

### 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生成に係る揮発性有機化合物の寄与に関する研究【56, 65 ページ】
- 3 大気中微小粒子状物質（PM<sub>2.5</sub>）の調査【70 ページ】
- 4 大気中の化学物質一斉分析調査
- 5 化学物質環境実態調査【59, 75 ページ】  
環境省受託
- 6 PM<sub>2.5</sub>と光化学オキシダントの実態解明と発生源寄与評価に関する研究  
国立環境研究所 C 型共同研究
- 7 洞海湾における付着動物実態調査【58 ページ】  
三井物産環境基金研究助成事業
- 8 食品中の残留農薬等試験法の研究
- 9 加工食品中に含まれる微量農薬の分析法に関する研究【28 ページ】
- 10 食品中ヒスタミン迅速試験法の確立【77 ページ】
- 11 マイクロウェーブ分解を用いた食品中の重金属の迅速分析の検討【29 ページ】
- 12 麻痺性貝毒の化学的解明【32 ページ】
- 13 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【34 ページ】  
厚生労働省受託
- 14 食品中残留農薬に関する 1 日摂取量実態調査【35 ページ】  
厚生労働省受託
- 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
- 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  
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 無菌性髄膜炎等関連ウイルスの分離・検出動向調査【40, 44, 48 ページ】

# 加工食品に含まれる微量農薬の分析法に関する研究 (厚生労働科学研究費補助金研究)

石橋正博

## 1 はじめに

平成19年度に発生した中国産冷凍餃子のメタミドホス混入事件を契機として加工食品に対する残留農薬の検査体制の整備が急がれている。

今後、こうした農薬混入事件等に対して迅速かつ的確に対応できる新たな検査体制を構築するとともに、当研究所での分析技術の向上を図る。

なお、本研究は、平成20年度から3年計画で9地方衛生研究所による加工食品中残留農薬の分析法及び精度管理体制の構築に関する共同研究の一環として行うものであり、平成22年度は、3年計画の3年目になる。

## 2 試験の概要

- (1) 対象加工食品：餃子
- (2) 対象農薬：平成20年度及び21年度対象農薬を合わせた(25品目)
- (3) 分析方法：GC-MS及びLC-MS/MS
- (4) 検討事項
  - ① GC-MS及びLC-MS/MSの再現性試験
  - ② 外部精度管理試験(ブラインドテスト 2検体)
  - ③ GC-MS及びLC-MS/MSシステム評価試料測定

## 3 結果及び考察

### (1) 再現性試験結果について

GC-MSでは標準品、マトリックス標準品とも変動係数が6%以下で良好であった。

LC-MS/MSも標準品、マトリックス標準品とも変動係数が6%以下と良好であった。

### (2) 外部精度管理試験(ブラインドテスト)について

25対象農薬のうち5種類の農薬が検出された。誤検出は無かった。回収率はGC-MSで72~87%、LC-MS/MSで78~108%、変動係数はGC-MSで2.0~5.8%、LC-MS/MSで1.2~6.6%と良好であった。

今回新たに2試料の測定値和と差を用いて機関間Zスコアと機関内Zスコアによる複合評価を行った。その結果LC-MS/MSのクレソキシムメチルが△(Zスコア2以上3未満)であったがそれ以外は良好であった。

### (3) GCシステム評価試料測定

ピーク形状指数は、0.9~1.0の範囲内に収束していて一連の試験前後でピーク形状の変化はほとんどなく餃子試料の注入によるGC-MSシステムへの影響は小さかった。

これらの結果を生かし、平成23年度は、残留農薬が検出された加工食品について原材料の残留農薬を分析し、原材料単位での食品衛生法への規格適合性を検証する。

主任研究者 小島幸一(財団法人食品薬品安全センター秦野研究所 所長)

研究分担者 尾花裕孝(大阪府立公衆衛生研究所 食品化学課長)、畠山えり子(岩手県環境保健研究センター)、

土田由里子(新潟県保健環境科学研究所)、上野英二(愛知県衛生研究所)、山下浩一(奈良県保健環境研究センター)、上田泰人(神戸市環境保健研究所)、佐々木珠生(広島市衛生研究所)、中村秋香(高知県保健環境センター)

平成22年度 厚生労働科学研究費補助金(食品の安心・安全確保推進研究事業)検査機関の信頼性確保に関する研究

平成22年度総括・分担研究報告書(尾花裕孝)、p25-71(2011)

## マイクロウェーブ分解を用いた食品中の重金属の迅速分析の検討 徳崎健史、森下正人

### 1 はじめに

食品による健康危機発生時に、金属による事件を想定した迅速な検査体制を整備するため、マイクロウェーブ分解装置を用いて分解後、ICP/MSにより重金属を測定する方法を検討した。

(研究期間：平成 22 年 4 月 1 日～23 年 3 月 31 日)。

### 2 方法

マーケットバスケット方式により分類された 14 の食品群についてマイクロウェーブ分解装置を用いた分解条件の検討を行い、ICP/MS により重金属を測定した。また、マトリックス除去のためキレート樹脂によるクリーンアップを行い、その後、添加回収試験を行い、分析法の妥当性を検証した。

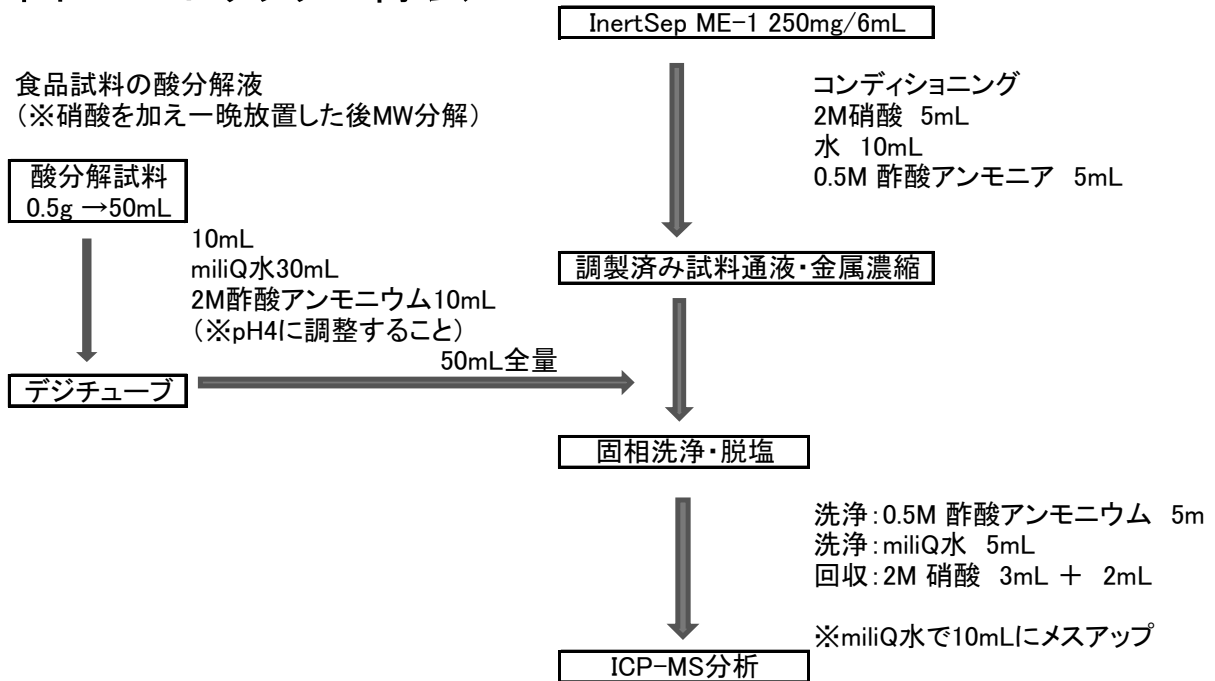
表 1. 食品群ごとのマイクロウェーブ分解条件

食品群	1,2,3,5,6,7,8, 12,13	4,10,11	9,14
Step1			
Temperature(°C)	145	160	145
Pressure(bar)	30	30	30
Time(min)	5	5	5
Slope(min)	2	5	2
Power(%)	80	80	80
Step2			
Temperature(°C)	170	190	145
Pressure(bar)	30	30	30
Time(min)	10	5	5
Slope(min)	2	1	2
Power(%)	80	80	80
Step3			
Temperature(°C)	210	190	170
Pressure(bar)	30	30	30
Time(min)	15	10	10
Slope(min)	2	2	2
Power(%)	80	80	80
Step4			
Temperature(°C)	100	100	100
Pressure(bar)	0	0	0
Time(min)	10	10	10
Slope(min)	1	1	1
Power(%)	0	0	0
Step5			
Temperature(°C)	100	100	100
Pressure(bar)	0	0	0
Time(min)	10	10	10
Slope(min)	1	1	1
Power(%)	0	0	0

### 3 結果

添加回収試験の結果、極端に回収率が悪かった13群(加工食品)中の亜鉛26.2%を除いた、最小値は60.0%、最大値114.2%、平均値は94.8%であった(表2)。2010年度の測定結果を表3に、2009年度の測定結果を表4に示した。各金属種の摂取量の合計を2010年度と2009年度で比較してみると、銅を除いて値は違うがオーダー(桁)的に同じレベルであることがわかった。13群(加工食品)中の亜鉛の回収率が悪かった原因及び銅の摂取量が2010年度と2009年度一桁違う原因についての原因は現在のところ不明ではある。しかし、更にMW分解方法及び精製条件を精査し、継続して検討を行いたい。

## 図1. マトリックス除去フロー



### 表2. 2010年重金属回収率

単位: %

食品群	食品種	B	Al	Cr	Mn	Fe	Ni	Cu	Zn	As	Se	Mo	Cd	Sb	Pb	U
1群	米	97.9	79.9	109.6	103.3	98.8	91.0	106.1	70.9	85.4	96.9	113.1	94.5	89.3	110.2	100.6
2群	穀類・いも類	97.2	78.8	110.3	102.5	99.1	90.1	109.0	69.1	84.2	96.1	112.3	93.4	87.7	109.6	98.9
3群	砂糖・菓子類	98.0	81.8	110.2	103.7	100.1	90.5	104.8	70.8	85.9	97.4	114.2	94.0	89.1	104.3	100.1
4群	油脂類	96.7	79.8	107.3	101.2	94.8	87.9	100.8	78.0	82.6	93.5	103.5	90.8	86.6	107.4	97.1
5群	豆・豆加工品類	98.0	83.9	108.9	102.3	102.7	91.7	102.7	70.4	84.7	96.1	111.9	93.4	88.2	110.0	98.2
6群	果実類	96.7	81.0	107.7	100.7	96.3	89.2	101.0	69.4	83.1	94.2	110.6	92.9	86.5	101.9	96.7
7群	有色野菜類	96.7	81.0	107.7	100.7	96.3	89.2	101.0	69.4	83.1	94.2	110.6	92.9	86.5	101.9	96.7
8群	野菜類・海藻類	99.5	80.7	109.2	102.3	97.9	89.8	102.0	70.8	83.8	96.0	106.8	93.2	88.1	104.5	98.4
9群	調味・嗜好品類	97.1	98.0	105.7	108.2	106.2	78.8	103.7	63.2	82.8	93.8	98.2	89.6	86.0	105.5	97.7
10群	魚介類	99.6	83.1	110.1	102.7	98.1	91.0	105.0	72.4	85.2	95.8	100.2	93.0	88.5	109.5	98.2
11群	肉類・卵	100.0	83.5	111.1	103.1	100.3	91.4	106.1	71.2	85.0	96.1	113.8	93.5	88.4	109.0	98.4
12群	乳類	99.7	78.7	110.1	101.6	93.9	78.9	101.4	80.3	83.9	95.3	99.4	92.0	87.5	107.0	97.8
13群	加工食品	100.9	84.1	108.8	84.7	100.6	66.2	100.8	26.2	84.6	96.3	106.8	90.2	88.4	96.3	98.1
14群	飲料水(水道水)	98.1	95.3	108.8	102.2	95.3	70.5	100.8	60.0	78.7	96.0	93.2	91.3	83.9	99.4	98.2

