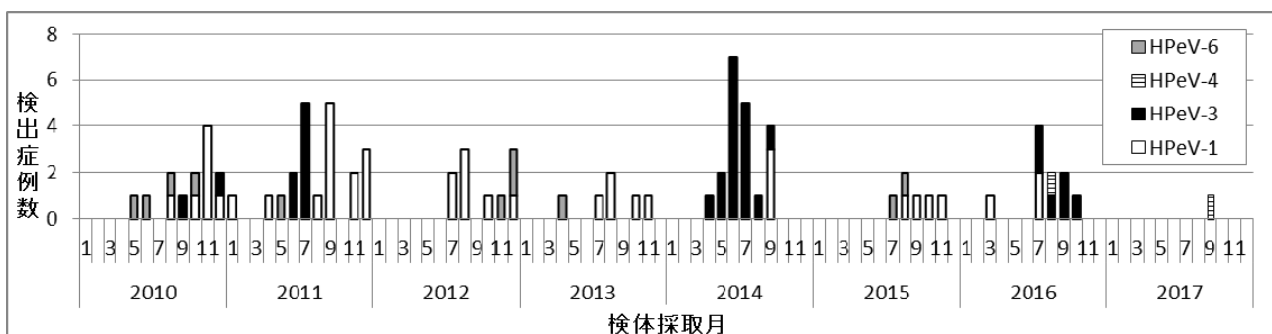


図1 検体採取月別型別検出状況

結果

供試した 1491 例中 87 例 (5.8%) 102 検体 (咽頭 47, 便 45, 髄液 5, 血液 3, 尿 2) から HPeV を検出した。遺伝子型別では, 1 型 42 例, 3 型 32 例, 4 型 2 例, 6 型 11 例であった。検出時期は, 1 型は 7 月から 12 月が多く, 3 型は 6, 7 月が多く, 4 型は 8 月と 9 月, 6 型は 4 月から 12 月に検出があった (図 1)。患者年齢は, 1 型は 1 歳をピークに 4 歳まで, 3 型は 1 歳が最も多く, その後徐々に減少するが成人からも検出があり, 4 型は生後 16 日齢と 2 歳, 6 型が 1 型同様 1 歳が最も多いが, 9 歳の検出があった (図 2)。性差は, 男 : 女 = 1.4 : 1 であった。

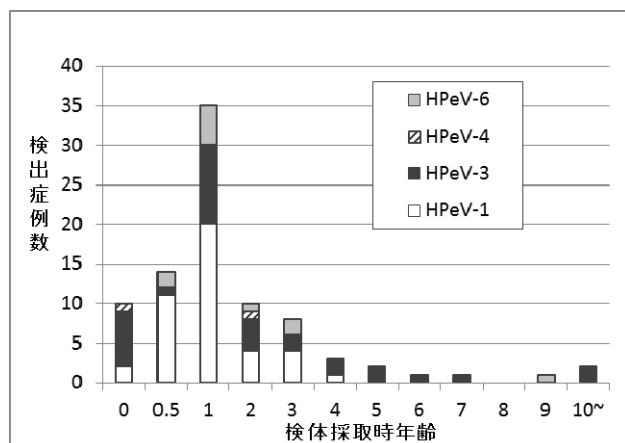


図 2 年齢別型別検出状況

診断名では, 1 型は胃腸炎等 22 例, 呼吸器感染 10 例, 発疹性疾患 (不明発疹, パルボウイルス感染症疑い他) 5 例, 不明熱 2 例, その他 4 例 (心筋炎, 無菌性髄膜炎・けいれん重積, 敗血性ショック, 便秘) (重複有り) であった。3 型は発疹性疾患 (手足口病, ウイルス性発疹他) 16 例, 呼吸器感染 7 例, 胃腸炎等 3 例, ヘルパンギーナ (口内炎) 2 例, 筋痛症 2 例, その他 2 例 (無菌性髄膜炎・脳症, 無呼吸発作) であった。4 型は胃腸炎 1 例, 不明熱 1 例, 6 型は呼吸器感染 6 例, 胃腸炎 4 例, 手足口病 1 例であった。

