

ISSN 2433-5819

研 究 年 報

令和 5 年度

第 7 号

ANNUAL REPORT
OF
OSAKA INSTITUTE OF PUBLIC HEALTH

No.7

(2023)

目 次

報 文

大阪府における 2022 年の感染症発生動向 山中靖貴, 柿本健作, 鵜飼友彦, 西尾孝之, 西田陽子, 皐月由香, 三山豪士, 入谷展弘, 本村和嗣	1
大阪府における severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 の系統解析およびスパイクタンパク質の変異解析 若林友騎, 河原隆二, 柿本健作, 山口貴弘, 梅川奈央, 平井佑治, 西嶋駿弥, 森川佐依子, 廣井 聡, 白井達哉, 池森 亮, 阪野文哉, 岡田和真, 前田和穂, 小山芽以, 澁谷祐子, 徳永佑亮, 村野晃一, 永吉晴奈, 上野 亮, 北口大毅, 田上貴臣, 安達史恵, 阿部仁一郎, 森 治代, 本村和嗣, 川津健太郎	11
大阪府内における 2022/2023 シーズンのインフルエンザ流行状況 森川佐依子, 廣井 聡, 阿部仁一郎, 森 治代	25
大阪府におけるエンテロウイルス感染症の流行状況と分子疫学的解析 (2022 年度) 中田恵子, 前田和穂, 森 治代	34
大阪府における蚊媒介ウイルス感染症に対するサーベイランス調査 (2022 年度) 青山幾子, 池森 亮, 横田正春, 弓指孝博	43
大阪府の食中毒疑い事例で検出されたノロウイルスの遺伝子解析 (2022 年度) 白井達哉, 牛飼裕美, 山崎笑子, 左近直美	52
大阪健康安全基盤研究所における HTLV-1 確認検査 阪野文哉, 浜 みなみ, 川畑拓也, 森 治代	62
スイセン類による食中毒事例について 野村千枝, 山口瑞香, 新矢将尚	66
食品中の甘味料分析における荷電化粒子検出器の適用 新矢将尚, 山口之彦	72
水質検査における外部精度管理 (2021 年度) —六価クロム化合物— 安達史恵, 吉田 仁	79
大阪府における環境および食品中放射能調査 (令和 4 年度報告) 小池真生子, 小泉義彦, 肥塚利江, 大山正幸, 山口進康	86
大阪府内中核市における公衆浴場等浴槽水のレジオネラ属菌および水質状況調査 枝川亜希子, 安達史恵, 小池真生子, 肥塚利江, 松島加代, 土屋 誠	94
抄 録	
2022 年大阪府での異性間性的接触男性及び女性の梅毒報告数増加について (英文) 鵜飼友彦, 柿本健作, 川畑拓也, 三山豪士, 入谷展弘, 本村和嗣	102
配偶者の健康行動が他方に与える影響 (英文) 鵜飼友彦, 田淵貴大, 磯 博康	102
大阪府における新型コロナウイルス感染症の発症から届出までの時間に関連する因子 (英文) 三山豪士, 柿本健作, 入谷展弘, 本村和嗣	103