表3. 2010年 重金属一日摂取量結果

単位:  $\mu\text{g}$ 

食品群	食品種	B	Al	Cr	Mn	Fe	Ni	Cu	Zn	As	Se	Mo	Cd	Sb	Pb	U
1群	米	248	1287	4.2	63.4	605	47	345	1135	80.0	2.0	89.1	2.7	12.7	54	0.45
2群	穀類・いも類	137	707	3.2	29.2	780	28.0	648	663	44.5	0.14	22.8	1.1	7.1	43.6	0.06
3群	砂糖・菓子類	21.5	124	0.4	4.7	149	4.9	65.4	114	7.6	0.02	2.2	0.2	1.21	8.0	0.01
4群	油脂類	7.0	42.1	0.10	1.4	21.5	3.2	3.9	86.5	2.5		0.52	0.1	0.39	2.5	
5群	豆・豆加工品類	36.9	199	0.5	10.8	1201	7.3	179	198	14.0	0.01	24.2	0.3	2.2	7.3	0.02
6群	果実類	88.5	487	2.0	20.2	228	18.9	162	557	29.0	0.03	5.5	0.7	5.0	22.2	0.03
7群	有色野菜類	66.9	341	1.3	13.9	395	12.0	307	314	23.4	0.03	4.5	0.1	3.7	21.7	0.02
8群	野菜類・海藻類	142	767	2.7	28.9	637	27.8	327	672	53.3	0.02	9.8	1.1	7.9	35.9	0.07
9群	調味・嗜好品類	24.6	509	0.29	365	185	36.7	45.5	582	8.4	0.01	2.3	0.8	1.3	11.9	
10群	魚介類	48.7	256	0.6	9.7	98.7	8.3	248	234	17.5	0.01	1.1	0.4	2.7	9.2	0.02
11群	肉類・卵	87.6	461	1.4	17.4	613	17.6	341	427	31.5	0.05	4.9	0.6	5.0	16.2	0.04
12群	乳類	42.4	269	1.12	10.2	427	27.3	31.3	815	14.4	0.01	2.8	0.5	2.3	16.4	0.03
13群	加工食品	68.2	346	1.1	179.7	280	56.7	95.8	1157	23.7	0.03	3.0	2.1	3.7	37.3	0.06
14群	飲料水(水道水)	11.9	79.3	0.34	2.7	41.0	7.0	7.2	130	3.6		0.69	0.18	0.56	4.8	0.02
合計		1030	5873	19.2	757	5661	303	2807	7085	353	2.38	174	10.9	55.8	291	0.84

表4. 2009年重金属一日摂取量結果

単位:  $\mu\text{g}$ 

食品群	食品種	B	Al	Cr	Mn	Fe	Ni	Cu	Zn	As	Se	Mo	Cd	Sb	Pb	U
1群	米	458	1608	14.6	71.2	2985	131	26419	1220	71.5	5.40	234	12.0	8.64	138	1.23
2群	穀類・いも類	197	887	4.18	43.3	1490	48.6	3866	354	34.6	0.30	34.5	4.26	3.55	44.2	0.06
3群	砂糖・菓子類	42.6	712	0.98	8.05	345	20.6	372	118	7.91	0.14	4.77	1.15	0.91	14.9	0.02
4群	油脂類	10.7	49.7	0.39	1.57	51.5	5.40	5.41	31.5	2.01	0.01	0.59	0.34	0.23	3.22	0.00
5群	豆・豆加工品類	67.7	319	1.00	13.1	804	19.3	732	143	13.3	0.12	22.6	1.67	1.35	16.6	0.01
6群	果実類	94.2	484	2.06	23.2	232	38.0	823	342	20.4	0.15	6.61	2.98	2.35	42.2	0.02
7群	有色野菜類	95.8	508	1.41	12.1	431	31.2	4071	212	19.8	0.09	4.81	2.19	1.95	27.6	0.01
8群	野菜類・海藻類	208	619	2.67	24.2	376	72.3	3088	400	32.0	0.28	7.24	5.92	3.35	46.8	0.02
9群	調味・嗜好品類	37.9	202	0.45	10.5	345	10.1	55.3	76.8	7.83	0.06	3.05	0.88	1.60	9.63	0.01
10群	魚介類	105	567	1.63	12.1	278	35.1	335	306	23.2	0.15	3.26	2.83	3.37	42.2	0.02
11群	肉類・卵	242	815	5.81	24.1	421	229	6354	881	74.1	0.47	5.92	18.0	3.38	107	0.05
12群	乳類	56.1	301	0.63	7.18	296	12.6	45.3	103	11.9	0.03	2.59	1.30	1.12	15.3	0.01
13群	加工食品	100	530	1.41	13.1	1096	23.1	99.2	175	20.9	0.11	14.6	2.29	1.96	21.1	0.01
14群	飲料水(水道水)	10.8	66.1	0.14	1.66	32.8	8.59	54.2	57.3	2.25	0.01	0.48	0.49	0.22	5.49	0.02
合計		1727	7668	37.4	265	9185	685	46322	4420	342	7.3	345	56.4	34.0	534	1.5

# 麻痺性貝毒の化学的解明

## 徳崎健史、森下正人

### 1 はじめに

マウス使用の麻痺性貝毒試験の公定法に代わる迅速かつ正確な検査体制を整備する目的で、高速液体クロマトグラフ質量分析計 (LC/MS/MS) により毒性成分を特定する分析法を検討した。

(研究期間：平成 22 年 4 月 1 日～23 年 3 月 31 日)。

### 2 方法

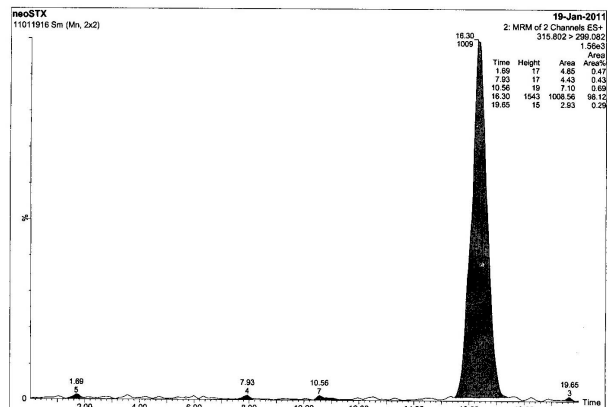
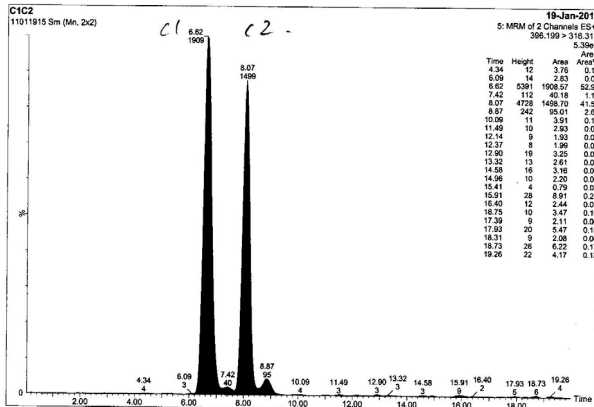
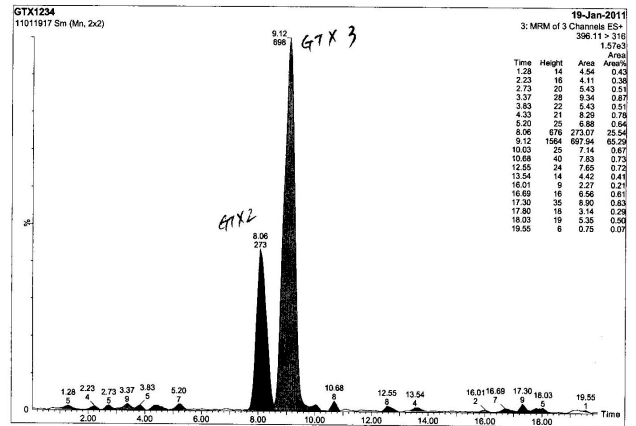
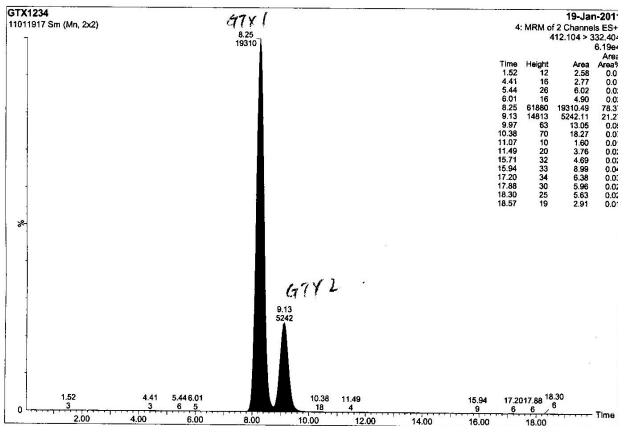
麻痺性貝毒標準品(GTX1-4、C1-2、neoSTX)を用い、高感度、短時間に同定、定量するため、LC/MS/MS の分離カラム、移動相条件等、各種測定条件を再検討した。特に昨年度の測定条件では分離不可能であった C1-2 の分離条件を検討した。

### 3 結果

本年度行ったマウス毒性試験を用いた貝毒検査では、貝毒が検出されなかった。

そこで、昨年度、貝毒が検出された試料を LC/MS/MS 分析したが、貝毒が失活しており、ピークが確認できなかった。

しかし、標準品を用いた測定条件を検討したところ、移動相中のギ酸濃度を昨年度の 3.6mM から 50mM に変更することにより、昨年分離できなかった C1-C2 の分離が可能となり、分析時間 20 分で GTX1,2,3,4 及び C1-2,neo-STX の同定が可能となった。



LC/MS/MS 測定条件

MS/MS:Quattro Premier XE(Waters)

LC :AQUNITY UPLC(Waters)

カラム :TSKgel Amide80 (東ソー 2mm i.d ×250mm、5 μ m)

移動相 :A:H<sub>2</sub>O、B:95%CH<sub>3</sub>CN (A,B は 2mM ギ酸アンモニウム、50mM ギ酸を含む)

A:B=35:65、流速 0.2ml/min、注入量:5 μ L

表 MRM 測定時の条件

	Precursor Ion [m/z]	Product Ion [m/z]	CV [Voltz]	CE [eV]	Retention Time [min]
GTX1	412	332	15	20	8.21
GTX4	412	332	15	20	9.09
GTX2	396	316	45	15	8.06
GTX3	396	316	45	15	9.04
C1	396	316	10	20	6.62
C2	396	316	10	20	8.07
neoSTX	316	299	25	25	16.3



# 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

## 苗床江理

厚生労働省受託（共同研究者 日本食品分析センター、千葉県薬剤師会検査センター）

### 1 はじめに

平成 17 年のポジティブリスト制度が導入され、食品中の残留農薬は全て規制されている。その規制の多くは暫定基準によるものである。そのため、健康影響評価等を審議された農薬の残留基準が、逐次設定がなされている。農薬の残留基準の告示等を行うには、その試験法が開発され、その妥当性評価(検証)がなされていなければならない。

今回当所は、残留基準の告示等が予定されている農薬 41 品目を対象とした試験法の妥当性評価する試験に参加し、実施した。なお、これは厚生労働省受託事業である。

### 2 試験の概要

まず、農産物 10 作物対象に、試験法「LC/MS による通知一斉試験法(農産物)」(H17 年 1 月 24 日付厚生労働省通知食安発第 0124001 号)で添加回収試験を 1 日 1 回(2 併行)、2 日間分析する枝分かれ実験(図 1 参照)等を実施する。具体的な試験内容を表 1 に示す。

その試験結果から、5 項目(選択性、真度、精度(併行精度及び室間精度)、定量限界、試料マトリックス影響)について、この試験法の妥当性の評価を行う。

この評価方法は、「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」(H19 年 11 月 15 日付厚生労働省通知食安発第 1115001 号)に準ずるもの。

なお、評価項目の精度の室間精度は、同様に実施した他の 2 機関の結果と併せて求められるものである。

表 1 試験内容

(1) 添加回収試験等により主に以下の項目について検討 選択性 (n=1/日を 2 日間、標準添加濃度：定量限界レベル) 真度 (n=2/日を 2 日間、標準添加濃度：1 種) 精度 (n=2/日を 2 日間、標準添加濃度：1 種) 定量限界 (n=1/日を 2 日間、標準添加濃度：定量限界レベル) 試料マトリックス影響 (n=1/日を 2 日間、標準添加濃度：定量限界レベル 1 種)
(2) 実施試験法：GC/MS による通知一斉試験法(農産物)
(3) 対象食品：農産物 10 作物(玄米、大豆、落下生、ナ、馬鈴薯、リンゴ、オレンジ、ホウレン草、キャベツ、茶)
(4) 分析装置：LC-MS/MS
(5) 対象農薬：41 品目 表参照
(6) 標準添加濃度：基準値又は定量限界レベル(およそ 0.01ppm)