なお, 2017 年の検出は, 不明熱と診断されている生後 16 日齢女児から検出した 4 型 1 株のみであった。本症例は発熱以外に特記すべき症状がなく, 家族歴や犬猫との接触歴もなかった。血液検査などから新生児 DIC 診断基準⁴⁾ に当てはまるとして, 当センターに検査依頼があった。発症日に採取された髄液, 血清及び発症 10 日後の咽頭ぬぐい液, 便が提出され, 血清と便から 4 型を検出した。その他エンテロウイルス, ヘルペスウイルス, RS ウイルスは陰性であった。検出した 4 型について, 通常の VP3/VP1 領域 256bp に加え, 国内の調査で使用されることが多い VP1 領域の塩

基配列の解析を試み, 結果として, VP3 から VP1 領域の約 900bp が解読できた。BLAST による相同性解析では, 2016 年に山形県で初めて検出された 4 型⁵⁾ が最も相同性が高かった。

まとめ及び考察

今回 8 年間の結果からみた検出時期や年齢は, 1 型は秋に多く 1 歳を中心に 4 歳まで検出があり感染性胃腸炎からの検出が多く, 3 型は初夏に多く 1 歳が最も多いが成人例もあり, 発疹性疾患が多いが, 成人例では流行性筋痛症がみられた。また, 6 型は検出に季節性は無く, 年齢は 1 型のように 1 歳を中心に多いが, 9 歳の検出もみられた。全国では 3 型は生後半年, 特に生後 2 ヶ月までの検出が多く, 本県の状況とは少し異なる。

HPeV は, 特に 3 型の重症度から近年注目されているウイルスである。また, 4 型は, 2006 年にオランダから報告されたウイルスで, 国内ではまだ検出が少なく, 詳細は不明であるが, 2017 年に検出した症例と同様に敗血症様症候群を呈した新生児例が報告⁶⁾ されていることから, 看過できないウイルスと思われる。今後の検出情報などに注視し, 積極的な情報提供により症例集約・検査の実施など検討していきたい。

謝辞

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

文献

- 1) 相澤悠太, 齋藤昭彦 : ウイルス 65, 17-26 (2015)
- 2) 稲田真知, 藤谷美沙子, 杉本大地, 他 : 臨床とウイルス, 44, 277-284 (2017)
- 3) Ito M, Yamashita T, Tsuzuki H, et al. : *J. Clin. Microbiol.* 48, 2683-2688 (2010)
- 4) 新生児 DIC 診断・治療指針 2016 年版 (日本産婦人科・新生児血液学会)
- 5) Tanaka, S., Matoba, Y., Unno, M., et al. : *Jpn. J. Infect. Dis.* 70, 689-690 (2017)
- 6) 中山有美, 相澤悠太, 大塚岳人, 他 : 小児感染免疫, 29, 259-262 (2017)

第3章 調査研究・報告

第3節 他誌掲載論文の要旨

奈良県における2012/2013から2015/2016シーズンの ノロウイルス胃腸炎による集団発生について

藤谷美沙子, 米田正樹, 稲田眞知, 千葉翔子, 尾西美咲, 中野 守, 榮井 毅

臨床とウイルス, 45, 374-380 (2017)

奈良県における2012/2013シーズンから2015/2016シーズンまでの4シーズンのノロウイルスによる食中毒・集団感染性胃腸炎事例について発生状況等の調査を実施した。ノロウイルスが検出された事例は93例(2012/2013シーズン:35例,2013/2014シーズン:25例,2014/2015シーズン:24例,2015/2016シーズン:9例)あり, GIIによるものがほとんどであった。検出したノロウイルスの遺伝子型は, GII.4が最も多く, 他の遺伝子型はシーズンごとに発生頻度に違いがみられた。また2014/2015シーズンには, 新たな遺伝子型であるGII.P17-GII.17を検出した。4シーズンの調査により, ノロウイルスの集団発生は冬季と春季の二つのピークがみられるなど1シーズンの調査では把握することが困難な特徴について明らかとなった。今後も調査研究を継続して行う必要がある。

奈良県における2016/17シーズンのノロウイルス検出状況

稲田眞知, 藤谷美沙子, 尾西美咲, 千葉翔子, 中野 守, 榮井 毅

国立感染症研究所感染症疫学センター 長澤耕男(現千葉大学) 木村博一(現群馬パース大学)

病原体検出情報, 39, 11-13 (2018)