日本において新型コロナウイルス感染症の二次感染の過分散は時間経過とともに低下した (英文) 三山豪士, S. M. JUNG, 西浦 博	103
日本における RSV 感染症の流行期開始基準値の探索 (英文) 三山豪士, 柿本健作, 入谷展弘, 西尾孝之, 鶴飼友彦, 梶月由香, 山中靖貴, 西田陽子, 新谷 歩, 本村和嗣	104
逐次抽出法による畜水産物の筋肉および牛乳中の残留動物用医薬品の LC-MS/MS 一斉分析法 上村聖子, 先山孝則, 浅川大地, 山野哲夫	104
マルチプレックス・リアルタイム PCR を用いたジフテリア毒素産生性コリネバクテリウム・ウルセ ランスおよびコリネバクテリウム・シュードツベルクローシスの検出法 (英文) 川瀬 遵, 酒井智健, 岩城正昭, 梅田 薫, 福間藍子, 藤沢直輝, 川上優太, 林 宏樹, 和田美江子	105
大阪市で発生した原因不明の B 型乳児ボツリヌス症分離株の全ゲノム比較解析 (英文) 梅田 薫, 平井佑治, 中村寛海, 天羽清子	105
工場で炊飯された米飯による食中毒リスクの調査 梅田 薫, 松林雄一, 中村寛海, 松浦義治, 吉岡馨子, 奥原 潤	106
大阪府における侵襲性肺炎球菌感染症由来菌株の血清型分布 ; 2018~2021 年 河原隆二, 山口貴弘, 安楽正輝, 河合高生, 山地良彦, 西森彩音, 池条裕希絵, 上野菜美	106
Stx1a, Stx1c, Stx1d, Stx2a, Stx2b, Stx2c, Stx2d, Stx2e, Stx2f および Stx2g 遺伝子を検出す るためのリアルタイム PCR 法 (英文) 原田哲也, 若林友騎, 勢戸和子, 李 謙一, 伊豫田 淳, 川津健太郎	107
Ready-to-eat 食品製造環境のリストeria汚染状況と食品の特性に応じた汚染制御についての考察 中村寛海	107
日本のゴキブリによるパイナップルリリーへの訪花 (英文) 山崎一夫	108
室内塵中の皮膚糸状菌や好ケラチンカビと水虫症状 浜田信夫, 御厨真幸, 永目知広, 馬場 孝, 阿部仁一郎	108
麻疹排除後の集団免疫の減衰 : 大阪府における長期血清疫学調査 (2003-2020 年) (英文) 倉田貴子, 三山豪士, 上林大起, 改田祐子, 青山幾子, 池森 亮, 阪野文哉, 川畑拓也, 森 治代, 本村和嗣	109
風しん患者におけるウイルス RNA と感染性ウイルスの排出について (英文) 上林大起, 倉田貴子, 改田 厚, 久保英幸, 山元誠司, 江川和孝, 平井有紀, 岡田和真, 改田祐子, 池森 亮, 弓指孝博, 伊藤文美, 齊藤武志, 山地良彦, 西野裕香, 大森亮介, 森 治代, 本村和嗣, 生田和良	109
2011 年から 2021 年に大阪で麻しん又は風しんが疑われた症例におけるパルボウイルス B19 の寄与 (英文) 改田祐子, 上林大起, 倉田貴子, 森 治代	110
マルチプレックス PCR 検査が有用であった, 皮疹を伴わない水痘帯状疱疹ウイルス髄膜炎の 1 例	