表 2 対象農薬品目

オキシデメトンメチル、チアメトキサム、3-ヒドロキシカルボフラン、シモキサニル、チアクロプリド、ベンダイオカルブ、カルボフラン、モノリニユロン、クレトジム(異性体 1 2)、メタバベンズチアズロン、プトロキシジム(異性体 1 2)、アジンホスメチル、アゾキシストロビン、クロルプロファム、リニユロン、パーバン、ポスカリド、ダイムロン、シメコナゾール、クミルロン、シアゾファミド、テトラクロルピホス(Z)、イマザリル、ペナラキシル、クロジナホッププロパルギル、ピラクロストロビン、シクロエート、ノバルロン、キザロホップPテフリル、ベンゾフェナップ、ラクトフェン、フェンピロキシメート(Z)、フルフェノクスロン、フェンピロキシメート(E)、エトキサゾール、ヘキシチアゾクス、スピノシンA、スピノシンD、シラフルオフェン、アルドキシカルブ、ダイアレート(計 41 種)

表 3 真度 精度の評価基準

濃度 (ppm)	試行回数	真度(%) (回収率)	併行精度 (RSD%)	室間精度 (RSD%)
≤0.001	1 日 1 回 (2 併行) 2 日間	70 ~ 120	30 >	35 >
0.001 < ~ ≤0.01		70 ~ 120	25 >	30 >
0.01 < ~ ≤0.1		70 ~ 120	15 >	20 >
0.1 <		70 ~ 120	10 >	15 >

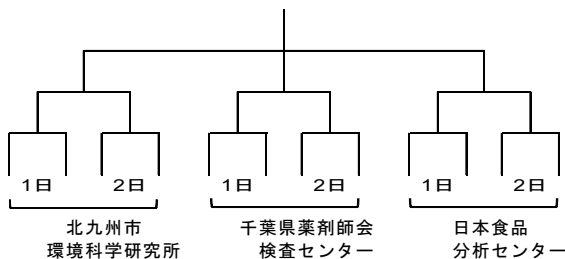


図 1 枝分かれ実験

### 3 結果

今後、日本食品分析センター、千葉県薬剤師会検査センターと併せての 3 機関の試験結果から、対象農薬について当試験法の妥当性評価を厚生労働省が行う。

# 食品中残留農薬に関する一日摂取量実態調査

## 徳崎健史、森下正人

### 1 目的

日本の食糧自給率は減少しており、輸入食品なしには、食生活はなりたない。また、輸出国による規制は、日本の規制、習慣と異なり日本人には予期せぬ危害を及ぼすことがある。そこで、市民の食の安全・安心を確保する一環として市民が日常の食生活においてどの程度の量の残留農薬を摂取しているかの実態調査と安全性評価を行う。

北九州市における市民の食品由来の農薬摂取の実態を把握するために、マーケットバスケット方式の試料について、低濃度測定が可能な LC/MS/MS を用いて残留農薬測定を行った。本調査は平成 22 年度厚生労働省受託事業である。

### 2 試料の調製法

調査対象食品を「平成 19 年度国民栄養調査」の食品分類と食品別摂取量を参考に、飲料水を含む 14 の群に分類し、各群の中から選んだ主な食品 169 品目を市内のマーケットなどで購入した（購入時期：平成 22 年 12～平成 23 年 1 月）。

調理が必要な食品については、通常行われている調理方法（米は炊飯するなど）に準じて調理を行った。次に、国民健康・栄養調査の北九州ブロックの食品群別摂取量をもとに、各群ごとに必要量（1 群の例：米めし約 350 g、米加工品約 3 g）を混合して破碎し、均一化したものを試料とした（表 1）。

### 3 試験法

調製した試料を、各群ごとに農薬の量を測定し、喫食量から検出された農薬の一日摂取量を求め、すべての食品群の合計をもってその農薬の一日摂取量とする。

平成 22 年度については、LC/MS による農薬等の一斉試験法 I（農産物）が適用可能な 81 項目のうち 38 項目について調査を行った。

#### 3.1 前処理 ①1～3 群、5～9 群、12～14 群

平成 17 年 1 月 24 日付食安発 0124001 号厚労省通知の LC/MS による農薬の一斉試験法（農産物）に準じて行った。

#### ② 4 群、10 群、11 群

試料 5.0g にヘキサン 30mL を加え均一化したものに、ヘキサン飽和アセトニトリル 30mL（2 回目 30mL、3 回目 30mL）と無水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>10g を加えホモジナイズした後、ろ過した。濃縮後、PSA ミニカラム精製を行った。溶媒除去後、メタノール 1mL にて定容した。

#### 3.2 測定

LC/MS/MS 測定を行った。表 2 に測定装置条件を、表 3 に 38 種の対象農薬名及びイオン化条件を示す。

### 4 添加回収試験

7 群、8 群、11 群、14 群試料の添加回収試験（標準品添加濃度 0.04ppm 相当）の結果を表 4 に示す。平均回収率は、7 群＝87.3%、8 群＝87.3%、11 群＝79.8%、14 群＝80.4%とほぼ良好であった。

### 5 結果

17 種の農薬、アゾキシストラビン、イマザリル、イミダクロピド、インドキサカルブ、オキシカルボキシ、クロチアニジン、ジメトモルフ、チアクロプリド、チアベンダゾール、チオジカルブ、ノバルロン、ピラクロストロビン、フルフェノクスロン、ベンダイオカーブ、ボスカリド、メトキシフェノジド、ルフエヌロンを検出した（表 5）。

検出農薬の群別摂取量の ADI（%）を群別に積算したところ（表 1）、米類の 1 群から 0.0017%、穀類・芋類の 2 群か

表1 食品群と群別積算 ADI%

群	主成分	群別積算 ADI(%)
1	米類	0.0017
2	穀類・芋類	0.021
3	砂糖類・菓子類	0.0003
4	油脂類	0.0085
5	豆類	0.020
6	果実類	0.70
7	緑黄色野菜類	0.028
8	淡色野菜類・海藻	0.20
9	調味・嗜好飲料	0.10
10	魚介類	-
11	肉類・卵類	-
12	乳類	0.0028
13	その他の食品	-
14	飲料水	-

ら 0.021%、砂糖・菓子類の3群から 0.0003%、油脂類の4群から 0.0085%、豆類の5群から 0.020%、果実類の6群から 0.70%、緑黄色野菜類の7群から 0.028%、淡色野菜類・海藻の8群から 0.020%、調味・嗜好飲料の9群から 0.10%、乳類の12群から 0.0028%摂取される傾向が分かった。検出農薬の摂取量はADI（一日摂取許容量）の0.70~0.0003%となり、今回調査した38種の農薬については、健康上問題のないレベルと分かった。

表2 HPLC-LC/MS/MS 装置条件

装置	Waters AQUITY UPLCTM システム/Waters Quattro Premier XE		
カラム	Waters AQUITY UPLCTM BEH C18 1.7um 2.1×100mm		
移動相	A 5mM 酢酸 NH4 水溶液/ B 5mM 酢酸 NH4 メタノール溶液 B%(min)=5(0)→40(1)→95(12)→95(20)→5(20.5)		
カラム温度	40°C	流速	0.3mL/min 注入量: 3uL
イオン化モード	エレクトロスプレー(ESI+/ESI-)	キャピラリー電圧	1kV イオン源温度: 120°C

表3 農薬名、LC/MS/MS イオン化条件

農薬成分名	保持時間 (分)	モード	定量イオン				定性イオン			
			プリカーサー m/z	プロダクト m/z	イオン電圧 (V)	コリジョンエネルギー (eV)	プリカーサー m/z	プロダクト m/z	イオン電圧 (V)	コリジョンエネルギー (eV)
アルドキシカルブ	1.9	ESI+	223.1	85.9	25	15	223.1	147.8	25	10
アゾキシストロビン	7.7	ESI+	404.1	372.1	20	15	404.1	344.0	20	20
アニロホス	10.1	ESI+	368.0	198.5	25	15	370.0	198.5	25	15
アルジカルブ	3.6	ESI+	208.1	115.7	10	5	208.1	88.0	10	15
イマザリル	9.7	ESI+	297.1	158.8	35	20	299.1	160.8	35	20
イミダクロプリド	2.4	ESI+	256.1	174.8	20	20	256.1	208.9	20	20
インドキサカルブ	11.1	ESI+	528.1	203.0	25	45	528.1	150.0	25	45
オキサミル	2.0	ESI+	237.1	71.8	10	10	237.1	147.8	10	10
オキシカルボキシ	3.1	ESI+	268.1	146.6	20	25	268.1	174.1	20	20
カルバリル	4.8	ESI+	202.1	144.9	15	15	202.1	126.9	15	30
クロチアニジン	2.5	ESI+	250.0	169.0	15	15	250.0	131.8	15	15
クロメプロップ	11.7	ESI+	324.1	119.7	25	20	324.1	202.8	25	20
ジウロン	6.0	ESI+	233.0	72.0	25	20	235.0	72.0	25	20
シフルフェナミド	10.4	ESI+	413.1	295.1	20	15	413.1	203.0	20	40
ジフルベンズロン	9.1	ESI+	311.0	157.8	20	15	311.0	140.8	20	35
シプロジニル	9.5	ESI+	226.1	92.8	40	40	226.1	76.8	40	40
シメコナゾール	9.0	ESI+	294.1	69.9	25	20	294.1	134.9	25	20
ジメトモルフE	7.7	ESI+	388.1	300.7	35	20	388.1	164.8	35	30
ジメトモルフZ	8.3	ESI+	388.1	300.7	35	20	388.1	164.8	35	30
チアクロプリド	3.1	ESI+	253.0	125.8	30	25	255.0	125.8	30	25
チアベンダゾール	3.8	ESI+	202.0	174.6	45	25	202.0	130.7	45	30
チアメトキサム	2.2	ESI+	292.0	211.0	20	15	292.0	181.1	20	15
チオジカルブ	5.8	ESI+	355.1	88.0	15	15	355.1	108.0	15	15
メソミル	2.1	ESI+	163.1	87.8	10	10	163.1	105.7	10	10
テブフェノジド	9.6	ESI+	353.2	132.8	10	20	353.2	297.1	10	10
トリフルムロン	10.3	ESI+	359.0	155.8	25	25	359.0	138.8	20	20
ノバルロン	11.5	ESI+	493.0	157.8	25	25	493.0	140.8	25	25
ピラクロストロビン	10.2	ESI+	388.1	162.9	20	25	390.1	162.9	20	25
ピラゾリネート	10.5	ESI+	439.0	90.8	30	35	439.0	172.9	30	35
ピリフタリド	7.3	ESI+	319.1	138.9	40	30	319.1	178.9	40	30
フェノブカルブ	7.0	ESI+	208.1	94.7	20	15	208.1	151.8	20	10
フルフェノクスロン	13.0	ESI+	489.0	157.8	25	25	489.0	140.9	25	25
ヘキサフルムロン	11.4	ESI-	459.0	438.6	20	10	461.0	440.6	20	10
ベンダイオカルブ	4.3	ESI+	224.1	166.9	20	10	224.1	108.7	20	20
ポスカリド	7.6	ESI+	343.0	307.0	30	25	343.0	139.8	30	30
メタベンズチアズロン	5.5	ESI+	222.1	164.9	20	15	222.1	149.8	20	30
メチオカルブ	7.3	ESI+	226.1	168.8	20	10	226.1	120.7	20	20
メトキシフェノジド	7.9	ESI+	369.2	149.0	10	20	369.2	91.0	10	50
メパニピリム	8.6	ESI+	224.1	105.8	45	25	224.1	77.0	45	40
ルフェヌロン	12.5	ESI-	509.0	325.9	25	20	509.0	174.9	25	30

