

3 調査研究

調査研究テーマ一覧

【 】内は参照ページ

- 1 北九州市内の粉じん形状及び重金属等の含有量調査
- 2 光化学オキシダントと粒子状物質等の汚染特性解明に関する研究【63 ページ】
国立環境研究所 C 型共同研究 H19～21 年度
- 3 光化学オキシダントと硫酸イオンの相関に関する研究
一部国立環境研究所 C 型共同研究 H19～21 年度
- 4 光化学オキシダント生成に係る揮発性有機化合物の寄与に関する研究【49 ページ, 56 ページ】
- 5 化学物質環境実態調査【63 ページ】
環境省受託
- 6 大気中微小粒子状物質（PM_{2.5}）の調査
- 7 大気中の化学物質一斉分析調査
- 8 動物用医薬品の高速液体クロマトグラフ質量分析計（LC/MS/MS）を用いた一斉分析法の研究
【25 ページ】
- 9 食品中の残留農薬等試験法の研究
- 10 加工食品中に含まれる微量農薬の分析法に関する研究【64 ページ】
- 11 残留農薬に関するポジティブリスト制度導入に係る新規分析法開発・検証【67 ページ】
厚生労働省受託 国立医薬品食品衛生研究所、広島県立総合技術研究所共同研究
- 12 食品中残留農薬に関する一日摂取量実態調査【68 ページ】
厚生労働省受託
- 13 食品中ヒスタミン迅速試験法の確立【70 ページ】
- 14 麻痺性貝毒の化学的解明【72 ページ】
- 15 PCR 法を用いた細菌性食中毒検査の迅速化に関する研究【27 ページ】
- 16 食品由来感染症調査における分子疫学手法に関する研究【29 ページ, 74 ページ】
国立感染研究所、九州地区地方衛生研究所他 13 機関共同研究
- 17 本市における新型インフルエンザウイルスの性状に関する調査【31 ページ, 34 ページ】

動物用医薬品等のLC/MS/MSを用いた一斉分析法の検討

森下正人

1 はじめに

平成18年5月29日より食品のポジティブリスト制度が導入された。動物用医薬品等においても、この制度により、それまでの31から250品目以上に基準値が設けられることとなり、効率的、かつ迅速に分析する手法が必要となった。

動物用医薬品等の分析においては、厚生労働省平成17年1月24日付け食安発0124001号の「HPLCによる動物用医薬品等の一斉試験法I（畜水産物）」が通知され、LC/MSの測定イオン等も示された。

そこで今回、通知法に準拠した方法で、14品目の動物用医薬品等について、感度及び選択性が高いことから多成分一斉分析に適している高速液体クロマトグラフ質量分析計（LC/MS/MS）を用いて、当所で行政検査を実施している豚肉、魚、鶏卵、鶏肉及び生乳を対象として添加回収試験を行った。

2 試験の概要

(1) 検査試料

鶏肉、豚肉、魚（ぶり、ひらめ、サーモン）、鶏卵、生乳

(2) 検査対象物質

対象とした合成抗菌剤は、厚労省依頼の有害物質モニタリング検査により実施している下記の13項目を選定した。

スルファメラジン、スルファジミジン、スルファモノメトキシシ、スルファジメトキシシ、スルファキノキサリン、オルメトプリム、トリメトプリム、ピリメタミン、オキシソリン酸、チアンフェニコール、ナイカルバジン、フルベンダゾール、チアベンダゾール(及び5-ヒドロキシチアベンダゾール)計14種類(13品目)

(3) 試験溶液の調整及び方法

検査試験溶液は、通知法に準拠して試料を調整し、LC/MS/MSで測定した。

3 結果

生乳、豚肉、魚（ぶり、ひらめ、サーモン）及び鶏卵における添加回収試験結果を表1にまとめた。

生乳では、平均回収率が70～120%の範囲に入ったものは、オルメトプリム、ピリメタミン、チアベンダゾールであり、相対標準偏差が20%を超えたものはなかった。

豚肉では、平均回収率が70～120%の範囲からはずれなかったのはスルファメラジン、スルファジミジン、スルファモノメトキシシ、ピリメタミン、チアベンダゾール-OHであり、相対標準偏差が20%を超えたものはナイカルバジンであった。

魚（サーモン）では、平均回収率が70～120%の範囲に入ったものは、スルファジメトキシシ、オキシソリン酸、チアベンダゾール-OHであり、相対標準偏差が20%を超えたものはなかった。

魚（ぶり）では、平均回収率が70～120%の範囲からはずれなかったのはスルファジミジン、スルファジメトキシシ、トリメトプリム、ピリメタミン、ナイカルバジンであり、相対標準偏差が20%を超えたものはなかった。

魚（ひらめ）では、平均回収率が70～120%の範囲からはずれなかったのはスルファジミジン、オルメトプリム、トリメトプリム、ピリメタミン、ナイカルバジンであり、相対標準偏差が20%を超えたものはなかった。