西本風里, 酒井亮太, 大梅成崇, 植山浩一, 柿下優衣, 濱 浩隆, 若原良平, 西村 章, 上林大起, 中田恵子, 今村卓司	110
感染症流行予測調査事業・B型肝炎感受性調査結果(2018~2021年)-大阪府 阪野文哉, 川畑拓也, 浜 みなみ, 青山幾子, 倉田貴子, 上林大起, 池森 亮, 改田祐子, 森 治代	111
COVID-19 対策が小児感染症に与えた影響(英文) 左近直美, 高橋知子, 吉田俊明, 白井達哉, 駒野 淳	111
ノロウイルス感染に対するナノ抗体の乳酸菌 デリバリーベクター(英文) 幸 義和, F. Zuo, 黒河志保, 内田洋平, 佐藤慎太郎, 左近直美, L. Hammarström 清野 宏, H. Marcotte	112
合成樹脂製の器具・容器包装における溶出試験の精度の検証 尾崎麻子, 六鹿元雄, 岸 映里, 阿部智之, 阿部 裕, 安藤景子, 石原絹代, 牛山温子, 内田晋作, 大坂郁恵, 大野浩之, 風間貴充, 加藤千佳, 小林 尚, 佐藤 環, 柴田 博, 関戸晴子, 高島秀夫, 田中 葵, 外岡大幸, 花澤耕太郎, 山口未来, 山田悟志, 吉川光英, 渡辺一成, 佐藤恭子	112
台所用洗剤中のメタノール改良分析法の室間共同実験 阿部 裕, 阿部智之, 大野浩之, 大橋公泰, 尾崎麻子, 風間貴充, 片岡洋平, 鈴木公美, 永井慎一郎, 花澤耕太郎, 早川雅人, 平林直之, 山口未来, 渡辺一成, 六鹿元雄, 佐藤恭子	113
市販魚介加工品の総水銀調査 油谷藍子, 仲谷 正, 尾崎麻子, 山口之彦, 山野哲夫	113
物理的再生法により製造された PET ボトルを液状調味料および食用油の容器に適用した場合の安全 性評価 近藤康一, 小塚莉加, 桑垣傳美, 高橋章仁, 長野 学, 平野尚美, 廣澤 憲, 杉山健一, 尾崎麻子	114
固相カラムを用いた土壌・堆積物中メチル水銀の簡便・迅速な分析法の開発(英文) 柿本幸子, 吉光真人, 清田恭平	114
LC-MS/MS を利用した鶏卵酵素加水分解物に含まれるオポアルブミン分解度の測定(英文) 清田恭平, 吉光真人, 松井啓史	115
ポリエチレンテレフタレート(PET) ボトルに含まれる揮発性化合物の同定ならびに食品擬似溶媒 や清涼飲料水への短期および長期の移行について(英文) 尾崎麻子, 岸 映里, 大嶋智子, 角谷直哉, 阿部 裕, 六鹿元雄, 山口之彦, 山野哲夫	115
GC-MS を用いた合成樹脂製器具・容器包装に含まれる化学物質の同定 尾崎麻子, 水口(深瀬) 智晴, 岸 映里, 山口之彦, 山野哲夫	116
ヒトチトクローム P4501B1 および 2A13 による 3'-メトキシフラボン、4'-メトキシフラボン、および 3'、4'-ジメトキシフラボンおよび 5,7-ジヒドロキシ部分を有する誘導体の酸化(英文) 島田 力, 永吉晴奈, 村山典恵, 澤井亜月, V. KIM, D. KIM, 山崎浩史, F. P. GUENGERICH, 竹中重雄	116
スポンジたわしを介した調理用ボウル間的小麦アレルギーの二次汚染	

橋本博行, 池田達哉, 吉光真人, 清田恭平	117
2 次微分可視吸収スペクトルへの Multivariate Curve Resolution 法の適用によるシロップ中の 5 種の トリアリールメタン系着色料の同時定量法 (英文)	
松井啓史, 山崎朋美	117
エンメイソウについて HPLC によるエンメイン分析法の検討と市場品の分析	
田上貴臣, 石田晃大, 石原理恵, 伊藤美千穂, 大井逸輝, 岡坂 衛, 河端昭子, 酒井英二, 蔦原稜太, 西尾雅世, 松田久司, 森川敏生, 山本 豊, 横倉胤夫 . .	118
ハイスループットシーケンシングによる上水道配水システムにおける細菌多様性と群集構造の解 析 (英文)	
小泉義彦, 一條知昭, 内井喜美子, 那須正夫	118
二酸化窒素と喘息症状との関連における亜硝酸の役割: モルモットの特異的気道抵抗に対する亜硝 酸曝露の影響 (英文)	
大山正幸, 東 賢一, 峰島知芳, 竹中規訓, 安達修一	119
ナノポアシーケンサを用いた 16S rRNA 遺伝子アンプリコンシーケンスによる井戸水の衛生微生物 学的水質評価 (英文)	
味村真弓, 小泉義彦, 和田匡司, 一條知昭, 内井喜美子, 那須正夫	119
子どもにおける住宅内での有機リン系化合物の曝露と室内空気質の寄与 (英文)	
吉田俊明, 味村真弓, 左近直美	120
液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析計を用いた水道水中ペルフルオロアルキル酸の一斉分 析法開発と妥当性評価 (英文)	
小林憲弘, 高木総吉, 木下輝昭, 坂田 脩, 仲野富美, 渡辺直人, 野村あづみ, 河相暢幸, 平岩俊也, 奥村 学, 古川浩司, 粕谷智浩, 岩間紀知, 米久保 淳, 高原玲華, 田中誠也, 土屋裕子, 五十嵐良明	120
環境中の有機微量汚染物質の迅速かつ網羅的分析のための液体クロマトグラフィー四重極飛行 時間質量分析法を用いた新規自動同定・定量化データベースについて (英文)	
門上希和夫, 宮脇 崇, 高木総吉, 岩渕勝己, 戸渡寛法, 吉野共広, 八木正博, 会田祐司, 伊藤朋子, 竹峰秀祐, 中島大介, X. Li	121
高速液体クロマトグラフ質量分析計 (LC-MS/MS) を用いたアルデヒド前駆体 20 物質の一斉分析法 の開発	
小池真生子, 吉田 仁, 山口進康	121
大阪府内浄水場におけるフィプロニルおよびフィプロニル分解物 4 種の実態調査	
小池真生子, 長谷川有紀, 高木総吉, 吉田 仁, 安達史恵, 小泉義彦, 中島孝江, 竹中凜代, 山口進康	122
ガスクロマトグラフィー質量分析計 (GC/MS) を用いた水道水中イプフェンカルバゾンの分析法検討	
吉田 仁, 高木総吉	122
一般細菌検査における外部精度管理の試み	
安達史恵, 吉田 仁, 吉田直志, 谷口直生, 竹中凜代, 上澤行成, 山口進康 . .	123
学位論文概要	
CHERP による選択的 mRNA スプライシング制御	
山中靖貴	124