表4 添加回収試験結果

農薬名	VII群 回収率%		VIII群 回収率%		XI群 回収率%		XIV群 回収率%	
	平均	CV%	平均	CV%	平均	CV%	平均	CV%
アルドキシカルブ	94.0	6.3	98.0	1.0	111.4	6.0	84.7	3.1
アゾキシストロビン	104.8	1.7	102.6	1.8	118.4	3.0	85.9	7.1
アニロホス	93.2	1.1	92.2	1.6	92.7	3.8	86.2	5.2
アルジカルブ	90.9	2.4	83.8	1.1	72.3	3.2	22.1	23.7
イマザリル	78.7	2.0	82.7	5.6	102.7	3.6	83.0	3.4
イミダクロプリド	70.4	1.7	86.6	3.6	83.6	3.0	83.7	3.8
インドキサカルブ	80.1	3.9	81.7	3.1	52.2	2.8	77.4	4.5
オキサミル	83.8	3.1	83.8	2.7	82.1	6.2	79.0	2.6
オキシカルボキシ	63.4	5.4	88.6	14.1	98.9	4.0	78.6	4.0
カルバリル	95.0	1.4	94.3	1.7	97.4	4.0	80.1	1.8
クロチアニジン	33.2	3.7	52.7	2.9	93.1	3.7	88.8	4.9
クロメプロップ	85.9	4.6	77.5	8.9	29.1	3.0	85.8	6.1
ジウロン	104.8	3.0	99.8	1.9	100.1	4.7	85.4	6.3
シフルフェナミド	90.8	4.4	89.4	2.0	89.9	1.8	85.0	5.1
ジフルベンズロン	87.2	4.0	85.6	0.5	0.5	23.4	80.5	1.8
シプロジニル	91.7	0.3	84.5	1.4	12.8	11.2	75.0	3.6
シメコナゾール	85.0	0.6	84.8	1.9	91.2	3.3	93.0	3.8
ジメトモルフ	94.6	0.3	92.7	3.1	103.9	3.0	86.0	6.5
チアクロプリド	70.5	2.3	72.9	3.7	99.0	3.0	90.1	2.1
チアベンダゾール	86.0	2.4	90.5	15.9	0.0	-	71.7	4.9
チアメトキサム	63.7	2.6	63.7	2.6	86.1	3.4	83.9	6.4
チオジカルブ及びメソミル	91.3	2.6	94.5	1.3	112.9	3.1	83.9	3.5
テブフェノジド	90.5	2.3	88.5	2.4	105.7	4.0	86.8	4.1
トリフルムロン	84.1	3.4	84.6	3.7	77.0	2.2	82.2	5.9
ノバルロン	80.1	4.5	76.7	7.2	77.2	2.8	75.9	4.4
ピラクロストロビン	95.8	0.2	96.8	2.6	65.2	5.9	79.3	4.6
ピラゾリネート	84.9	3.9	80.5	3.0	51.1	2.5	63.5	5.4
ピリフタリド	96.1	1.6	96.7	1.8	114.4	0.7	88.7	2.0
フェノプカルブ	83.5	0.6	79.5	0.6	68.5	5.1	75.7	3.8
フルフェノクスロン	66.0	8.8	53.2	17.7	60.2	3.9	49.6	7.7
ヘキサフルムロン	102.3	0.5	94.6	2.0	116.0	2.0	89.3	6.7
ペンダイオカルブ	94.3	3.6	90.9	1.2	100.8	1.8	77.4	4.0
ポスカリド	96.0	2.7	94.8	0.9	96.4	3.2	84.8	4.0
メタバズチアズロン	99.8	1.1	97.6	0.9	24.6	2.2	83.9	4.6
メチオカルブ	99.8	1.8	96.9	0.1	104.9	2.2	82.4	5.8
メトキシフェノジド	106.4	3.7	103.1	0.1	115.7	4.0	85.7	4.1
メパニピリム	91.7	0.2	87.4	3.5	1.2	24.5	79.8	3.5
ルフェエロン	107.8	2.9	111.5	12.7	124.5	2.8	100.0	4.5

表5 検出農薬一覧

農薬名	用途	一日摂取量(μg)(n=3)		ADI (μg/50kg体重/日)	ADI比 (%)
		総量	群別		
アゾキシストロビン	殺菌剤	0.011	0.0014(7群)、0.0098(9群)	9000	0.000012
イマザリル	殺菌剤	0.37	0.0094(5群)、0.36(6群)	1500	0.025
イミダクロピド	殺虫剤	0.019	0.019(8群)	2850	0.00067
インドキサカルブ	殺虫剤	0.0011	0.0011(12群)	260	0.00042
オキシカルボキシ	殺菌剤	0.067	0.067(8群)	400	0.017
クロチアニジン	殺虫剤	0.029	0.029(8群)	4850	0.006
ジメトモルフ	殺菌剤	0.066	0.066(9群)	5500	0.0012
チアクロプリド	殺虫剤	0.026	0.026(9群)	600	0.0043
チアベンダゾール	殺菌剤	0.36	0.0017(1群)、0.0016(2群)、0.0003(3群)、 0.0097(5群)、0.34(6群)、0.0005(7群)、 0.0010(8群)	5000	0.0072
チオジカルブ及びメソミル	殺虫剤	0.090	0.015(7群)、0.074(8群)	1500	0.006
ノバルロン	殺虫剤	0.0036	0.0019(8群)、0.0017(12群)	550	0.0065
ピラクロストロビン	殺菌剤	0.015	0.014(2群)、0.0006(5群)	1700	0.00088
フルフェノクスロン	殺虫剤	0.0021	0.0021(4群)	1850	0.00011
ペンダイオカルブ	殺虫剤	0.0019	0.0019(7群)	175	0.0011
ポスカリド	殺菌剤	0.019	0.0096(7群)、0.010(8群)	2200	0.00086
メトキシフェノジド	殺虫剤	0.0049	0.0049(2群)	4900	0.0001
ルフェエロン	殺虫剤	0.0064	0.0064(4群)	320	0.002

# 本市におけるインフルエンザウイルス検出状況（平成 22 年度）

村瀬浩太郎、河辺直美、梨田実

## 1 はじめに

平成 22 年度は、11 月中旬ごろからインフルエンザの流行期に入った。患者報告数の増加に伴い、検査件数も増加し始め、1 月にピークとなった。ウイルス分離およびリアルタイム PCR 検査等を実施したので、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) ウイルス分離

平成 22 年 9 月～平成 23 年 3 月 31 日までに搬入された病原体定点からの検体について、培養細胞（MDCK）を用いてウイルス分離を行った。細胞変性効果（CPE）が観察されない場合は 2 代まで継代培養を行った。

### (2) リアルタイム PCR 検査

協力医療機関から搬入された咽頭、鼻腔拭い液等については、まずイムノクロマトキット（エスプライン インフルエンザ A&B-N：富士レビオ社）にて判定を行い、B型陽性以外の検体について「病原体検出マニュアル H1N1 新型インフルエンザ」（国立感染症研究所：2009年11月 ver.2）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（QIAamp Viral RNA Mini Kit：QIAGEN社）でRNAを抽出し、リアルタイムRT-PCR法（TaqMan Probe法）により、A型インフルエンザウイルスのM遺伝子、新型インフルエンザウイルス（A/H1N1pdm）（以下AH1pdm）および季節型インフルエンザウイルス（AH3亜型：香港型）のHA遺伝子の検出を同時に行って同定した。

病原体定点から搬入された検体で、ウイルス分離実施後CPEが観察されながら赤血球凝集性（HA活性）が認められなかった株についても、リアルタイムPCR検査を行って同定した。

### (3) 同定・抗原性解析

分離した株について、国立感染症研究所から配布された 2010/2011 シーズンインフルエンザウイルス同定用キットの抗血清と 0.6%七面鳥血球を用いた赤血球凝集抑制（HI）試験により、同定・抗原性解析を行った。

### (4) 薬剤耐性試験

分離・同定された AH1pdm 11 株について、「H1N1pdm オセルタミビル耐性株検出法 実験プロトコール」（国立感染症研究所：2010 年 11 月 ver. 1）に従い、リアルタイム RT-PCR 法（TaqMan Probe 法）により同定した。

## 3 結果

### (1) 検査件数およびインフルエンザ検出状況

平成 22 年 4 月～平成 23 年 3 月の 103 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 50 件、ウイルス分離で 17 件、イムノクロマト法で 6 件、合計 73 件（検出率 71%）のインフルエンザウイルスを検出した。

10 月までは 5 月 25 日に搬入された 1 検体から AH1pdm、9 月 7 日に搬入された 2 検体から AH3 亜型を散発的に検出するにとどまった。流行の開始は 11 月 15 日に搬入された検体からの AH1pdm と考えられ、2 月中旬まで AH1pdm が優位であった。2 月 22 日以降に搬入された検体からは AH1pdm は検出されず、AH3 亜型と B 型がほぼ同数検出された（表 1）。

表 1 インフルエンザウイルス検査の内訳

		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
検出方法	ウイルス分離								1(1)	1(1)	14(6)	10	11(1)	37(9)
	リアルタイム PCR	2	1				2		4	6	26	15	4	60
	イムノクロマト法											5	1	6
	合計	2	1				2		5	7	40	30	16	103
検査結果	AH1pdm		1						3	5	28	7		44
	AH3 亜型（香港型）						2			1	6	4	3	16
	AH1pdm・AH3 重複										2			2
	B 型											6	3	9
	陰性	2							2	1	4	13	10	32

検体搬入月ごとに集計。○内はリアルタイム PCR も実施した件数

## (2) 抗原性解析

分離したインフルエンザウイルス 19 株（協力医療機関から搬入の 2 検体を含む）について、国立感染症研究所より配布された抗血清を使い HI 試験による抗原解析を行った結果（表 2）、AH1pdm 分離株は HA 活性を示さない株が多く、HI 試験で同定できたのは 11 株中 5 株であった。ワクチン株 A/California/07/2009 の抗血清に対して 1 株を除いて 2 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。AH3 亜型分離株は 5 株中 4 株について HI 試験を行ったが、ワクチン株 A/Victoria/210/2009 の抗血清に対して 4 株中 3 株については 8 倍以上の減少が見られた。B 型分離株は 3 株すべてについて HI 試験を行い、ワクチン株 B/Brisbane/60/2008（Victoria 系統）の抗血清に対して 8 倍以上の減少が見られた。ワクチン株 B/Bangladesh/3333/2007（山形系統）の抗血清に対しては、すべて HI 価<10 であった。

表 2 赤血球凝集抑制試験による抗原解析

株名	抗 A/California/07/2009(H1N1)pdm 血清
A/California/07/2009（ワクチン株）	5120
A/北九州/7/2010	2560
A/北九州/9/2010	2560
A/北九州/1/2011	≥20480
A/北九州/5/2011	2560
A/北九州/9/2011	2560

株名	抗 A/Victoria/210/2009 血清	
A/Victoria/210/2009（ワクチン株）	5120	2560
A/北九州/8/2010	160	
A/北九州/10/2011	1280	
A/北九州/11/2011		80
A/北九州/12/2011		320

株名	抗 B/Bangladesh/3333/2007 血清	抗 B/Brisbane/60/2008 血清
B/Brisbane/60/2008（Victoria 系統）		10240
B/Bangladesh/3333/2007（山形系統）	2560	5120
B/北九州/1/2011	<10	640
B/北九州/2/2011	<10	320
B/北九州/3/2011	<10	640

## (3) 薬剤耐性試験

分離・同定された AH1pdm 11 株について H275Y オセルタミビル耐性マーカーの有無を検査したところ、1 株から 275H/Y Mix 株を検出した（A/北九州/1/2011）。国立感染症研究所による試験の結果、感受性株と比較してオセルタミビルおよびペラミビルに対する感受性が低下していた。しかしながら Mix 株であるため、感受性の低下の程度は耐性参照株よりも少なかった。一方、ザナミビルおよびラニナミビルに対しては感受性を保持していた。

昨シーズンの AH1pdm 耐性株検出の際に実施された NA 遺伝子部分シーケンス法で A/北九州/1/2011 を検査したところ、明らかに 823 番目の塩基部分に C（275H）と T（275Y）の波形の重複が見られた。

## 4 まとめ

平成 22 年度は、昨年度に大流行した AH1pdm が再び流行し、1 月にはピークとなった。一方、昨シーズン（2009/2010 シーズン：2009 年 9 月～2010 年 8 月）検出されなかった AH3 亜型も今シーズンは検出された。1 月 25 日に搬入された検体のうち 8 件は、院内感染を疑わせる事例であり、その際 AH1pdm と AH3 との重複感染も 2 件検出されている。2 月に入って B 型も検出されるようになったが、年度末に近づくにつれて検体搬入数は減少し流行の終息をうかがわせた。

また、抗インフルエンザ薬剤耐性株サーベイランスにおいて、薬剤耐性・感受性 Mix 株が 1 件検出された。この事例は、患者体内においてウイルスが増殖する過程で耐性株が出現したと推測された。高病原性鳥インフルエンザウイルス（A/H5N1）によるヒトへのパンデミックが危惧されていることも含めて、今後もインフルエンザウイルスの発生動向に注意していく必要がある。