2016/17シーズンにおいて, 奈良県では感染性胃腸炎の定点報告数が, 第43週(2016年10月24日~30日)頃より増加し, 第46週(11月14日~20日)には23.7と警報開始基準値20を超え, 2006年第47週以来10年ぶりに感染性胃腸炎の警報発令となった。ほぼ同時期より集団感染性胃腸炎事例〔食中毒(疑)等を含む〕も増加し, シーズン開始後の10月~12月までで30事例(前年同時期:17事例)発生し, 1事例当たりの患者数も多いことから, 患者数合計は速報値で1,300人以上(前年同時期:360人)となった。既報によれば, 秋季から冬季にかけてウイルス性の感染性胃腸炎患者から検出されるのはノロウイルス(NoV)が多いとされる。本稿において, 当該シーズンに, 乳幼児・学童(乳児園, 保育園, こども園と幼稚園), 成人胃腸炎集団発生(福祉施設)および食中毒事例から検出されたNoVの疫学的・遺伝学的解析結果の概要について報告する。

Distribution of Rotavirus Genotypes from the 2008/2009 to the 2015/2016 Season in Nara Prefecture, Japan

Daichi Sugimoto, Mamoru Nakano, Machi Inada, Misako Fujitani, Shoko Chiba, and Takeshi Sakai

Jpn. J. Infect. Dis., 70, 593-594, (2017)

This study was conducted to investigate the distribution of rotavirus genotypes in Nara Prefecture, Japan before and after the introduction of rotavirus vaccination in 2011. Since the 2011/2012 season, DS-1-like G1P[8] strains have been detected in Nara Prefecture, accounting for about half of all strains in the 2014/2015 season. During the 2015/2016 season, no DS-1-like G1P[8] strains were detected; G2P[4] was the predominant genotype.

第3章 調査研究・報告

第4節 報告書の要旨

ISO/IEC 17025 認定取得に向けた試験所の検討に関する研究

渡辺卓穂¹⁾・石井里枝²⁾・松下和裕³⁾・須藤律子⁴⁾・吉田栄充²⁾・近藤貴英⁵⁾・大門拓実⁶⁾・橋本博之⁷⁾・
高野伊知郎⁸⁾・脇ますみ⁹⁾・高橋京子¹⁰⁾・福田依美子¹¹⁾・猪飼誉友¹²⁾・栗津 薫¹³⁾・神藤正則¹⁴⁾・
岡山明子・高井靖智¹⁵⁾・渡邊敬浩¹⁶⁾

平成 29 年度厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）分担研究報告書

現在、国際的な試験所の取組みは、業務管理要領には含まれていないマネジメントの規定である ISO 9001 の内容を取り入れた ISO/IEC 17025 が基礎となっている。一方、都道府県等の地方自治体が設置する食品衛生検査施設で実施される検査等の業務管理については、平成 9 年に通知された「食品衛生法施行規則の一部を改正する省令の施行について」及び「食品衛生検査施設における検査等の業務管理について」の別紙「食品衛生検査施設における検査等の業務管理要領」に沿って実施することが求められているが、本業務管理要領は、抜本的な改定がなされておらず、現在に至っている。そこで、国際整合を図ることを目的として、本業務管理要領に代わる ISO/IEC 17025 を基礎とした試験所の取組みに関する新たな文書を本研究の別の分担研究班が開発している。本分担研究班では新たな取組みが地方自治体の食品衛生検査施設へ導入された場合、検査の品質保証に与える影響と課題を明らかとし、それらを解決する方策を検討した。現行の業務管理要領と ISO/IEC 17025 を基礎とする新たな取組みについて、比較検討するために研修会及び講習会を開催した。さらに地方自治体の設置する試験所の業務管理の現状を把握するために、アンケート調査を実施し、そこから見える課題を抽出し、新たな取組みの導入に資する課題解決の方策について検討した。また、安定性及び均一性の改善を目的に開発された技能試験試料を分析し、実際に分析を行う試験所の立場から、技能試験プログラムの開発に資する助言を行った。

1)一般財団法人食品薬品安全センター、2)埼玉県衛生研究所、3)栃木県保健環境センター、4)群馬県食品安全検査センター、5)さいたま市健康科学研究センター、6)越谷市保健所、7)千葉県衛生研究所、8)東京都健康安全研究センター、9)神奈川県衛生研究所、10)横浜市衛生研究所、11)川崎市健康安全研究所、12)愛知県衛生研究所、13)地方独立行政法人大阪健康安全基盤研究所、14)堺市衛生研究所、15)和歌山県環境衛生研究センター、16)国立医薬品食品衛生研究所