上水道配水システムにおけるハイスループットシーケンシングによる細菌の多様性と群集構造解析	小泉義彦	126
16S rRNA 遺伝子全長のアンプリコンシーケンスによる浅井戸の衛生微生物学的水質評価	味村真弓	128

ANNUAL REPORT OF OSAKA INSTITUTE OF PUBLIC HEALTH

CONTENTS

Original Articles

Surveillance of infectious diseases in Osaka Prefecture in 2022 (in Japanese)	Y. YAMANAKA, K. KAKIMOTO, T. UKAI, T. NISHIO, Y. NISHIDA, Y. SATSUKI, T. MIYAMA, N. IRITANI and K. MOTOMURA	1
Phylogenetic analysis and spike mutation profiles of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 in Osaka (in Japanese)	Y. WAKABAYASHI, R. KAWAHARA, K. KAKIMOTO, T. YAMAGUCHI, N. UMEKAWA, Y. HIRAI, S. NISHIJIMA, S. MORIKAWA, S. HIROI, T. SHIRAI, R. IKEMORI, F. BANNO, K. OKADA, K. MAEDA, M. KOYAMA, Y. SHIBUTANI, Y. TOKUNAGA, K. MURANO, H. NAGAYOSHI, R. UENO, D. KITAGUCHI, T. TAGAMI, F. ADACHI, N. ABE, H. MORI, K. MOTOMURA and K. KAWATSU	11
Epidemic situation of influenza during the 2022/2023 season in Osaka Prefecture (in Japanese)	S. MORIKAWA, S. HIROI, N. ABE and H. MORI	25
Epidemic situation and molecular-epidemiological analysis of enterovirus infection in Osaka Prefecture (Fiscal 2022 Report) (in Japanese)	K. NAKATA, K. MAEDA and H. MORI	34
Mosquito-borne virus surveillance in Osaka Prefecture (Fiscal 2022 Report) (in Japanese)	I. AOYAMA, R. IKEMORI, M. YOKOTA and T. YUMISASHI	43
Genetic analysis of norovirus outbreaks in case of food poisoning in Osaka Prefecture (Fiscal 2022 report) (in Japanese)	T. SHIRAI, Y. USHIKAI, E. YAMAZAKI and N. SAKON	52
HTLV-1 confirmation tests at Osaka Institute of Public Health (in Japanese)	F. BANNO, M. HAMA, T. KAWAHATA and H. Mori	62
Case study on Narcissus-induced foodborne illness (in Japanese)	C. NOMURA, M. YAMAGUCHI and M. SHINYA	66
Simultaneous analysis of sweeteners in foods using HPLC with charged aerosol detector (in Japanese)	M. SHINYA and Y. YAMAGUCHI	72
External quality control for the analytical method for the measurement of chromium (VI) in tap water, performed in 2021 in Osaka Prefecture (in Japanese)	F. ADACHI and J. YOSHIDA	79
Survey of environmental and food radioactivity in Osaka Prefecture (Fiscal 2022 Report) (in Japanese)		