北九州市の無菌性髄膜炎等関連ウイルスの検出状況（平成12年～21年）

梨田実、村瀬浩太郎、河辺直美

1 はじめに

無菌性髄膜炎、手足口病、ヘルパンギーナの起因ウイルス（主にエンテロウイルス）は、年によって流行するウイルスの種類および血清型が入れ替わり、地域によって流行規模等に違いがあることが知られている。

そこで、過去10年間（平成12年～21年）の感染症発生動向調査事業（感染症サーベイランス）において検出されたエンテロウイルスの血清型や検出数の推移から市内における流行の特徴について調査したので、報告する。

2 調査内容

過去10年間の感染症サーベイランスにおける市内のエンテロウイルス等の検出状況の特徴について調査した。併せて、分離に使用した培養細胞のウイルス感受性について調査した。

（1）調査対象期間：平成12年～21年（各年1月～12月）

（2）調査対象ウイルス

コクサッキーA（CA）群ウイルス、コクサッキーB（CB）群ウイルス、エコー（E）ウイルス、エンテロウイルス（EV）71型、ポリオウイルス、ヒトパレコウイルス

（3）ウイルス分離および同定

ウイルスを分離するため、感染症サーベイランスで搬入された咽頭ぬぐい液等をHEp-2、RD-18S、Veroに接種した。5～7日で細胞変性効果（CPE）が確認されない場合は、3代継代を行った。3代目でCPEが確認されないときは、ウイルス分離陰性とした。CPEが確認された検体については抗血清による中和試験でウイルス種類・血清型を同定した。抗血清で中和できない株については、ダイレクトシーケンス法<sup>1)</sup>による相同性解析（BLAST検索）で同定を行った。

また、ヘルパンギーナの検体について培養細胞による分離が陰性的場合、乳のみマウスによる分離を行い、CF試験で同定した。

3 結果と考察

平成12年～21年の北九州市内の感染症サーベイランスにおいて606株のウイルスが分離された。同定の結果、CA群ウイルス10血清型183株、CB群ウイルス5血清型140株、Eウイルス14血清型234株、ポリオウイルス3血清型5株、EV71型22株、ヒトパレコウイルス1型3株、未同定19株であった。その検出状況について、年別の集計結果を表1に示した。

（1）市内のエンテロウイルスの検出状況

① CA群ウイルス（CA16を除く）

CA群の各型は、主にヘルパンギーナ患者から毎年約10～30件検出され、CA4は平成16年、CA6は平成19年、CA10は平成12、15年に多く検出された。平成13年は5件と少なく、14年は検出されなかった。CA群の分離において、培養細胞よりも乳のみマウスの方が感受性がよいことが知られているが、この両年は乳のみマウスでの分離を主に手足口病の検体について行っており、ヘルパンギーナの検体については、一部しか行っていないため、検出数に影響したことが考えられた。

表1 市内の年別エンテロウイルス検出状況

ウイルスの種類	H12	H13	H14	H15	H16	H17	H18	H19	H20	H21
CA2	—	—	—	6	3	1	2	—	3	1
CA3	—	—	—	—	—	1	—	—	1	—
CA4	3	—	—	2	11	—	9	—	8	—
CA5	—	—	—	—	1	3	—	2	—	4
CA6	—	2	—	1	2	7	—	15	—	6
CA9	3	3	—	7	—	—	—	—	—	5
CA10	14	—	—	14	—	6	1	2	4	4
CA12	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—
CA14	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—
CA16	—	—	1	—	10	—	—	4	9	—
CB1	—	—	—	7	2	—	—	—	—	—
CB2	—	—	5	2	3	—	5	2	—	1
CB3	1	2	13	—	1	6	—	—	1	—
CB4	9	21	1	1	—	4	5	2	2	10
CB5	—	3	—	12	4	1	—	2	12	—
E3	10	—	—	—	—	3	—	—	—	—
E5	1	—	—	—	—	—	—	1	—	—
E6	—	—	—	—	20	—	—	1	—	—
E7	—	—	—	1	15	—	—	—	—	—
E9	4	—	—	—	—	1	—	—	—	—
E11	—	46	—	—	—	—	2	—	—	—
E13	—	—	39	—	—	—	1	—	—	—
E14	—	—	—	—	—	—	2	—	—	—
E16	—	—	—	—	—	—	2	1	—	—
E17	—	—	—	—	—	—	2	—	—	—
E18	4	—	6	—	2	—	25	1	—	—
E25	6	—	—	—	1	—	1	—	—	1
E27	—	—	—	—	2	—	—	—	—	—
E30	—	—	25	1	—	—	—	—	6	1
EV71	9	—	—	10	—	—	—	2	—	1
ポリオウイルス1	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—
ポリオウイルス2	—	—	—	1	—	—	—	—	—	2
ポリオウイルス3	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—
ヒトパレコウイルス1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	3
N. T.	7	4	0	1	0	4	0	—	3	0

CA：コクサッキーA、CB：コクサッキーB、E：エコーウイルス、EV：エンテロウイルス、N. T.：未同定

他の年では、培養細胞で陰性であったヘルパンギーナの検体については、乳のみマウスによる分離も実施し、CA群ウイルスを多く検出している。これらのことから、ヘルパンギーナの検体については、培養細胞と乳のみマウスによる検出を組み合わせることが、より精度の高いウイルス検出につながると考えられた。

CA群ウイルスの検出数が少なかった他の要因として、平成13～14年頃のRD-18Sの細胞の状態が芳しくなく、その影響も考えられた。平成14年は全国でCA4が多く検出されており、細胞の状態がよければ、RD-18SでCA4を検出していたことが予想された。平成15年にRD-18Sを新たに入手し、現在まで、この細胞を継代してウイルス検出を行っている。このRD-18Sで平成22年度にCA4を多く検出していることから、平成13～14年に使用していたRD-18Sはウイルス感受性が低下していた可能性が考えられた。

ダイレクトシークエンス法による相同性解析により、当所で中和抗血清を保有していないCA5、CA12、CA14のウイルスを同定できたことは、同定試験法のひとつとして大いに期待される。一方、問題点も指摘<sup>2), 3)</sup>されており、現時点では、中和試験法を補完する試験法としてエンテロウイルス検査に用いることが肝要と考えられた。



② CB群ウイルス

無菌性髄膜炎の患者から検出されることが多いCB群ウイルスは、血清型により増減はあるもののほぼ毎年検出された。血清型別に見ると、CB3は平成14年、CB4は平成13年、CB5は平成15年、20年に多く検出された。

③ エコーウイルス

エコーウイルスは、無菌性髄膜炎の患者から検出されることが多く、その各型は数年～数十年の間隔を空けて流行する特徴がある。E3は平成12年、E6、7は平成16年、E11は平成13年、E13は平成14年、E18は平成18年、E30は平成14年に多く検出された。このようにCB群ウイルスと異なり毎年のように検出されることはなく、調査期間で大きな流行は各血清型とも1回しか見られなかった。

④ CA16、EV71

これらのウイルスは、手足口病の起因ウイルスであり、CA16は平成16、20年、EV71は平成12、15年に比較的多く検出された。平成13、14、17、18年にウイルスが検出されなかったが、これらの年の手足口病患者の検体搬入数が10以下であったことが影響したと考えられた。

(2) ウイルス感受性

過去10年間の感染症サーベイランスにおいてウイルス分離に使用した細胞の感受性について、細胞別のウイルス分離状況およびCPEの進行状況を調査した。その結果を表2に示した。

ポリオウイルスは、どの細胞でも分離でき、CPEも強かった。CB群ウイルスは、HEp-2、Veroで分離され、CPEは強く、RD-18Sでは分離されなかった。CA群、EウイルスはRD-18Sで多く分離されたが、概ねCA群ウイルスのCPEが弱かった。一方、Eウイルスは概ねCPEも強く、RD-18Sで多く分離されたが、血清型によっては（E6、7）RD-18SよりもHEp-2で分離されることが多かった。Veroではほとんど分離されなかった。CA16、EV71はVeroで分離されることが多く、EV71はRD-18Sでも分離されたが、CPEは弱～中程度であった。両ウイルスともHEp-2では分離されなかった。パレコウイルス1は、HEp-2でのみ分離された。

ウイルス感受性・CPE性状は、培養細胞の状態・継代歴、検体中のウイルス量、培養液・維持液の性状等により変化することが考えられ、同じ細胞名でも文献や他の研究所での感受性と異なることも予想される。また、分離例が少ないウイルスもあることから表2に示す結果は、分離実績のある他の研究所やラボで使用している細胞のウイルス感受性とは必ずしも一致しないことが考えられた。例えば、平成21年に分離したヒトパレコウイルス1は、3株ともHEp-2で分離され、Veroでは分離できなかったが、Veroにより分離実績を上げている報告<sup>4)</sup>がある一方、Veroで分離されずに、他の細胞（MRC-5）で分離した報告<sup>5)</sup>もある。

表2 細胞別のウイルス感受性

ウイルス	血清型	細胞の種類					
		HEp-2		RD-18S		Vero	
		分離	CPE	分離	CPE	分離	CPE
ポリオ	1-3	○	+++	○	+++	○	+++
CB	1-6	○	+++			○	+++
CA	2			○	+		
CA	4			○	++		
CA	5			△	+		
CA	6			○	+		
CA	9	△	++	○	++		
CA	10			○	++		
CA	12					△	+
CA	14					△	+
CA	16					○	+
E	3	○	+++	○	+++		
E	5			○	+++		
E	6	○	+++	△	+++		
E	7	○	+++	△	+++		
E	9			○	+++		
E	11	○	+++	○	+++		
E	13	○	+++	○	+++		
E	14			○	+		
E	16			○	+	△	+
E	17			○	+		
E	18			○	++		
E	25	○	+++	○	+++		
E	27			○	+		
E	30	○	+++	○	+++		
EV	71			△	++	○	++
ヒトパレコ	1	○	++				

分離：○よく分離できる、△：時々、分離できる

空欄：まれに分離できるか、ほとんど分離できない

CPE：+弱い、++中程度、+++強い

同定が困難な場合の事例報告<sup>6)</sup>にもあるように、感受性の違いやCPEの進行状況の違いは、同定時の判定に有用な情報であり、感染症サーベイランスでのウイルス分離実績を踏まえ、当所で使用している細胞のウイルス感受性の特徴を把握することは大切である。今後もウイルス分離実績を加え、培養細胞のウイルス感受性の特徴を把握して、ウイルス検査に生かすことで、検出・同定の精度をより向上させることができると考える。

#### 4 まとめ

今回、過去10年間の市内での無菌性髄膜炎等関連ウイルスの検出状況を解析した結果、606株のウイルスが分離され、数年ごとに流行するもの、10年に1回程度流行する例も見られた。

一方、限られた数の検体からのウイルス検出について、臨床診断疾病を考慮して、培養細胞による分離だけでなく、乳のみマウスによる分離も実施するなど検査方法を効果的に組み合わせることが検出精度を向上させ、また、培養細胞のウイルス感受性・CPE性状についても整理した結果を今後のウイルス検査に活用し、精度の高い判定が可能になると考えられた。

当所では、従来から感染症サーベイランスで搬入された検体について、ウイルス分離を行い、分離したウイルスの型別の同定する検査体制をとっている。ウイルス分離の特性として、分離株の抗原性を解析できること、ワクチン・抗ウイルス薬の開発に対応できること、想定外のウイルスにも対応が可能なことや時間はかかるが、比較的低コストなことが挙げられる。このウイルス分離の特性を見据えて、今後も分離培養する技術を維持しつつ、中和試験法と遺伝子解析法を効果的に組み合わせることで分離したウイルスを同定することにより精度の高い病原体情報提供ができると考えられた。

今後も研究所が地域での感染症の予防・対策の科学的・技術的中核機関であるには、ウイルス分離検査の特性を生かしたなかで、さらに新しい技術を積極的に取り入れた精度の高い病原体情報を提供することが重要である。

#### 《参考資料》

- 1) 「病原体検出マニュアル」(感染研・全国地衛研協議会編):「無菌性髄膜炎/RT-PCRによる遺伝子検出と塩基配列の解析(VP4-VP2領域の解析法)」
- 2) 病原微生物検出情報 Vol.26 No.9 237-238 (2005)
- 3) 病原微生物検出情報 Vol.30 No.1 10-12 (2009)
- 4) 臨床と微生物 Vol.36 No.3 187-192 (2009)
- 5) 感染症学雑誌 Vol.76 No.6 432-438 (2002)
- 6) 病原微生物検出情報 Vol.26 No.9 238 (2005)