鶏卵では、平均回収率が70～120%の範囲に入ったものは、オルメトプリム、トリメトプリム、フルベンダゾールであり、相対標準偏差が20%を超えたものはなかった。

4 まとめ

本試験法による添加回収率が70～120%の条件を満たしていないものがあるため、現段階では定量試験に適しているとはいえないが、従来のフォトダイオードアレイ（UV波長）による一斉分析法に比べて、検出感度が高い（約10倍）ことから、動物用医薬品等のスクリーニング試験として採用し、定量については個別法又は告示法で実施するとこで対応して行きたい。

今後は、(1) 測定可能な検査品目を増やす、(2) マトリックスの影響を受けやすいものについてマトリックスで希釈した標準液での定

量、さらには(3)マトリックスを除去する精製法等、などの課題がある。

表1 各項目の平均回収率及び相対標準偏差

物質名	平均回収率 (%)						相対標準偏差 (%)					
	生乳	豚肉	魚(サモ ン)	魚(ブ リ)	魚(ヒラ メ)	鶏卵	生乳	豚肉	魚(サ モン)	魚(ブ リ)	魚(ヒラ メ)	鶏卵
スルファメラ ジン	51	63	38	70	70	46	20	7.1	18	6.9	3.8	3.3
スルファジミ ジン	47	58	69	65	65	53	20	4.8	14	9.2	5.5	5.6
スルファモノ メトキシ ン	51	52	64	82	90	45	19	6.1	7.5	12	2.3	5.4
スルファジメ トキシ ン	56	76	70	68	78	55	16	8.4	13	7.6	1.7	6.1
スルファキノ キサリ ン	53	98	68	72	79	57	17	4.4	11	11	1.3	5
オルメトプリ ム	87	110	64	71	61	73	11	12	12	4.7	3.4	7.3
トリメトプリ ム	54	130	60	52	46	72	8	9.9	16	2.1	4.5	8.4
ピリメタミ ン	73	48	55	54	48	67	12	20	8.1	3	4.3	6
オキシリニ ック酸	53	80	72	110	100	54	11	6.3	14	4.8	6.5	9.3
チアンフェ ニコ ール	58	78	68	130	100	66	18	16	9.4	8.4	7.7	8.8
ナイカルバ ジ ン	60	70	63	60	62	27	10	31	12	2.7	3.4	17
フルベンザ ゾ ール	65	75	65	110	120	80	11	9.7	12	7.7	4.3	9.6
チアベンザ ゾ ール	93	100	63	79	79	68	10	5.5	5.3	6.3	10	8.7
チアベンザ ゾ ール-OH	120	59	110	120	130	40	8.3	15	11	7.2	3.8	14

PCR法を用いた細菌性食中毒検査の迅速化に関する検討

久保田 勉、清水寧、下原悦子

1 はじめに

食中毒疑い事例が発生した場合、業者指導や食品回収など行政対応を的確に進めるために、迅速な原因菌の同定が求められる。しかし現在の標準法である培養法では、原因菌の同定にかなりの日数を要する。そこで検査期間を短縮するため、培養法とPCR法を比較検討した。PCR法は昨年度の結果より効率的な検出が望める増菌培養液を検体として用いた。

2 試験概要

(1) 材料

平成21年度中に発生した食中毒事例の検体

ア、カンピロバクター

- ・飲食店の食中毒事例より患者便5件
- ・飲食店の苦情事例より食材1件

イ、サルモネラ

- ・飲食店の食中毒事例より患者便4件と従業員便6件
- ・グループホームの食中毒事例より有症者便10件と無症者便7件
- ・障害者施設の食中毒事例より食材1件

計 28 検体

(2) 方法

ア、遺伝子(DNA)抽出

カンピロバクターはプレストン培地培養液を、サルモネラはラバポート培地培養液を用い市販の抽出キットを用いた。

イ、プライマー

- ・Campylobacter jejuni, coli については依頼して合成したものを使用した。
- ・サルモネラ についてはTakara invA遺伝子検出用 SIN1/2 を使用した。

ウ、反応液組成とPCR条件

(サルモネラ)

キットの仕様どおりに行った。

(カンピロバクター)

反応液組成

×10Buffer 5 μ l、 dNTPMixture 5 μ l、 Primer (jejuni F/R、 Coli F/R) 各0.5 μ l

Template DNA 5 μ l、 Takara Taq 0.25 μ l、 DW 33,75 μ l Total 50 μ l

PCR条件

熱変性 94 $^{\circ}$ C 1min、 アニーリング 60 $^{\circ}$ C 1min、 伸長 72 $^{\circ}$ C 1min 25Cycle