M. KOIKE, Y. KOIZUMI, T. HIZUKA, M. OHYAMA and N. YAMAGUCHI	86
Survey of <i>Legionella</i> bacteria and water quality of bath water from public bathhouses in core cities, Osaka Prefecture, Japan (in Japanese) A. EDAGAWA, F. ADACHI, M. KOIKE, T. HIZUKA, K. MATSUSHIMA and M. TSUCHIYA	94
Abstracts	
Resurgence of syphilis in 2022 among heterosexual men and women in Osaka, Japan T. UKAI, K. KAKIMOTO, T. KAWAHATA, T. MIYAMA, N. IRITANI, and K. MOTOMURA	102
The impact of spousal behavior changes on smoking, drinking and physical activity: The longitudinal survey of middle-aged and elderly persons in Japan T. UKAI, T. TABUCHI and H. ISO	102
Factors associated with time lag between symptom onset and reporting in the first epidemic wave of COVID-19 in Osaka, Japan T. MIYAMA, K. KAKIMOTO, N. IRITANI, K. MOTOMURA	103
Decrease in overdispersed secondary transmission of COVID-19 over time in Japan T. MIYAMA, SM. JUNG, H. NISHIURA	103
Exploring the threshold for the start of respiratory syncytial virus infection epidemic season using sentinel surveillance data in Japan T. MIYAMA, K. KAKIMOTO, N. IRITANI, T. NISHIO, T. UKAI, Y. SATSUKI, Y. YAMANAKA, Y. NISHIDA, A. SHINTANI, K. MOTOMURA	104
LC-MS/MS method for simultaneous determination of veterinary drugs in muscle of animal and fishery products and milk using sequential extraction (in Japanese) M. UEMURA, T. SAKIYAMA, D. ASAKAWA and T. YAMANO	104
Rapid detection and discrimination of potentially toxigenic <i>Corynebacterium ulcerans</i> and <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> by multiplex real-time PCR and amplicon melting curve analysis J. KAWASE, T. SAKAI, M. IWAKI, K. UMEDA, A. FUKUMA, N. FUJISAWA, Y. KAWAKAMI, H. HAYASHI and M. WADA	105
Comparative whole-genome sequence analysis of a BoNT/B5-producing <i>Clostridium botulinum</i> isolate from an infant botulism case of unknown source in Osaka, Japan K. UMEDA, Y. HIRAI, H. NAKAMURA and K. AMO	105
The risk of food poisoning associated with cooked rice produced in rice cooking factory (in Japanese) K. UMEDA, Y. MATSUBAYASHI, H. NAKAMURA, Y. MATSUURA, K. YOSHIOKA and J. OKUHARA	106
Serotype distribution of isolates from Invasive Pneumococcal infections in Osaka: 2018-2021 (in Japanese) R. KAWAHARA, T. YAMAGUCHI, M. ANRAKU, T. KAWAI, Y. YAMAJI, A. NISHIMORI, Y. IKEJO and N. UENO	106
Real-time PCR assays to detect 10 Shiga toxin subtype (Stx1a, Stx1c, Stx1d, Stx2a, Stx2b, Stx2c, Stx2d, Stx2e, Stx2f, and Stx2g) genes T. HARADA, Y. WAKABAYASHI, K. SETO, K. LEE, S. IYODA and K. KAWATSU	107
Prevalence of <i>Listeria monocytogenes</i> in Ready-To-Eat food processing environments and consideration of contamination control according to food characteristics (in Japanese) H. NAKAMURA	107
Visitation of African pineapple lily flowers (<i>Eucomis autumnalis</i> (Mill.) Chitt. and <i>Eucomis comosa</i> Houtt. ex.	