入浴施設におけるレジオネラ属菌迅速検査法の阻害物質の影響とその実用化

吉田孝子

公益財団法人 大同生命厚生事業団 平成 28 年度「地域保健福祉研究助成」報告集

レジオネラ属菌検査は、従来の培養法では結果判明に 10 日近くを要するため、迅速検査法(遺伝子検査法)が強く求められてきた。そこで、迅速検査法 3 法(LAMP 法, qPCR 法, LC EMA-qPCR 法)について、実用化を目的に検討を実施した。3 法は、いずれも浴槽水の基準値(10 CFU/100 ml)を検出でき、さらに qPCR 法, LC EMA-qPCR 法の 2 法は 1 CFU/100 ml まで検出できた。実検体を用いての検証では、浴槽水では、培養法陽性検体は、全ての迅速検査法で陽性になった。拭き取り検体で培養法と比較したところ、LAMP 法は他の方法よりやや感度が低く、qPCR 法では特異度、及び相関がやや低くなった。LC EMA-qPCR 法は感度、特異度、相関共に良好で、培養法の結果をより反映した結果が得られることが分かった。それぞれの迅速検査法の特性を生かし、状況に応じて有効に活用することで、レジオネラ症の感染予防、感染拡大防止に貢献していきたい。

奈良県における新たな遺伝子型ノロウイルスの発生状況の把握に関する研究

藤谷美沙子

公益財団法人 大同生命厚生事業団 平成 28 年度「地域保健福祉研究助成」報告集

本県で新たな遺伝子型ノロウイルス GII.P17-GII.17 を、2014/2015 シーズンおよび 2015/2016 シーズンの 2 シーズンを通して検出した。これまでの主流遺伝子型である GII.4 と比較してみると、患者の症状に違いはみられなかったが、発生月は GII.4 が 11 月から 1 月にピークがみられるのに対して、GII.P17-GII.17 は 1 月以降の検出が多かった。また患者年齢は、GII.4 よりも年齢の大きい幼稚園から小学校にかけての年齢が多く、GII.P17-GII.17 は GII.4 とは異なる年齢層で流行を拡大させる可能性が考えられた。現在、GII.P17-GII.17 は懸念されていたほどの大流行とはなっていないが、今後も研究を継続し、データの蓄積を行い、傾向や発生状況を把握し、流行拡大の防止に貢献できるよう努めたい。

第3章 調査研究・報告

第5節 研究発表の抄録

UPLC-FL 法によるヒスタミン分析の妥当性評価

村上友規・仲井菜都希・安藤尚子・堀 重俊

平成 29 年 6 月 21 日（大和郡山市）平成 29 年度奈良県衛生関係職員研修会

昨年度, UPLC を用いて固相抽出及びイオンペア試薬を使用しない試験法を構築した. 今年度は鮮魚, 調味料, 加工品およびその他食品の合計 13 品目を対象に構築した試験法の妥当性を確認したところ, アンチョビペーストを除く 12 品目についてクロマトグラム上で夾雑物と良好に分離できた. 良好に分離できた 12 品目の食品ごとの平均回収率は 95.8~117.7%, 併行精度は 1.3~8.9%, 室内精度は 2.5~8.4%であり, 妥当性評価ガイドラインの基準を満たした. なお, 検量線は 5~50 $\mu\text{g/mL}$ の範囲で $R^2>0.99$ の直線性が得られ, 定量下限値は 0.5 $\mu\text{g/mL}$ であった.

畜産物中のテトラサイクリン系抗生物質一斉分析法の検討

北岡洋平・米田正樹・樋上 絢・西山隆之・山下浩一・堀 重俊・岡山明子

平成 29 年 11 月 16 日（橿原市）第 38 回奈良県公衆衛生学会

動物用医薬品は, 畜産動物に対して, 疾病の治療を目的に短期間で投与される以外に, 飼育効率の改善や発育促進を目的に飼料添加物として飼料に混ぜて長期間で微量投与されている. そのため畜産動物中で代謝・排泄されずに残留したまま出荷される場合があり, 食品衛生法により, 食品中の残留基準値が設定されている. 特にテトラサイクリン系抗生物質は, 動物用医薬品や飼料添加物として広く使用され, 動物用医薬品の系統別で見ると, 最も販売量が多く, 平成 25~26 年度 食品中の残留農薬等検査結果(厚生労働省)からも検出事例の上位を占めており, 畜産物中に残留している可能性がより高い. そこで今回, 畜産物中のテトラサイクリン, オキシテトラサイクリン, クロルテトラサイクリン, ドキシサイクリンの一斉分析法の検討を行った. UPLC-MS/MS での測定条件を設定したところ, 検量線は 0.01~0.1 ppm の範囲で全ての物質で $R^2>0.999$ の直線性が得られた. 鶏肉に $N=5$ で 4 成分混合標準液を 0.1 ppm となるように添加回収試験を行った結果, 食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドライン(厚生労働省)の目標値(回収率 70~120%, 変動係数 15%未満)に適合していた.