3 結果

(1) カンピロバクター

培養法では6件の陽性が、PCRでもすべて陽性であった。

(2) サルモネラ

培養法では15件の陽性がPCRでもすべて陽性であった。

培養法では13件の陰性が12件はPCRも陰性、1件がPCR陽性であった。

表1 培養法とPCR法による原因菌の検出状況

	事例1	事例2	事例3	事例4	事例5	計
	カンピロバクター	サルモネラ	サルモネラ	サルモネラ	カンピロバクター	
検体数	5	17	10	1	1	34

培養法	5	1 1	3	1	1	2 1
PCR法	5	1 2	3	1	1	2 2

4 まとめ

培養法で陽性であったものについてはPCR法ではカンピロバクターについて100%、サルモネラについても100%の陽性を示し増菌培地からPCR法の有効性が示唆された。また培養法で陰性であったものについては1件を除いてPCR法でも陰性であった。この1件は食中毒事件の患者便であり、培養法に比べて鋭敏な感度を持つPCR法の特徴が影響したのではと推察される。

食品由来感染症調査における分子疫学手法に関する研究

「腸管出血性大腸菌感染 O157:H7 (VT1&2 陽性) を原因とする食中毒事件について」

(IS-printing System の分子疫学的解析法としての有用性について)

久保田 勉、清水寧、村瀬浩太郎、下原悦子

1 要約

平成 21 年 5 月に大腸菌 O157:H7(VT1&2 陽性)を原因とする 10 件の腸管出血性大腸菌感染症の届出が相次ぎ、PFGE 法により同一由来の菌であることが分かり、疫学調査を加味することにより同一感染源と判明した。また、IS-printing System を用いた解析でも同様の結果となった。

2 方法と結果

①供試菌株

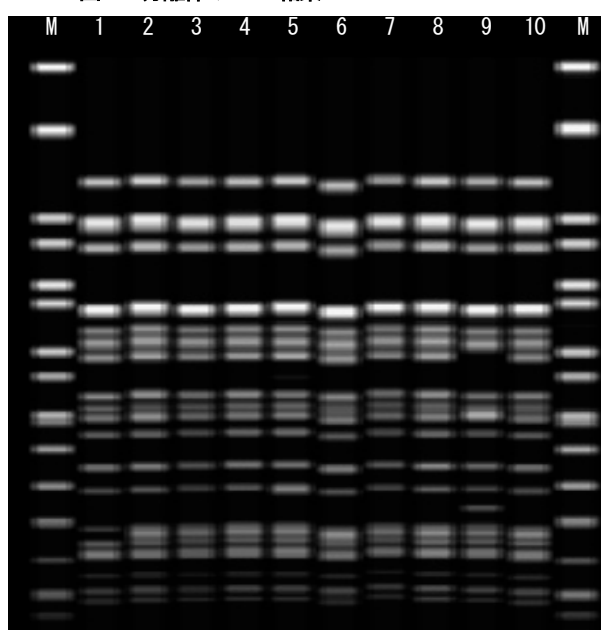
平成 21 年 5 月 15 日から 26 日の間に発症し、腸管出血性大腸菌感染症として届け出があった患者 10 名からの O157 分離株 10 株を供試菌株とした。なお、これらはすべて民間の検査機関で分離され、O 型別と毒素型が判明した菌株で、国立感染症研究所に送付するため、保健所が分与を受けたものである。

②PFGE

国立感染症研究所の方法をもとに作成した「大腸菌のパルスフィールドゲル電気泳動法による解析 九州ブロックマニュアル(2005)」により実施した。制限酵素は *Xba* I を用い、泳動は電圧 6.0V/cm、パルスタイム 2.2~54.2 秒、バッファー温度 14°C、泳動時間 19 時間の条件で行った。患者 10 名の O157 分離株の PFGE の結果を図 1 に示す。

10 株のうち、1 株(No. 9)を除く 9 株はほぼ同じパターンであった。No. 9 の株は、他の株とバンド 2 本の位置の違いが見られた。PFGE 解析の結果からは、10 株が同一由来であることが示唆された。

図 1 分離株の PFGE 結果

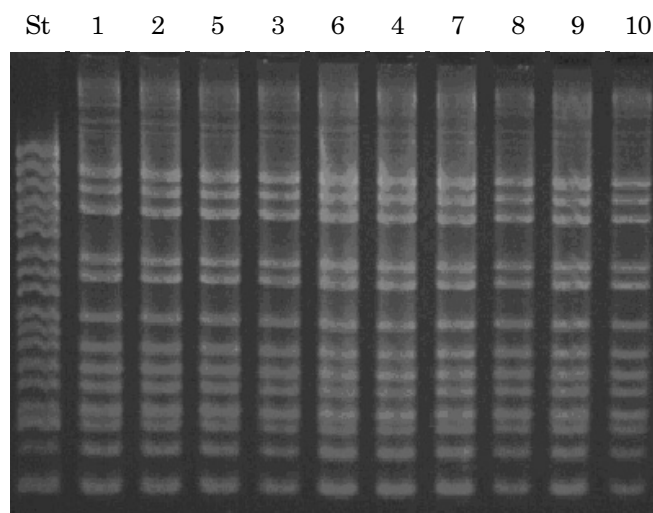


③IS-printing System

東洋紡績(株)の試薬キット「IS-printing System」(Ver. 2)を用い、添付のプロトコールに準じて実施した。各菌株の遺伝子の増幅産物をアガロースゲル電気泳動した後、得られたバンドの出現の有無を 2 進数(1, 0)で表現し、さらに 10 進数に変換して 11 桁の挿入配列の組み合わせに固有の ID コード番号を付与した。