Wehrh.) by Japanese cockroaches K. YAMAZAKI	108
Dermatophytes and other keratinophilic fungi in house dust and human ringworm patients (in Japanese) N. HAMADA, M. MIKURIYA, T. NAGAME, T. BABA and N. ABE	108
Increasing seroprevalence but waning herd immunity against measles after elimination: Longitudinal seroepidemiology of measles in Osaka Prefecture, Japan, 2003-2020 T. KURATA, T. MIYAMA, D. KANBAYASHI, Y. KAIDA, I. AOYAMA, R. IKEMORI, F. BANNO, T. KAWAHATA, H. MORI, and K. MOTOMURA	109
Shedding of rubella virus in postsymptomatic individuals; viral RNA load is a potential indicator to estimate candidate patients excreting infectious rubella virus D. KANBAYASHI, T. KURATA, A. KAIDA, H. KUBO, SP. YAMAMOTO , K. EGAWA, Y. HIRAI, K. OKADA, Y. KAIDA, R. IKEMORI, T. YUMISASHI, A. ITO, T. SAITO, Y. YAMAJI, Y. NISHINO, R. OMORI, H. MORI, K. MOTOMURA, and K. IKUTA	109
Contribution of parvovirus B19 in suspected cases of measles/rubella in Osaka, Japan, between 2011 and 2021 Y. KAIDA, D. KANBAYASHI, T. KURATA, and H. MORI	110
A case of varicella-zoster virus meningitis without rash diagnosed by multiplex PCR (in Japanese) N. NISHIMOTO, R. SAKAI, M. OUME, H. UEYAMA, Y. KAKISHITA, H. HAMA, R. WAKAHARA, A. NISHIMURA, D. KANBAYASHI, K. NAKATA and T. IMAMURA	110
The results of Hepatitis B Susceptibility Surveillance (2018-2021) in Osaka Prefecture in the National Epidemiological Surveillance of Vaccine -Preventable Disease (in Japanese) F. BANNO, T. KAWAHATA, M. HAMA, I. AOYAMA, T. KURATA, D. KANBAYASHI, R. IKEMORI, Y. KAIDA and H. MORI	111
Impact of COVID-19 countermeasures on pediatric infections N. SAKON, T. TAKAHASHI, T. YOSIDA, T. SHIRAI, J. KOMANO	111
Lactobacilli as a Vector for Delivery of Nanobodies against Norovirus Infection Y. YUKI, F. ZUO, S. KUROKAWA, Y. UCHIDA, S. SATO, N. SAKON, L. HAMMARSTRÖM, H. KIYONO, and H. MARCOTTE	112
Validation study on migration test for plastic food utensils, containers, and packaging (in Japanese) A. OZAKI, M. MUTSUGA, E. KISHI, T. ABE, Y. ABE, K. ANDO, K. ISHIHARA, A. USHIYAMA, S. UCHIDA, I. OHSAKA, H. OHNO, T. KAZAMA, C. KATO, H. KOBAYASHI, T. SATO, H. SHIBATA, H. SEKIDO, H. TAKASHIMA, A. TANAKA, H. TONOOKA, K. HANAZAWA, M. YAMAGUCHI, S. YAMADA, M. YOSHIKAWA, K. WATANABE and K. SATO	112
Inter-laboratory Study on the Modified Method Assessment for the Determining Methanol Content in Kitchen Detergents (in Japanese) Y. ABE, T. ABE, H. OHNO, K. OHASHI, A. OZAKI, T. KAZAMA, Y. KATAOKA, K. SUZUKI, S. NAGAI, K. HANAZAWA, M. HAYAKAWA, N. HIRABAYASHI, M. YAMAGUCHI, K. WATANABE, M. MUTSUGA and K. SATO	113
Survey of total mercury content in fishery products (in Japanese) A. YUTANI, T. NAKATANI, A. OZAKI, Y. YAMAGUCHI, and T. YAMANO	113
Safety evaluation of PET bottles regenerated through mechanical recycling for use as liquid-seasoning and edible-oil containers (in Japanese) K. KONDO, R. KOZUKA, D. KUWANAGA, A. TAKAHASHI, M. NAGANO, N. HIRANO, K. HIROSAWA, K. SUGIYAMA, and A. OZAKI	114
Development of a Solid Phase Extraction-Based Method for the Quantitative Analysis of Methylmercury in	