健康危機事象のための食品中の抗凝固剤系殺鼠剤一斉分析法の検討

米田正樹・北岡洋平・樋上 絢・西山隆之・山下浩一・堀 重俊・岡山明子

平成 29 年 11 月 22 日（奈良市）第 54 回全国衛生化学技術協議会年会

健康危機管理体制強化の一環として国内外で使用されている抗凝固剤系殺鼠剤について一斉分析法を検討した。クマテトラリル、ワルファリン、ブロディファコウム、ブロマジオロン、ジフェチアロン、ピンドン、ダイファシノンおよびクロロファシノンの 8 種の抗凝固剤系殺鼠剤について UPLC-MS/MS での測定条件を設定したところ、1~10 ppb の範囲では全ての物質で $R^2 > 0.999$ の直線性が得られた。添加回収試験の結果、回収率（50~200%）および併行精度（ $RSD\% < 30$ ）とも、11 種全ての食品で平成 25 年 3 月 26 日付厚生労働省医薬食品安全部基準審査課事務連絡に示されている評価基準を達成した。希釈後の最終検液のマトリックス効果は、11 種の食品では影響がないと考えられている範囲（80~120% 以内）に概ね収まった。

レジオネラ属菌の迅速検査法の検討について ～事例発生時における実施報告～

吉田孝子・河口友里・辻本真弓・橋田みさを・内田美枝

平成 29 年 6 月 21 日（大和郡山市）平成 29 年度奈良県衛生関係職員研修会

レジオネラ属菌検査は、従来の培養法では結果判明まで 7~10 日要するため迅速検査法（遺伝子検査法）の有効性は高い。2016 年 10 月~2017 年 2 月にレジオネラ症患者が発生した 2 事例において、浴槽水、拭き取り検体について、迅速検査法 3 法（LAMP 法、qPCR 法、LC EMA-qPCR 法）を実施した。事例 1 では、培養法陽性の 6 検体は、迅速検査法 3 法で全て陽性であった。事例 2 では、培養法陽性の 7 検体は、LC EMA-qPCR 法、qPCR 法では全て陽性であったが、LAMP 法では 3 検体が陰性となり、検出下限、濁質成分、菌種、反応阻害物質のいずれかの影響が推測された。LC EMA-qPCR 法は、培養法との相関が最も高く、定量性においても、良好な結果（浴槽水： $R^2=0.8370$ 、拭き取り検体： $R^2=0.7634$ ）であり、レジオネラ症患者発生時における陽性スクリーニングとして有効であった。

拭き取り検体におけるレジオネラ属菌生菌迅速検査法の評価

吉田孝子・河口友里・辻本真弓・橋田みさを・内田美枝

平成 29 年 9 月 26 日（大阪府） 日本防菌防黴学会第 44 回年次大会

近年、レジオネラ属菌において、生菌のみを検出する迅速検査法 LC EMA-qPCR 法が開発された。浴槽水についての有効性は報告されているが、拭き取り検体については知見に乏しい。そこで、拭き取り検体 30 検体について、迅速検査法 2 法（LC EMA-qPCR 法、LAMP 法）と培養法をそれぞれ比較し評価した。LC EMA-qPCR 法と培養法の比較では、カットオフ値を 1 CFU/プース相当とした場合、菌数との相関は $R^2=0.7711$ 、感度は 100% (12/12)、特異度は 67% (12/18) となった。LAMP 法と培養法の比較では、感度は 58% (7/12)、特異度は 67% (12/18) であった。培養法でレジオネラ属菌陽性（10 CFU/プース以上）の検体は、LC EMA-qPCR 法では全て陽性であった。一方、LAMP 法では、低菌数の検体や、反応阻害物質の影響が推測された検体等で陰性となった。LC EMA-qPCR 法は、拭き取り検体についても、培養法陽性の結果を良好に反映する方法であった。