結果は、図 2、図 3 と表 2 に示すように 10 名全員が同じ ID コード番号「56643812046」となった。

図 2 患者分離株の IS-printing System 結果(1st primer set)



本市における新型インフルエンザウイルスの性状について（その1）

—新型インフルエンザウイルスの検出状況について—

河辺直美、村瀬浩太郎、梨田実、下原悦子

1 はじめに

平成21年度は、例年と異なり、夏季にもかかわらずインフルエンザの流行期に入った。これは、平成21年5月以降各地で検出された新型インフルエンザウイルス（A/H1N1pdm）（以下AH1pdm）の流行によるもので、北九州市でも全国の流行に合わせるように患者報告数が増加した。患者報告数の増加に伴い、検査件数も増加し始め、10月に100件を超え、11月にピークとなった。流行初期の全数検査、その後の検査対象者の変更に合わせて、リアルタイムPCR検査およびウイルス分離を実施したので、検出状況および分離ウイルスの性状について、その概要を報告する。

2 内容

(1) 市内のインフルエンザ発生状況

感染症サーベイランスの定点あたりの週別インフルエンザの患者報告数について、平成21年第32週（8月3日～8月9日）～平成22年第10週（3月8日～3月14日）までの推移を調べた。

(2) ウイルス検査

① リアルタイムPCR検査

搬入された咽頭、鼻腔拭い液等について「病原体検出マニュアル H1N1 新型インフルエンザ」（感染研）に従い、リアルタイムPCR検査を行った。咽頭、鼻腔拭い液等は3,000rpm、15分間遠心を行った。遠心上清からRNA抽出キット（QIAmp Viral RNA Mini Kit：QIAGEN社）でRNAを抽出し、リアルタイムRT-PCR（TaqMan Probe法）により、A型インフルエンザウイルスのM遺伝子およびA/H1pdmのHA遺伝子の検出を同時に行い、A/H1pdmの同定を行った。A型インフルエンザウイルスが陽性でA/H1N1pdmが陰性の場合、One Step RT-PCR法により季節型（A/H1またはH3）ウイルスHA遺伝子の検出を行い、同定を行った。

② ウイルス分離

平成21年9月～平成22年3月31日までに搬入された病原体定点からの検体および重症化、死亡例の検体について、培養細胞（MDCK）を用いてウイルス分離を行い、CPEが観察されない場合は3代まで継代培養を行った。分離したA/H1pdm株について同定・抗原性解析を行った。

③ 同定・抗原性解析

分離したA/H1pdm株について、ワクチン株のA/California/7/2009株に対する抗原性をフェレット感染抗血清（感染研配付）と0.6%七面鳥血球を用いた赤血球凝集抑制試験により、同定・抗原性解析を行った。

3 結果および考察

(1) 市内のインフルエンザ発生および検出状況

6月から日本各地で患者発生が続き、異例ではあるが、夏場のインフルエンザ流行となった。市内のインフルエンザ週別患者報告数（感染症サーベイランスの患者報告定点あたり）の推移をみると、市内でも第32週（8月3日～8月9日）に定点あたりの患者報告数が流行開始の指標である1.0を超え、第48週（11月23日～29日）に102.5と最も多くなった（図1）。第48週以降は、患者報告数は減少し、平成22年第8週（2月22日～28日）現在で0.54となり、流行は、ほぼ収まったが、AH1pdmは3月になっても検出された。

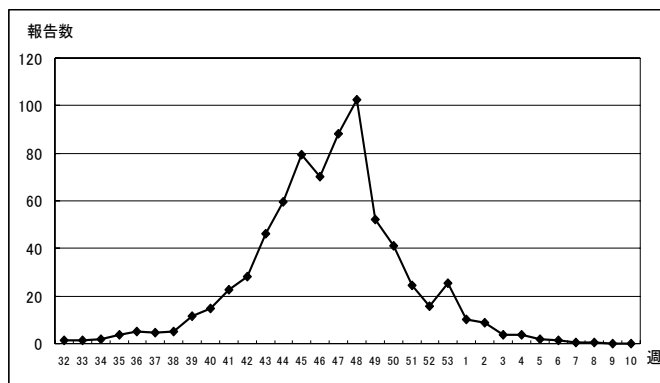


図1 定点あたりの週別インフルエンザ患者報告数の推移

市内では、最初の検体が搬入された5月19日の検査以後、A/H3（香港型）が11件（/22件）検出され、6月17日に初めてAH1pdmが確認された。それ以降、AH1pdmが優位となり、8月に3件のA/H3（香港型）が3件検出された以外はAH1pdmであった。全国のウイルス検出報告から第24週（6月8日～14日）頃より明らかにAH1pdmが優位となったことから、市内でも7月以降のインフルエンザ患者のほとんどは新型インフルエンザとみなされる。