北九州市のエコーウイルスの検出動向調査（平成12年～21年）

梨田実、村瀬浩太郎、河辺直美

1 はじめに

無菌性髄膜炎の起因ウイルスのひとつであるエコーウイルスは、年によって流行する血清型が入れ替わり、地域によって流行規模等に違いがあることが知られている。

そこで、過去10年間（平成12年～21年）の感染症発生動向調査事業（感染症サーベイランス）におけるエコーウイルスの検出状況・血清型から市内における流行の特徴について解析を行ったので、報告する。

2 調査内容

過去10年間の感染症サーベイランスにおける市内のエコーウイルス検出状況と全国の検出状況の動向を比較し、その特徴について調査した。併せて、市内および全国の無菌性髄膜炎の患者報告数の動向からエコーウイルスの流行について解析を行った。

（1）調査対象期間：平成12年～21年（各年1月～12月）

（2）エコーウイルス検出状況

市内における無菌性髄膜炎（その他の診断名を含む）の疾患患者の検体からのエコーウイルス検出数を年別に集計した。

全国のエコーウイルス検出数については、比較的大きな流行が見られ、市内でも検出されたエコーウイルスを選定し（3、6、11、13、18、30型）、病原微生物検出情報（感染研感染情報センター）の年別集計結果から引用した。また、全国の報告機関別の検出状況については、病原微生物検出情報（月報）の累計表（6月～11月）から引用した。

（3）患者報告数の推移

調査対象期間中の市内および全国における患者定点からの無菌性髄膜炎の患者報告数の推移を調査した。市内の患者報告数については「福岡県結核・感染症発生動向調査事業資料集」、全国の患者報告数については「感染症発生動向調査事業年報（感染研・感染情報センター）」から引用した。なお、市内の基幹定点からの報告数が少なく、年によっては「0」もあるため、小児科定点からの報告数（全国は基幹定点からの報告数）から引用した。

3 結果と考察

平成12年～21年の北九州市内の感染症サーベイランスにおいてエコーウイルス14血清型、234株のウイルスが分離された。市内のエコーウイルス検出状況について、年別の集計結果を表1に示した。また、全国の検出状況について、年別の集計結果を表2に示した。さらに、ウイルスの市内と全国の検出状況の推移について図1に示した。

（1）市内のエコーウイルスの検出状況（表1、図1）

エコーウイルスは無菌性髄膜炎の患者から検出されることが多く、その各型は数年～数十年の間隔を空けて流行する特徴がある。E3は平成12年、E6、7は平成16年、E11は平成13年、E13は平成14年、E18は平成18年、E30は平成14年に多く検出された。

（2）全国のエコーウイルス検出状況との比較（表2、図1）

全国の検出報告の状況を見ると、平成12年はE9、E25が多く検出された。平成13年はE11が多く検出された。平成14年はE13が多く検出され、特にE13は、この10年でどのエンテロウイルスよりも多く検出され、他の年は極端に少なかった。平成15年はE6、E30が多く検出された。平成16年はE6が多く検出された。平成17年はエコーウイ

表1 市内の年別エコーウイルス検出状況

血清型	H12	H13	H14	H15	H16	H17	H18	H19	H20	H21
E3	10	—	—	—	—	3	—	—	—	—
E5	1	—	—	—	—	—	—	1	—	—
E6	—	—	—	—	20	—	—	1	—	—
E7	—	—	—	1	15	—	—	—	—	—
E9	4	—	—	—	—	1	—	—	—	—
E11	—	46	—	—	—	—	2	—	—	—
E13	—	—	39	—	—	—	1	—	—	—
E14	—	—	—	—	—	—	2	—	—	—
E16	—	—	—	—	—	—	2	1	—	—
E17	—	—	—	—	—	—	2	—	—	—
E18	4	—	6	—	2	—	25	1	—	—
E25	6	—	—	—	1	—	1	—	—	1
E27	—	—	—	—	2	—	—	—	—	—
E30	—	—	25	1	—	—	—	—	6	1

E：エコーウイルス

ルスの検出は少なかった。平成18年は北九州市で3月下旬に搬入された検体からのE18の検出報告<sup>1)</sup>以来、西日本を中心に検出報告が続き、この10年で一番の検出数となった。平成19年はE30が多く検出された。平成20年はE30が多く検出された。平成21年は、多く検出されたエコーウイルスはなかった。

全国と市内での検出状況を年別に比較すると、平成12年はE3、E9、E25の全国検出数が10年間で最も多く、市内でも他の年に比べて、E3、E25の検出数がやや多かった。しかし、E9については、市内でも検出されたが、全国検出数185件(6月～11月累計)のうち宮崎県が103件と過半数を占めており、全国的な流行は小規模と考えるのが妥当と思われ、各県での検出状況の確認が欠かせない。

平成13年は、E11の全国の検出数198件(6月～11月累計)のうち中国・四国・九州地方で143件と検出数の70%以上を占め、主に西日本での流行と考えられ、市内でも多く検出された。平成14年は、全国のE11の検出数241件のうち、香川県からの検出数が219件と突出しているため、全国的な流行とは考えにくい。これも平成12年のE9のように、全国の検出数の多さと全国の流行規模は必ずしも一致していない例と考えられた。

平成14年は、E13が全国および市内において、この10年で最も多く検出され、全国的な流行と考えられた。一方、E30については、中国・四国・九州地方での検出数(6月～11月累計)が66件と全国102件の過半数を占めた。翌年、全国での検出数は385件(6月～11月累計)と増加したが、市内では1件(11月)しか検出されず、九州でも12件と検出数は少なかった。このように平成14、15年はE30の検出数に地域差が見られた。

平成15年は、E6の全国の検出数も295件(6月～11月累計)と多かったが、中国・四国・九州地方では6件と少なく、逆に平成16年は中国・四国・九州地方での検出数は69件(6月～11月累計)と全国の130件の過半数を占めた。このように西日本では、1年遅れてE6の流行となり、市内でも検出数が増加したと考えられた。

表2 全国の年別エコーウイルス検出状況

血清型	H12	H13	H14	H15	H16	H17	H18	H19	H20	H21
E3	112	24	1	3	88	63	—	—	5	28
E6	39	40	96	498	217	41	4	10	27	25
E9	250	11	170	128	17	101	46	42	63	52
E11	134	325	386	6	7	6	9	7	20	56
E13	—	49	2105	7	7	5	2	—	2	1
E18	65	62	22	84	101	15	573	28	41	21
E25	241	23	8	25	26	46	54	46	—	3
E30	41	21	150	492	109	43	136	221	238	35

E：エコーウイルス

(病原微生物検出情報から集計)

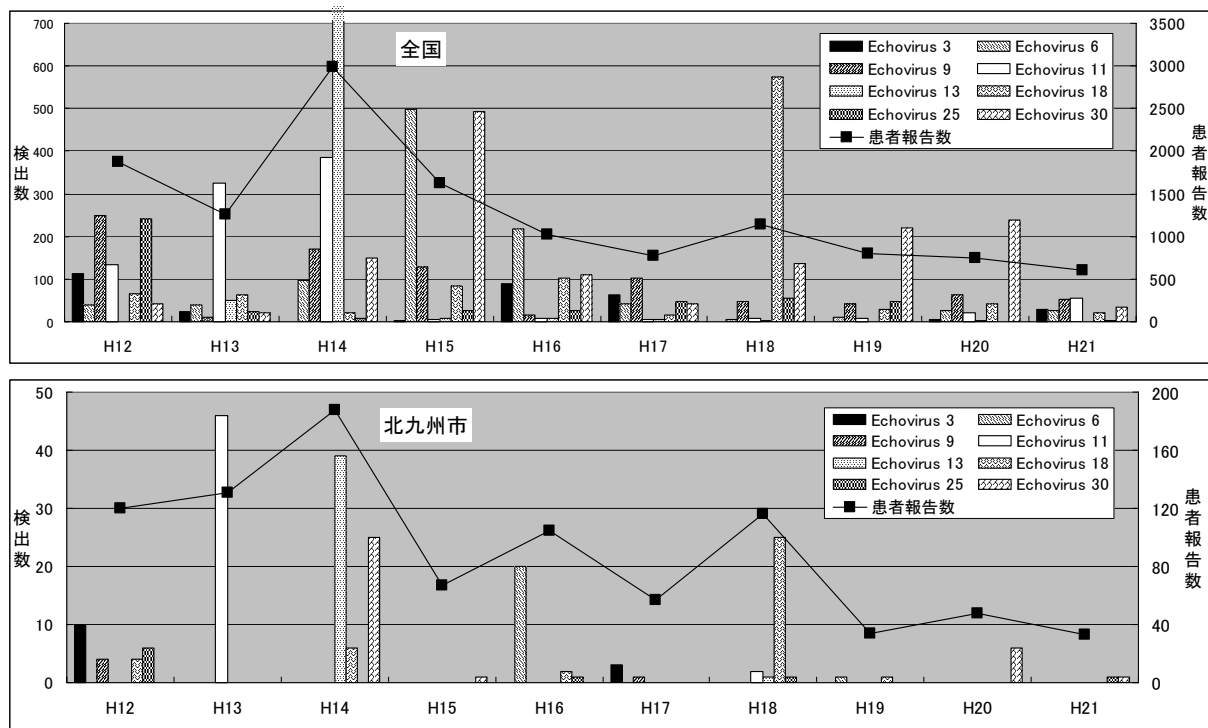


図1 エコーウイルスの検出および無菌性髄膜炎患者報告状況

平成16年は、E7も多く検出（全国での検出数は98件：表には未掲載）され、西日本での検出数（6月～11月累計）は全国の約60%（25/42）を占めていることから、小規模ではあるが、この地域での流行が考えられた。

平成17年は、例年になく全国でのエコーウイルスの検出数が少なく、特定の血清型が突出して検出されることもなく、市内でもE3が3件、E9が1件と少なかった。

平成18年は、北九州市からの検出報告後、九州、西日本、全国へと流行が拡大した例があった。市内で3月末の検体からE18の検出報告<sup>1)</sup>後、宮崎、大分など西日本を中心に検出報告<sup>2)</sup>が続き、その後も全国から検出されるようになり、この年の無菌性髄膜炎の主要原因ウイルスとなった。

平成19年はE30が全国で169件（6月～11月累計）検出され、中国・四国・九州地方で37件（大分県の19件、島根県15件）であったが、地域内での検出報告が偏っており、大分県を除いた九州および四国では検出報告がなかった。

平成20年もE30がやや多く、全国で120件（6月～11月累計）検出され、中国・四国・九州地方で前年とほぼ同数（35件）検出されたが、地域内での偏在は見られなかった。

平成21年は、平成17年と同様に全国でのエコーウイルスの検出数が少なく、特定の血清型が多く検出されることもなく、市内でもE25とE30が各1件検出されたのみであった。

### （3）無菌性髄膜炎の患者報告数の推移とウイルス検出状況

患者報告数は市内、全国でも平成14年が最も多く、それ以降は減少して最近の3年間は平成14年の1/3以下で推移している。平成14年は、全国および市内でも検出数が特に多かったE13の流行により患者報告数が増加したものと考えられた。

平成16年の患者報告数は、全国では前年より減少しているが、市内ではやや増加した。これは市内を含め西日本（全国の過半数を検出）で検出数の多かったE6およびE7の流行による影響と考えられた。

平成18年は、やや患者報告数が増加しており、全国および市内でも検出数の多かったE18による流行の影響と考えられた。このように特定のウイルスの流行が患者報告数の増加に影響していたことが確認され、病原体サーベイラ

ンスによるウイルス検出結果がその地域での感染症流行を把握するひとつの手段になることを示唆している。

#### 4 まとめ

今回、過去 10 年間の市内での無菌性髄膜炎等関連ウイルスのひとつであるエコーウイルスの検出状況を解析した結果、全国の検出動向と似た状況であったが、年によっては、市内および県内から九州、全国へと流行が拡大した例や全国一斉に流行せずに西日本と東日本で流行年が異なる例も確認された。また、平成 18 年の E18 のように北九州市が流行の情報発信となった例<sup>1)</sup>も見られた。

エコーウイルスの検出状況は、無菌性髄膜炎患者報告数の推移から市内の無菌性髄膜炎流行状況を反映していたことが確認された。このことから、市内の感染症サーベイランスにおける検出数は必ずしも多くはないが、無菌性髄膜炎流行に関連する病原体情報の提供できていたと考えられた。