カルバペネム耐性腸内細菌科細菌検査における非定型事例について

吉田孝子・佐伯美由紀・田邊純子・橋田みさを・内田美枝

平成 29 年 11 月 17 日（大阪市） 平成 29 年度地方衛生研究所全国協議会近畿支部細菌部会研究会

2015 年度に、検査体制の構築を目的とし、県内 4 医療機関における臨床分離株 33 株について、 β -ラクタマーゼ産生性確認試験（ディスク法）及び薬剤耐性遺伝子の保有状況の確認（PCR 法）を行った。その結果、1 株は PCR 法で IMP-1 型を検出したが、ディスク法では SMA ディスクの影響が確認できず、遺伝子型の結果と、表現型による結果が不一致となった。そこで、薬剤耐性遺伝子の確認のため、IMP-1 型シーケンス用プライマーで PCR を実施したところ、本来確認できる 741bp にバンドはなく、1500bp 付近にバンドを確認した。複数のプライマーを用い、さらに塩基配列を確認したところ、*bla*_{IMP} の内部に 700bp 相当の挿入配列が存在していることが判明した。この結果により、当該菌株は *bla*_{IMP} の内部に挿入配列が存在したため PCR にて IMP-1 型を検出したが、カルバペネマーゼを産生しない菌株と考えられた。この事例より、表現型と遺伝子型の結果を、両方併せて確認をすることの重要性を再認識することになった。

奈良県におけるライノウイルスの検出状況

千葉翔子・稲田眞知・尾西美咲・藤谷美沙子・中野 守・榮井 毅

平成 29 年 11 月 16 日（橿原市） 第 38 回奈良県公衆衛生学会

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

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

奈良県保健研究センター年報投稿規定

1. 奈良県保健研究センター年報は、本研究センターにおいて行った研究・調査の業績を掲載する。
2. 投稿者は、本研究センター職員とする。ただし、共同研究者はこの制限を受けない。
3. 原稿の種類と内容

1) 原著

調査研究などで新知見を含むまとめたものは、原著として投稿できる。記述の順は、表題（和文、欧文）、著者名（和文、欧文）、要旨（200字程度）、緒言、方法、結果、考察、文献とする。

2) 報告

調査研究、事業に係る技術等検討などでまとめておく必要のあるものは、報告として投稿できる。記述の順は、表題（和文、欧文）、著者名（和文、欧文）、緒言、方法、結果、考察、文献とする。

3) 資料

事業に係る技術等検討及び特に記載してまとめておく必要のあるものは、資料として投稿できる。記述の順は、表題（和文、欧文）、著者名（和文、欧文）、本文とする。本文には緒言、方法、結果、考察に相当する内容を含め、体裁にとらわれず自由に記述することができる。資料の長さは刷り上り2ページを超えない。

4) 他誌掲載論文の要旨

他誌に掲載した論文の内容を紹介する。記述の順は、表題、著者名、掲載誌名、要旨（欧文も可）とする。

5) 研究発表の抄録

学会（研究会を含む）に発表した内容を紹介する。記述の順は、表題、発表者名、学会名（研究会名）、抄録（欧文も可）とする。抄録の内容は400字以内（欧文は10行以内）にまとめる。

4. 原稿作成要領

1) 執筆要領

- (1) 本文は日本語を用いる。

本文中の和文フォント（漢字・ひらがな・カタカナ）はMS明朝（全角）、英数フォント（数字・アルファベット）はCentury（半角）を用いる。フォントサイズは10ポイントを用いる。

- (2) 原稿はワープロソフトで作成し、句読点は「，」「．」（全角）とする。

- (3) 原稿はA4版用紙を使用する。

表題（和文、欧文）、著者名（和文、欧文）、要旨は、1行46文字、緒言以下は、1行24文字、1頁46行の2段組とする。表題は12ポイントを用いる。

- (4) 見出し等の番号は以下のように記載する。頭出しの数字、カッコ、ドットは半角を用い、見出し文との間に半角スペースを入れる。

1. Arial（半角）・・・見出し

1) Arial（半角）・・・小見出し

(1) Century（半角）、① MS明朝（全角）、i) Century（半角）・・・細分見出し

見出し文および小見出し文の英数フォントはArial（半角）、細分見出し文の英数フォントはCentury（半角）を用いる。

- (5) 単位は国際的に慣用されているものを使用し、数字と単位の間は半角スペースを1つ挿入する。

ただし％、℃はMS明朝（全角）を用い、記号と数字の間はスペースを入れない。

2) 表題、著者名、所属機関名

- (1) 表題の和文フォントはMSゴシック（全角）とし、英数フォントはArial（半角）とする。表題の欧文フォントはCentury（半角）とし、冠詞、前置詞・副詞、接続詞以外の単語は第1字目を大文字にする。