(2) 検査件数およびウイルス分離状況

平成21年5月～平成22年3月の561検体（咽頭、鼻腔拭い液等）について検査を行い、リアルタイムPCRで396件、ウイルス分離で9件、合計405件（検出率72%）のAH1pdmを検出した（表1）。また、5月（8件）、6月（3件）、8月（3件）にA/H3（香港型）ウイルスを合計14件検出したが、それ以降、AH1pdm以外検出されなかった。

検査開始後、AH1pdmの検出はリアルタイムPCRでのみ実施していたが、9月29日以降、感染症サーベイランスの病原体定点からの検体については、リアルタイムPCRとウイルス分離（22検体：分離10株）を併用し、さらに11月17日以降は、ウイルス分離（15検体：分離9株）のみを実施することとし、合計AH1pdm19株分離した。また、重症化、死亡例の6検体（うち3検体は、同一者の検体）については、リアルタイムPCRとウイルス分離を実施し、4株（うち3株は、同一者から分離）分離した。

表1 インフルエンザ検査検体数および検査結果

		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	PCR	12	25	79	70	46	101	114	81	10	4	4	546
	ウイルス分離	0	0	0	0	(5)	(13)	5(6)	6	4(1)	(3)	0	15(28)
	合計	12	25	79	70	46	101	119	87	14	4	4	561
検査結果	AH1pdm/PCR	0	5	57	57	39	80	88	54	9	4	3	396
	A/H3	8	3	0	3	0	0	0	0	0	0	0	14
	陰性	4	17	22	10	7	21	27	31	2	0	1	142
	AH1pdm/分離	0	0	0	0	(2)	(7)	4(2)	2	3(0)	0(3)	0	9(14)

検体数は、週別に集計し、月ごとに合計した。 0 内は、PCRも実施した件数

(3) ウイルス分離状況

感染症サーベイランスの病原体定点からの検体および重症化、死亡例の検体43検体（うち3件は同一者）について、MDCK細胞でウイルス分離を実施した。その結果、AH1pdm23株（うち3株は同一者）を分離した。

43検体のうちリアルタイムPCRによりAH1pdmを検出した24検体について、Ct値とウイルス分離状況を調べた結果（表2）、Ct値が小さくなるにつれ分離されやすく、Ct値<30での分離率は89%（8/9）、Ct値≥30での分離率は40%（6/15）であり、Ct値30を超えるとウイルス分離率が約半分になった。

表2 Ct値とウイルス分離状況

No.	検体No.	Ct値	ウイルス分離	No.	検体No.	Ct値	ウイルス分離
1	731	24	+	13	863	30	—
2	739	25	+	14	1246	30	—
3	849	25	—	15	1329*	31	+
4	694	26	+	16	844	31	—
5	911	26	+	17	846	32	—
6	935	27	+	18	875	32	—
7	727	28	+	19	1328*	33	+
8	829	28	+	20	680	34	+
9	1327*	29	+	21	744	36	+
10	728	30	+	22	783	36	—
11	729	30	+	23	910	38	—
12	845	30	—	24	671	38	—

*：同一者の検体（採取日、採取個所が異なる）

また、MDCK細胞に接種後、3日目からウイルスによる細胞変性が広がる場合が大半であったことから、季節性インフルエンザウイルス同様にMDCK細胞に対して感受性が高いことがわかった。

一方、PCR検査で陰性検体からのウイルスを分離事例¹⁾があることから、少しでも分離の可能性を高くするため、PCR検査で陰性の検体のうち、インフルエンザ簡易検査でA型陽性（協力病院の検査結果）の11検体を選定し、ウイルス分離を試みたが、すべて陰性であった。

(4) 抗原性解析

分離した AH1pdm について、感染研より配付された抗血清を使い、赤血球凝集抑制試験による抗原解析を行った結果（表 3）、ワクチン株 A/California/7/2009 株の抗血清に対して、同じか 4 倍以内の抗原変異に収まっており、抗原性はワクチン株に類似していた。季節性 A/H1N1 ウイルス A/ Brisbane/59/2007 に対する抗血清とは全く反応せず、抗原性が大きく異なっていた。

同じ患者から分離された A/北九州/5/2010 株および A/北九州/6/2010 株については、H275Y 耐性株マーカーが同定された。抗原性解析について、A/北九州/5/2010 株はホモ価から 4 倍程度減少がみられたが、これについては、国内で A/California/7/2009 抗血清のホモ価から 4 倍程度減少した分離株が数株見つかっており、MDCK 細胞での継代により起こった変異と考えられる²⁾ ことから、A/北九州/5/2010 株も同様の変異と考えられた。