市内におけるウイルス検出情報は、全国のウイルス検出状況と併せて解析することで、より詳細な病原体情報を提供が可能であり、今後の無菌性髄膜炎流行予測に貢献できると考えられた。

#### 《参考資料》

- 1) 病原微生物検出情報 Vol. 27 No. 6 13 (2006)
- 2) 病原微生物検出情報 Vol. 27 No. 9 14-15 (2006)

無菌性髄膜炎等関連ウイルスの分離・検出動向調査（平成12年～21年）（その3）  
北九州市の手足口病およびヘルパンギーナ関連ウイルスの検出状況（平成12年～21年）  
梨田実、村瀬浩太郎、河辺直美

## 1 はじめに

手足口病、ヘルパンギーナの起因ウイルス（主にコクサッキーA（CA）群ウイルス）は、年によって流行するウイルスの種類および血清型が入れ替わり、地域によって流行規模等に違いがあることが知られている。

そこで、過去10年間（平成12年～21年）の感染症発生動向調査事業（感染症サーベイランス）において検出されたウイルスの血清型や検出の推移から市内における流行の特徴について解析を行ったので、報告する。

## 2 調査内容

過去10年間の感染症サーベイランスにおける市内の手足口病、ヘルパンギーナの起因ウイルス検出状況と全国のこれらのウイルス検出状況の動向を比較し、その特徴について調査した。併せて、市内および全国の手足口病、ヘルパンギーナの患者報告数の動向から起因ウイルスの流行について解析を行った。

（1）調査対象期間：平成12年～21年（各年1月～12月）

（2）対象ウイルスの種類

コクサッキーA（CA）群ウイルス、エンテロウイルス（EV）71型

（3）ウイルス検出状況

市内における手足口病、ヘルパンギーナ等（その他の診断名を含む）の疾患患者の検体からの対象ウイルス検出数を年別に集計した。

全国の対象ウイルス検出数については、次の臨床診断名の主たる起因ウイルスのうち比較的大きな流行が見られ、市内でも検出されたウイルスを選定し、病原微生物検出情報（感染研感染情報センター）の年別集計結果から引用した。また、全国の報告機関別の検出状況については、病原微生物検出情報（月報）の累計表（6月～11月）から引用した。

① 手足口病：CA16型、EV71型

② ヘルパンギーナ：CA群ウイルス（2、4、6、9、10型）

（4）患者報告数の推移

調査対象期間中の市内および全国における患者定点からの手足口病、ヘルパンギーナの患者報告数の推移を調査した。市内の患者報告数については「福岡県結核・感染症発生動向調査事業資料集」、全国の患者報告数については「感染症発生動向調査事業年報（感染研・感染情報センター）」から引用した。

## 3 結果と考察

平成12年～21年の北九州市内の感染症サーベイランスにおいて、CA群ウイルス10血清型183株（うちCA16：24株）、EV71型22株であった。市内の対象ウイルス検出状況について、年別の集計結果を表1に示した。また、臨床診断名別対象ウイルスの全国の検出状況について、年別の集計結果を表2に示した。さらに、これらのウイルスの市内と全国の検出状況の推移について図1～2に示した。

（1）市内の対象ウイルスの検出状況

① CA16型、EV71型

表1 市内の年別エンテロウイルス検出状況

ウイルスの種類	H12	H13	H14	H15	H16	H17	H18	H19	H20	H21
CA2	—	—	—	6	3	1	2	—	3	1
CA3	—	—	—	—	—	1	—	—	1	—
CA4	3	—	—	2	11	—	9	—	8	—
CA5	—	—	—	—	1	3	—	2	—	4
CA6	—	2	—	1	2	7	—	15	—	6
CA9	3	3	—	7	—	—	—	—	—	5
CA10	14	—	—	14	—	6	1	2	4	4
CA12	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—
CA14	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—
CA16	—	—	1	—	10	—	—	4	9	—
EV71	9	—	—	10	—	—	—	2	—	1

CA：コクサッキーA群ウイルス、EV：エンテロウイルス

これらのウイルスは手足口病の起因ウイルスであり、CA16は平成16、20年、EV71は平成12、15年に比較的多く検出された。平成13、14、17、18年にウイルスが検出されなかったが、これらの年の手足口病患者の検体搬入数が10以下であったことが影響したと考えられた。

② CA群ウイルス（CA16型を除く）

CA群の各型は主にヘルパンギーナ患者から毎年約10～30件検出され、CA4は平成16年、CA6は平成19年、CA10は平成12、15年に多く検出された。平成13年は5件と少なく、14年は検出されなかった。CA群の分離において、培養細胞よりも乳のみマウスの方が感受性がよいことが知られているが、この両年は乳のみマウスでの分離を主に手足口病の検体について行っており、ヘルパンギーナの検体については、一部しか行っていなかったため、検出数に影響したことが考えられた。

他の年では、培養細胞で陰性であったヘルパンギーナの検体については、乳のみマウスによる検出も実施し、CA群ウイルスを多く検出している。これらのことから、ヘルパンギーナの検体については、培養細胞と乳のみマウスによる検出を組み合わせることが、より精度の高いウイルス検出につながると考えられた。

CA群ウイルスの検出数が少なかった他の要因として、平成13～14年頃のRD-18Sの細胞の状態が芳しくなく、その影響も考えられた。平成14年は全国でCA4が多く検出されており、細胞の状態がよければ、RD-18SでCA4を検出していたことが予想された。平成15年に新たに入手したRD-18Sを使い、平成22年度にCA4を多く検出していることから、平成13～14年に使用していたRD-18Sはウイルス感受性が低下していた可能性が考えられた。

(2) 全国のエンテロウイルス検出状況との比較

① 手足口病関連ウイルス（表2）

全国の検出報告の状況からEV71は3年周期で流行がみられ、平成12、15、18年に検出が多い。平成21年に流

表2 全国の年別ウイルス検出状況

主要臨床診断名	ウイルス	H12	H13	H14	H15	H16	H17	H18	H19	H20	H21
手足口病	CA16	218	320	426	142	190	272	195	347	473	49
	EV71	491	24	21	659	59	54	322	138	36	80
ヘルパンギーナ	CA2	24	161	4	67	177	25	63	27	149	13
	CA4	138	143	274	143	388	12	316	12	189	32
	CA6	81	67	124	72	29	412	3	256	104	180
	CA9	87	83	6	98	44	102	165	7	15	222
	CA10	284	31	24	382	5	101	24	136	102	143

CA：コクサッキーA群ウイルス、EV：エンテロウイルス

(病原微生物検出情報から集計)



行が予想されたが、検出数は少なく、夏季に新型インフルエンザが流行した影響が考えられた。平成 22 年に各地で手足口病の流行<sup>3)</sup>が見られ、EV71 の検出が増加しており、流行が 1 年遅れた様相を示した。

平成 13、14、17、19、20 年は CA16 が多く検出されており、EV71 に比べると、検出数の変動は小さかった。

これらの結果と市内での検出状況を比較すると、平成 12、15 年の EV71 の流行に合わせて検出数が増えたが、平成 12、15 年に比べると平成 18 年の全国の検出数も少ないためか、市内では検出されなかった。市内では、CA16 は検出されない年も多く、全国の検出動向と異なった状況であった。

② ヘルパンギーナ関連ウイルス（表 1、図 2）

全国の検出報告の状況を見ると、平成 12、15 年は CA10、平成 13 年は CA2、平成 14、16、18、20 年は CA4、平成 17、19 年は CA6、平成 21 年は CA9 が最も多く検出され、年によって流行する血清型が入れ替わるというエンテロウイルスの特徴が見られた。CA4 については隔年で検出数が増加する傾向がみられた。

これらの結果と市内での検出状況を比較すると、平成 13、14 年を除いて全国の検出状況とほぼ似ていた。前述したようにこの 2 年はヘルパンギーナの検体については一部しか乳のみマウスを使用していなかったことや RD-18S の状態が芳しくなかったためか、全国的には流行が見られたものの検出数が少なかった。

(3) 手足口病、ヘルパンギーナの患者報告数の推移と関連ウイルス検出状況

① 手足口病

手足口病の発生状況は地域差が見られ、その地域での流行年は異なっている。最近の流行は、EV71 か CA16 のどちらか単一のウイルスによって全国的な流行が一斉に起きずに、混在して流行する傾向にあることが知られている。

平成 13 年の患者報告数は比較的多かったが、搬入検体数が 6 と少なかったため、市内では EV71 または CA16 が検出されなかったと考えられた。

平成 14 年に市内では患者報告数が大きく減少しており、福岡県ほか九州各県でも前年の 1/10 以下であったことから全国に比べると九州での流行は小規模であったと考えられ、市内では CA16 が 1 件検出されたのみであった。また、平成 17、18 年も平成 16 年の 1/3~1/2 程度まで市内、福岡県・九州各県で患者報告数の減少が見られ、小規模な流行であった。平成 14、17、18 年は市内での流行の規模が小さく、そのため検体搬入数が減少（10 件以下）し、結果として EV71 または CA16 が検出されなかったことが考えられた。

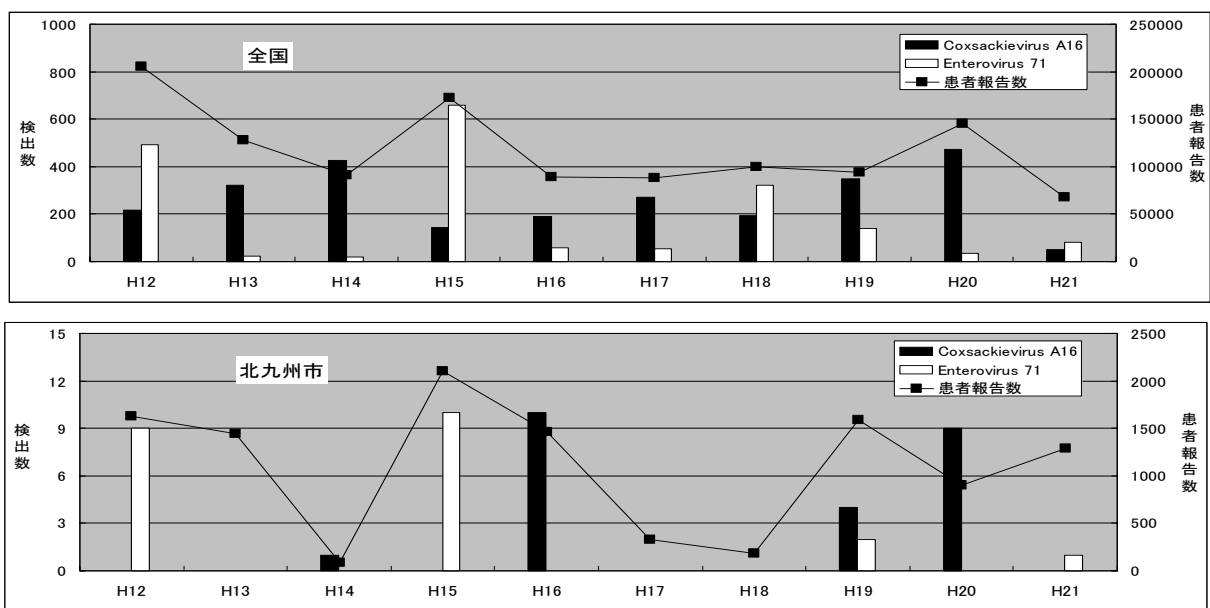


図 1 手足口病関連ウイルスの分離および患者報告状況

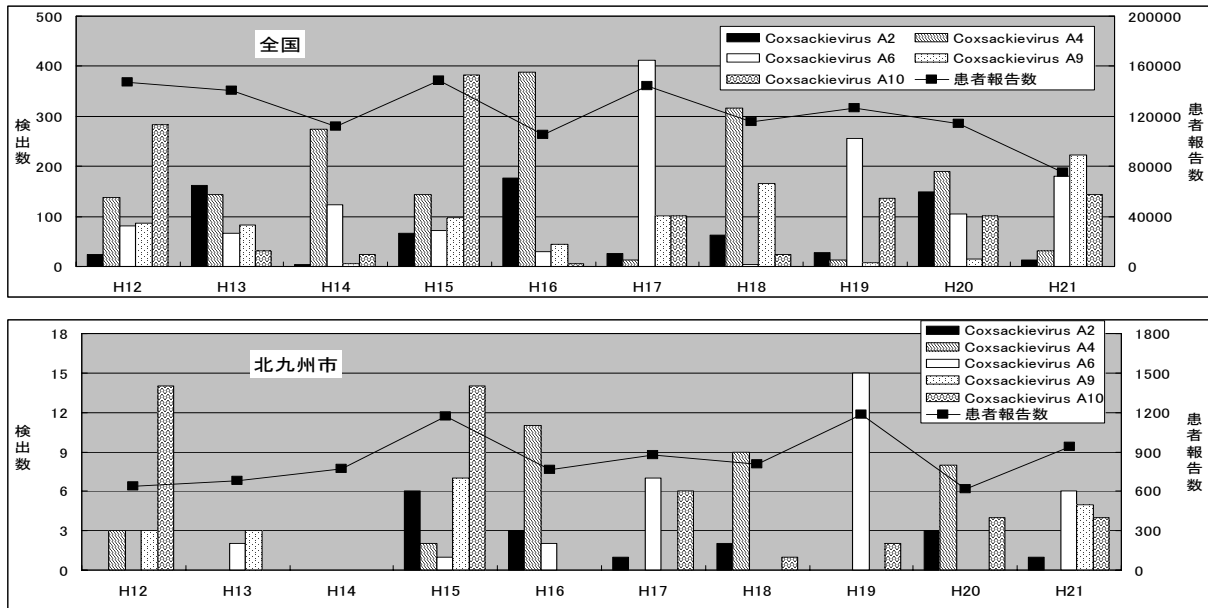


図2 ヘルパンギーナ関連ウイルスの分離および患者報告状況

## ② ヘルパンギーナ

平成12年～21年の患者報告数は、全国では130,000人前後、市内では850人前後で推移しており、全国と市内の患者報告数の増減状況も似ていた。検出ウイルスの種類の変動も、平成13、14年を除き、概ね全国の状況に近かった。市内の平成13、14年の検出数が少なかった要因については、前述のとおりであり、臨床診断疾病と検査方法の組み合わせによっては、起因ウイルスの流行を見落とししかねないことが考えられた。