- (2) 著者名の欧文は、名は最初の1文字のみを大文字とし、姓はすべて大文字とする。

- (3) 本研究センター職員以外の著者名については、その右肩に「*、**」の記号をつけ、それぞれの所属機

関名をその頁の最下段に脚注として記載する。

3) 図・表および写真

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

5) 脚注および引用文献

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

5. 原稿の提出について

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

6. 審査

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

7. 校正

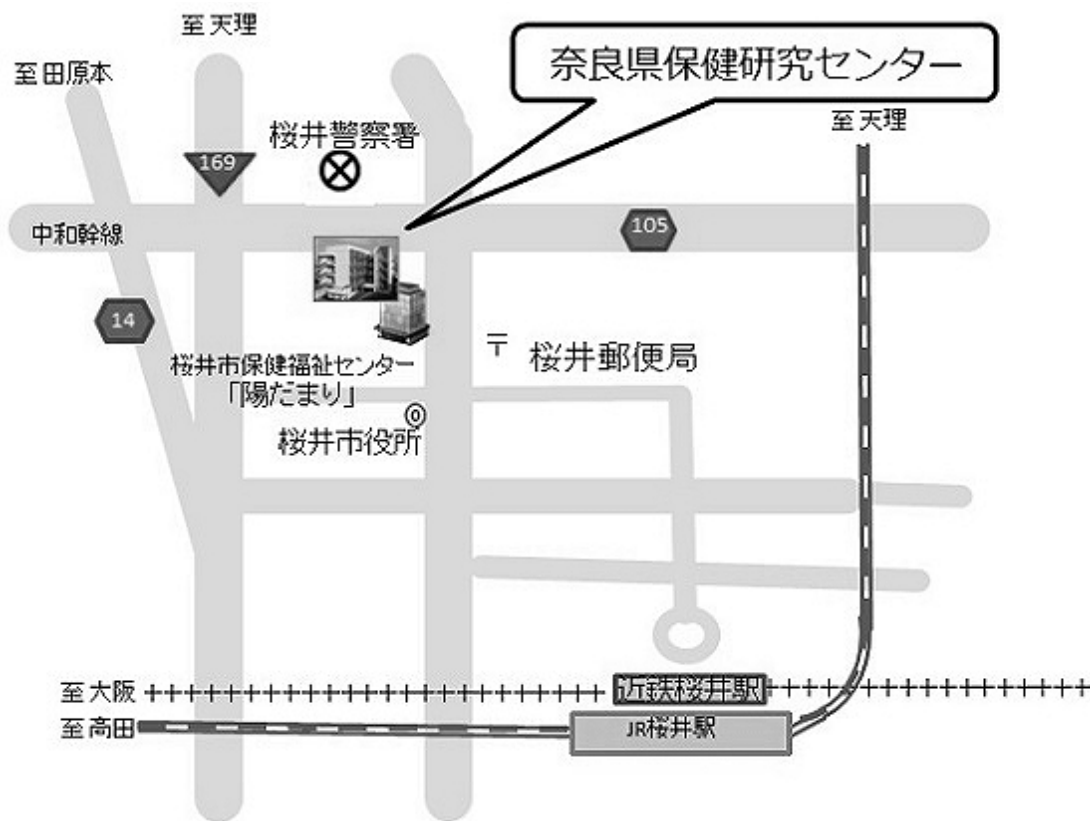
校正はすべて著者の責任とするが、編集委員会は編集の都合上変更を求めることができる。

8. その他

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

9. 附則

- 1) この奈良県保健研究センター年報投稿規定は、平成19年4月12日から施行(改正)する。
- 2) この規定は、平成25年4月1日に改正する。
- 3) この規定は、平成28年6月1日に改正する。
- 4) この規定は、平成29年5月16日に改正する。
- 5) この規定は、平成30年5月15日に改正する。



【編集委員】

堀 重 俊 (委員長)
 榮 井 毅
 立 本 行 江
 辻 本 真 弓
 藤 谷 美 沙 子

奈良県保健研究センター年報

第52号 平成29年度(2017年)

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

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