表 3 赤血球凝集抑制試験による抗原解析（一部の株を抜粋）

株名	抗血清			
	Brisbane/59/2007 (H1N1)	California/07/2009 (H1N1)pdm		
Brisbane/59/2007	640	<10	<10	<10
California/07/2009	<10	1280	2560	5120
A/北九州/13/2009	<10	1280		
A/北九州/14/2009	—	1280		
A/北九州/15/2009	—	1280		
A/北九州/16/2009	—	1280		
A/北九州/18/2009	—	1280		
A/北九州/19/2009	—	1280		
A/北九州/21/2009	<10		2560	
A/北九州/25/2009	<10		2560	
A/北九州/26/2009	<10		2560	
A/北九州/28/2009	<10			5120
A/北九州/1/2010	<10		2560	
A/北九州/3/2010	<10		1280	
A/北九州/5/2010	<10		640	
A/北九州/6/2010	<10		2560	

4 まとめ

例年は冬季に流行する季節性インフルエンザと異なり、平成 21 年度は、夏季に新型インフルエンザによる流行が始まり、第 48 週にピークとなった。新型インフルエンザ疑いの患者から採取された 561 検体（平成 21 年 5 月～平成 22 年 3 月）からリアルタイム PCR または細胞培養で AH1pdm を 404 件検出した。これらの検体から 23 株の AH1pdm ウイルスを分離し、抗原性解析を行った結果、いずれも新型インフルエンザのワクチン株に類似していた。また、季節性インフルエンザウイルス同様に MDCK 細胞に対して感受性が高いことがわかった。

市内でも、平成 22 年 2 月に薬剤耐性マーカー陽性株が検出されたことから、季節性 A/H1N1 耐性株と AH1pdm との間で遺伝子交雑が起これば、感染伝播力を持った AH1pdm 耐性株が発生する可能性があり、今後もインフルエンザの発生動向に注意していく必要がある。

参考文献

- 1) 感染研感染症情報センター：＜速報＞ウイルス分離により確認された新型インフルエンザの国内初症例について—横浜市、病原微生物検出情報 Vol. 30(9)、239 (2009)
- 2) 感染研感染症情報センター：＜特集関連情報＞2008/09 シーズンの季節性および新型インフルエンザ分離株の解析、病原微生物検出情報 Vol. 30(11)、3-13 (2009)

本市における新型インフルエンザウイルスの性状について（その2） —新型インフルエンザウイルスのオセルタミビル耐性遺伝子の解析について—

村瀬浩太郎、河辺直美、梨田実、下原悦子

1 はじめに

平成21年4月にメキシコ、北米を中心に発生した新型インフルエンザが、日本を含む世界各地に広がった。国内においては、平成21年5月以降各地で新型インフルエンザウイルス（A/H1N1pdm）（以下AH1pdm）が検出された。例年と異なり、8月中旬には夏季にもかかわらずインフルエンザの流行期に入り、分離株の約99%がAH1pdm株となっている¹⁾。

北九州市でもこれに合わせるように流行が始まり、患者報告数が第48週（11月23日～29日）にピークとなった。AH1pdm株はアマンタジンに耐性であることが知られており、このため、新型インフルエンザの予防および治療にはオセルタミビルおよびザナミビルが使われている¹⁾。わが国は、オセルタミビルの使用が多く、AH1pdm耐性株が最も発生しやすい環境にあるため、耐性株の発生状況や、その感染拡大の有無を把握し、適直情報を共有することは重要である。

そこで、インフルエンザの患者の検体からウイルスの分離を行い、分離したAH1pdm株についてオセルタミビル耐性遺伝子の解析を行ったので報告する。

2 材料と方法

(1) 検査材料

平成21年9月～平成22年3月までにインフルエンザ疑いの患者から採取した検体（咽頭、鼻腔拭液等）43検体について、細胞培養（MDCK）でウイルス分離を行った。分離した23株について、フェレット感染抗血清（感染研配付）と0.6%七面鳥血球を用いた赤血球凝集抑制試験により、AH1pdmと同定したウイルス培養上清液を検査材料とした。AH1pdm同定株については、抗原解析も実施した。

(2) 検査方法

「新型インフルエンザ薬剤耐性株サーベイランス A/H1N1pdm-NA 遺伝子解析実験プロトコール」（感染研：平成21年9月4日）に従って、ノイラミニダーゼ（NA）遺伝子上のオセルタミビル耐性株マーカーの有無を部分シーケンス法により同定した。なお、部分シーケンス法に用いるプライマーおよび試薬は感染研から配付されたものを使用した。