## 4 まとめ

今回、過去10年間の市内での手足口病、ヘルパンギーナ等関連ウイルスの検出状況を解析した結果、全国の検出動向と似た傾向を示したが、種類によっては、市内および県内から九州、全国へと流行が拡大した例や全国一斉に流行せずに西日本と東日本で流行年が異なる例も確認された。

手足口病、ヘルパンギーナ等関連ウイルス検出数は、必ずしも多くはないが、検出状況はその地域の手足口病、ヘルパンギーナの流行状況を反映していたことが確認され、比較的精度の高い病原体情報の提供できていたと考えられた。

一方で、CA群ウイルスの検出数が低下していた例からヘルパンギーナ検体における乳のみマウスによるウイルス検査は有効な検査方法であると推察された。臨床診断疾病と検査方法を有効に組み合わせて実施することが、ウイルスの検出精度の向上につながると考えられた。

### 《参考資料》

- 1) 病原微生物検出情報 Vol.27 No.6 13 (2006)
- 2) 病原微生物検出情報 Vol.27 No.9 14-15 (2006)
- 3) 手足口病に関する注意喚起について (事務連絡 平成22年6月22日 厚生労働省健康局結核感染症課)
- 4) 感染症発生動向調査事業実施要綱の一部改正について (健発第0512003号、平成20年5月12日)

## —エンテロウイルス検査のダイレクトシーケンス法の応用について—

梨田実、村瀬浩太郎、河辺直美

### 1 はじめに

感染症発生动向調査事業（感染症サーベイランス）において無菌性髄膜炎、手足口病等の患者から採取した検体からはおもにエンテロウイルスが分離される。分離したウイルスについては、従来法として普及しているウイルス型特異的抗血清による中和試験法で同定を行っているが、エンテロウイルスは 67 種類と多く、当所で保管している中和同定用抗血清は 36 種類と限定されているため、しばしば同定が困難なことがある。また、ウイルスの種類によっては培養細胞での増殖が遅く、同定時の細胞変性効果（CPE）も弱いため、中和同定が困難な場合がある。そのため、再培養、再同定することになり、多くの時間、労力を要し、同定までに数ヶ月かかることも珍しくない。

近年、PCR 法・遺伝子解析法によるウイルス同定法が報告されるようになり、エンテロウイルスにおける検査法<sup>1)</sup>も整備されつつある。遺伝子解析法の特長として、迅速であること、高感度であること、遺伝子型・変異・薬剤耐性の解析に有効であることが挙げられている。

そこで、中和試験法による血清型の同定が困難なエンテロウイルス株について、シーケンサーを使った遺伝子解析法（ダイレクトシーケンス法—BLAST 検索）同定の検討を行った。

### 2 調査内容

#### (1) 遺伝子解析法（ダイレクトシーケンス法）

平成 12 年～21 年に感染症サーベイランスで分離されたエンテロウイルスの未同定株 20 株について、抽出したウイルス RNA をもと RT-PCR により DNA を増幅させ、塩基配列を決定後、相同性を解析することにより同定する遺伝子解析法（ダイレクトシーケンス法—BLAST 検索）<sup>1)</sup>の検討を行った。検査の概略を図 1 に示す。

##### ① 遺伝子抽出

RNA 抽出キット（QIAmp Viral RNA Mini Kit: QIAGEN 社）を用いてウイルス RNA を抽出した。

##### ② プライマーおよび PCR 条件

抽出した RNA を DNA に逆転写後、構造タンパクをコードする一部領域（VP4-VP2）についてプライマー（EvP4/OL68-1）<sup>1)</sup>を使って PCR により DNA を増幅させた。

増幅 DNA をアガロース電気泳動後、増幅産物（640bp）が確認できれば、エンテロウイルスと判定した。

##### ③ シーケンス反応

エンテロウイルスと判定した増幅産物は、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ABI3130x1（Applied Biosystems 社）により塩基配列を決定した。

##### ④ 相同性検索

塩基配列を決定後、インターネットを介して国立遺伝学研究所/DDBJ の登録データを使い、BLAST（Basic Local Alignment Search Tool）によって最も相同性の高い登録済みのエンテロウイルス株の血清型をその株の血清型と同定した。

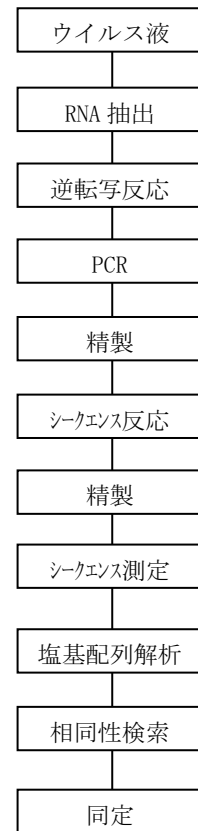


図 1 検査概略図

### 3 結果

平成 14～21 年に分離した未同定株の一部 (19 株) について、RT-PCR により遺伝子の一部を増幅後、その塩基配列から BLAST プログラムを用いた相同性検索により同定する方法で検討を行った結果、1 株を除き表 1 に示すようにコクサッキーA (CA) 群ウイルスとエコーウイルス (E) 同定された。分離に使用した細胞は、大部分が RD-18S であり、ウイルスの種類は平成 14 年の 6 株 (E18)、17 年の 1 株 (E9) 以外は CA 群ウイルスであった。

同定した株のうち 4 株は、そのウイルスの中和用抗血清 (CA5、CA12、CA14) を所有していなかった。また、比較塩基数が少なく、検索時のスコアが低かった平成 14 年の 6 株 (E18) について改めて中和試験を行い、E18 であることを確認した。

表 1 未同定株の BLAST 検索による相同性解析結果

年	番号	使用細胞	同定結果	相同性 (%) <sup>*</sup>	スコア (ヒット)	E-値
12	404	RD-18S	CA10	96 (560/581)	985	0.0
14	194	RD-18S	E18 <sup>2)</sup>	97 (202/207)	371	e-100
	195	RD-18S	E18 <sup>2)</sup>	97 (202/207)	371	e-100
	242	RD-18S	E18 <sup>2)</sup>	97 (202/207)	371	e-100
	243	RD-18S	E18 <sup>2)</sup>	97 (201/207)	363	3e-98
	270	RD-18S	E18 <sup>2)</sup>	97 (202/207)	371	e-100
	271	RD-18S	E18 <sup>2)</sup>	97 (202/207)	371	e-100
	507	Vero	CA16	96 (412/426)	733	0.0
16	451	Vero	CA16	97 (625/642)	1162	0.0
	469	RD-18S	CA2	96 (600/625)	1033	0.0
	607	Vero	CA16	97 (625/642)	1162	0.0
	690	RD-18S	CA2	92 (580/628)	864	0.0
17	193	Vero <sup>1)</sup>	CA14 <sup>3)</sup>	85 (522/610)	504	e-140
	277	RD-18S	E9	91 (591/643)	854	0.0
	413	マウス <sup>1)</sup>	CA12 <sup>3)</sup>	97 (617/634)	1122	0.0
	692	RD-18S	CA10	99 (648/653)	1255	0.0
18	518	RD-18S	CA4	97 (573/590)	1049	0.0
20	214	RD-18S	未同定	—	—	—
21	241	RD-18S	CA5	92 (589/637)	907	0.0

※ 最も高いスコアの登録株との相同性、() 内は比較塩基数

1) RD-18S で再培養後、同定 2) 中和試験結果 : E18 3) 中和用抗血清を未整備

### 4 考察

病原体サーベイランスにおいて、正確な情報を発信するために、研究所では精度の高い病原体検査システムが必要である。その上で、これに基づく検査を実施し、有用な病原体情報を提供することが重要となってくる。

病原体情報は、病原体を分離・検出する技術に依存し、結果が得られるまでには時間も要する。病原体の抗原性、遺伝子等の変化情報を得るためにも、まず、病原体を分離培養・同定する技術を維持し、感染研等が実施する技術研修により最新の技術を取り入れ、精度の高い病原体検査を行う必要がある。当所では、従来法から普及しているウイ

ルス分離を行い、分離したウイルスを中和試験により同定する検査体制をとっている。

一方、近年のウイルス検査における遺伝子解析法の応用には注目すべきものがあり、その特性として、迅速であること、高感度であること、遺伝子型・変異・薬剤耐性の解析に有効であることが挙げられる。この特性が生かされ、平成21年の新型インフルエンザウイルス検出にはリアルタイムPCR法が大いに役立ったことは周知のとおりである。

本研究によりウイルスの中和用抗血清を所有していない株についても同定可能となった。一般にRD-18Sで分離されるCA群ウイルスは感染価が低く、また、CPEも弱いため、中和試験を実施できないことがある。このような中和試験法では同定不能にせざるをえない感染価の上昇しない株についても遺伝子解析法の応用することでその血清型の同定が可能になることを示している。

一方、平成14年に未同定とした6株について検索時のスコアが低かったため、再度の中和試験でE18と同定できたことについては、シーケンスによる相同性検索結果に疑問がある場合は、最終的には中和試験法で確認することが必要と考えられた。

また、RD-18Sで分離された1株についてはシーケンスの波形が重なり、塩基の分離が不安定であった。BLAST検索でも相同性は低く、血清型を決定するには至らず、複数のウイルスが分離されている可能性も考えられた。

このように遺伝子解析同定法は迅速で正確な同定法として期待されるが、解析対象領域（VP1、VP4-VP2など）の違いによる増幅時の問題点、BLAST解析時の問題点などがある<sup>2),3)</sup>ため、今後も改良の必要があり、今のところエンテロウイルス遺伝子検査は標準化されていない。このことから、従来の中和試験法の補助的な役割として認識しておく必要がある。

#### 4 まとめ

感染症サーベイランスで分離したエンテロウイルスについては、中和試験法で同定を行ってきたが、中和抗血清が入手困難な場合、同定が不能であった。また、中和困難な株については、再同定のために多くの時間と労力を必要としてきた。今回、これらの株について遺伝子解析による同定法を行うことで、同定可能となり、時間と労力も軽減できることが予想され、検出精度を高めるための有効な手段となることが確認できた。

病原体の質的（抗原性、遺伝子）変化を検出するためにも、まず、ウイルスを分離培養する技術を維持し、ウイルス検査を行うことが大切であり、そのうえで、新しい技術を積極的に取り入れた精度の高い病原検出検査体制を整備することが重要と考えられた。

#### 《参考資料》

- 1) 「病原体検出マニュアル」（感染研・全国地衛研協議会編）
- 2) 病原微生物検出情報 Vol.26 No.9 237-238 (2005)
- 3) 病原微生物検出情報 Vol.30 No.1 10-12 (2009)