ウイルス培養液は、3,000rpm、15分間遠心を行い、その上清からRNA抽出キット（QIAmp Viral RNA Mini Kit:QIAGEN社）を用いてRNAを抽出した。One Step RNA PCR Kit (AMV) (TaKaRa)により、swineN1-676-694FおよびswineN1-1130-1111Rプライマーを用いて、NA遺伝子の一部をPCRで増幅後、増幅産物のシーケンシングを行った。

増幅産物はQIAquick（QIAGEN社）で精製し、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems社)により、シーケンス反応を行った。反応液をBigDye Xterminator (Applied Biosystems社)で精製後、ジェネティックアナライザーABI3130xl (Applied Biosystems社)により塩基配列を決定した。

(3) オセルタミビル耐性株マーカーの同定

NA遺伝子上のオセルタミビル耐性株マーカーである275番目のアミノ酸がヒスチジンからチロシン（H275Y）への変化の有無について部分シーケンス法により確認した。

NA遺伝子上のH275Yマーカー（+）が同定された場合は、「新型インフルエンザ A/H1N1pdm 株の抗インフルエンザ薬剤耐性サーベイランス実施要領」（平成21年9月4日：感染研）に従い、分離株を感染研へ送付した。この株について、感染研が薬剤感受性試験を実施した。

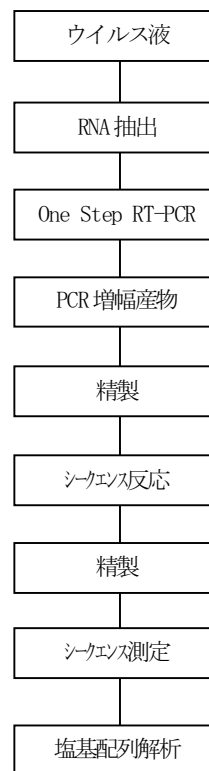


図1 検査概略図

3 検査結果および考察

分離した AH1pdm23 株について、感染研より配付された抗血清を使い、赤血球凝集抑制試験により同定・抗原解析を行った結果、ワクチン株 A/California/7/2009 株の抗血清に対して、同じか4倍以内の抗原変異に収まっており、抗原性はワクチン株に類似していた。

(1) オセルタミビル耐性株マーカー

AH1pdm 23 株について NA 遺伝子上の H275Y 耐性株マーカーの有無を部分シーケンス法により同定した結果、3 株（同一者から分離）から H275Y マーカー（+）が同定され、福岡県内で 2 例目（全国で 62 例目：平成 22 年 3 月 11 日現在）であった。これらの株は、オセルタミビル内服約 1 ヶ月後に血液疾患患者の咽頭拭い液および気管吸引液から分離された。

H275Y 耐性株マーカー（+）が同定された 1 株について、化学発光法による薬剤感受性試験（感染研実施）を行った。その結果、H275Y マーカーを持たない A/California/07/2009pdm（ワクチン株）に比べ、オセルタミビルに対して約 240 倍感受性が低下していた（ザナミビルに対しては感受性を保持していた）ことから、オセルタミビル耐性株であることが確認された。

この血液疾患患者については、約 1 ヶ月前（オセルタミビル内服 10 日後）に咽頭ぬぐい液を検査（PCR で AH1pdm（+）、ウイルス分離（-））していた。そこで、この咽頭ぬぐい液から増幅した NA 遺伝子について耐性株マーカーを調べた結果、H275Y であったことが確認された。このことから、血液疾患により免疫機能が低下していた患者体内で発生した可能性のあるオセルタミビル耐性 AH1pdm 株が約 1 ヶ月間、持続感染していたと考えられた。

国内の耐性株は、ザナミビルに対しては感受性を保持しており、ワクチン株と抗原的に類似していることから、今期ワクチンは耐性株に対しても有効であると考えられている¹⁾。全国的にも AH1pdm 耐性株の大半は、感染者への濃厚接触後のオセルタミビル予防投与中か治療投与中に検出されており、薬剤の選択圧によって発生したと考えられている。また、免疫力の低下した患者は、薬剤服用中でも体内のウイルスが減りにくく、薬剤の選択圧を受けやすいことから、耐性株が発生しやすい環境であることが知られている¹⁾。そのため、今回分離した耐性株も、オセルタミビル治療投与中に血液疾患患者から分離されていること、周囲へのオセルタミビル耐性を疑う感染も確認されていないことから、ヒト-ヒト感染によるものでないと考えられた。

表1 分離株の NA 遺伝子コード領域におけるアミノ酸置換（塩基置換）の比較

株名	アミノ酸番号	243	248	257	267	275	286	294	301	305	331
California/07/2009pdm	アミノ酸	T	N	R	V	H	S	D	R	S	K
	塩基配列	ACC	AAT	AGA	GTC	CAC	AGT	GAT	CGA	TCT	AAG
1 北九州/20/2009	アミノ酸	T	<u>D</u>								
	塩基配列	<u>ACA</u>	<u>GAT</u>								
2 北九州/24/2009	アミノ酸		<u>D</u>								<u>E</u>
	塩基配列		<u>GAT</u>								<u>GAG</u>
3 北九州/25/2009	アミノ酸		<u>D</u>				<u>N</u>				
	塩基配列		<u>GAT</u>				<u>AAT</u>				
4 北九州/27/2009	アミノ酸		<u>D</u>					D			
	塩基配列		<u>GAT</u>					<u>GAC</u>			
5 北九州/29/2009	アミノ酸		<u>D</u>						R		
	塩基配列		<u>GAT</u>						<u>CGG</u>		
6 北九州/1/2010	アミノ酸		<u>D</u>						R		
	塩基配列		<u>GAT</u>						<u>CGG</u>		
7 北九州/2/2010	アミノ酸		<u>D</u>	R							
	塩基配列		<u>GAT</u>	<u>AGG</u>							
8 北九州/3/2010	アミノ酸		<u>D</u>					D			
	塩基配列		<u>GAT</u>					<u>GAC</u>			
9 北九州/4/2010	アミノ酸		<u>D</u>			<u>Y</u>			R	S	
	塩基配列		<u>GAT</u>			<u>TAC</u>			<u>CGG</u>	<u>TCC</u>	
10 北九州/5/2010	アミノ酸		<u>D</u>		<u>V</u>	<u>Y</u>			R	S	
	塩基配列		<u>GAT</u>		<u>GTT</u>	<u>TAC</u>			<u>CGG</u>	<u>TCC</u>	
11 北九州/6/2010	アミノ酸		<u>D</u>			<u>Y</u>			R	S	
	塩基配列		<u>GAT</u>			<u>TAC</u>			<u>CGG</u>	<u>TCC</u>	

太字（下線）は、置換したアミノ酸（塩基）を示す。

D：アスパラギン酸、E：グルタミン酸、H：ヒスチジン、K：リジン、N：アスパラギン、R：アルギニン、S：セリン、T：トリプトファン、V：バリン、Y：チロシン

No. 9～11 は、同一感染者からの分離株（薬剤耐性マーカーの変異を同定）である。

(2) NA 遺伝子の解析

国内で平成 21 年 6 月以降に分離された AH1pdm 株は、NA 遺伝子上の V106I および N248D の共通の置換を持つことが知られている¹⁾。

そこで、NA 遺伝子コード領域におけるアミノ酸番号（塩基番号）226（676）番～337（1130）番の配列について解析した。V106I は、両プライマーの範囲外なので確認できないが、N248D について解析した結果、分離した 23 株すべて置換を持つことが確認された。これ以外にも、11 株で塩基の一部に置換が確認されたが、共通の置換は見られず、そのほとんどが、アミノ酸の置換までは起きていないものであった。その結果を表 1 に示す。

血液疾患患者から分離した H275Y 耐性株マーカー（+）を持つ 3 株は、マーカー以外にも塩基の一部に置換が確認された。また、同じ患者の咽頭ぬぐい液から増幅した NA 遺伝子についても解析した結果、オセルタミビル耐性株と共通の塩基置換が確認されたことから、感染の早い時期に塩基置換が起きたと考えられた。

AH1pdm 陽性株（オセルタミビル感受性）の NA 遺伝子について、数塩基の変異が認められたが、抗原性に影響するような変異は認められないことが報告²⁾されており、今回の解析でも同様に、一部のオセルタミビル感受性 AH1pdm 株および耐性株の NA 遺伝子の解析で数塩基の変異が確認されたが、抗原性に影響するような変異は認められなかった。

4 まとめ

平成 21 年 5 月～平成 22 年 3 月までに、新型インフルエンザ疑いの患者から採取した検体から 23 株のウイルスを分離し、オセルタミビル耐性マーカー試験を行った結果、3 株（同一患者からの分離）に耐性マーカーの変異が確認されたが、残り 20 株に変異は見られなかった。耐性マーカー陽性が確認された 1 株について薬剤感受性試験を行った結果、オセルタミビル耐性を示したが、ザナミビルに対しては感受性を保持していた。

分離した 23 株について NA 遺伝子の一部の塩基配列を解析したところ、数塩基の変異のある 11 株が確認されたが、抗原性に影響するような変異ではなかった。

季節性 A/H1N1 耐性株と AH1pdm 株との間で遺伝子交雑が起これば、感染伝播力を持った薬剤耐性 AH1pdm 株が発生する可能性もあり、今後もインフルエンザの発生動向に注意していく必要がある。

参考文献

1) 感染研感染症情報センター：＜速報＞新型インフルエンザ（A/H1N1pdm）オセルタミビル耐性株（H275Y）の国内発生状況〔第 1 報〕、病原微生物検出情報 Vol. 31(2)、17-21（2010）

2) 筒井理華他：新型インフルエンザウイルスの遺伝子解析による薬剤耐性株の検討、青森県環境保健センター研究報告 Vol.20、18-21（2009）