Soil and Sediment	S. KAKIMOTO, M. YOSHIMITSU and K. KIYOTA	114
Determination of degradation degree of ovalbumin in hen's egg enzymatic hydrolysates using liquid chromatography–tandem mass spectrometry	K. KIYOTA, M. YOSHIMITSU and H. MATSUI	115
Determination of potential volatile compounds in polyethylene terephthalate (PET) bottles and their short- and long-term migration into food simulants and soft drink	A. OZAKI, E. KISHI, T. OOSHIMA, N. KAKUTANI, Y. ABE, M. MUTSUGA, Y. YAMAGUCHI and T. YAMANO	115
GC-MS analysis for the identification of chemical substances in food utensils, containers and packaging (in Japanese)	A. OZAKI, C. MIZUGUCHI-FUKASE, E. KISHI, Y. YAMAGUCHI and T. YAMANO	116
Oxidation of 3'-methoxyflavone, 4'-methoxyflavone, and 3',4'-dimethoxyflavone and their derivatives having 5,7-dihydroxyl moieties by human cytochromes P450 1B1 and 2A13	T. SHIMADA, H. NAGAYOSHI, N. MURAYAMA, A. SAWAI, V. KIM, D. KIM, H. YAMAZAKI, F. P. GUENGERICH and S. TAKENAKA	116
Secondary contamination by wheat allergens across cooking bowls through the use of sponge scourers (in Japanese)	H. HASHIMOTO, T. M. IKEDA, M. YOSHIMITSU and K. KIYOTA	117
Simultaneous determination of five triarylmethane colorants in syrup by applying multivariate curve resolution to second-derivative visible absorption spectra	H. MATSUI and T. YAMASAKI	117
Studies on ISODONIS HERBA (in Japanese)	T. TAGAMI, A. ISHIDA, R. ISHIHARA, M. ITO, I. OI, M. OKASAKA, A. KAWABATA, E. SAKAI, R. TSUTAHARA, K. NISHIO, H. MATSUDA, T. MORIKAWA, Y. YAMAMOTO and T. YOKOKURA	118
Changes in bacterial diversity and community structure in drinking water distribution system revealed by high throughput sequencing	Y. KOIZUMI, T. ICHIJO, K. UCHII and M. NASU	118
Role of nitrous acid in the association between nitrogen dioxide and asthma symptoms: effect of nitrous acid exposure on specific airway resistance in guinea pigs	M. OHYAMA, K. AZUMA, C. MINEJIMA, N. TAKENAKA and S. ADACHI	119
Microbial water quality assessment of private wells using 16S rRNA gene amplicon sequencing with a nanopore sequencer	M. MIMURA, Y. KOIZUMI, M. WADA, T. ICHIJO, K. UCHII and M. NASU	119
Exposure to organophosphorus compounds of Japanese children and the indoor air quality in their residences	T. YOSHIDA, M. MIMURA and N. SAKON	120
Development and validation of an analytical method for simultaneous determination of perfluoroalkyl acids in drinking water by liquid chromatography/tandem mass spectrometry	N. KOBAYASHI, S. TAKAGI, T. KINOSHITA, O. SAKATA, F. NAKANO, N. WATANABE, A. NOMURA, N. KAWAI, T. HIRAIWA, M. OKUMURA, K. FURUKAWA, T. KASUYA, N. IWAMA, J. YONEKUBO, R. TAKAHARA, S. TANAKA, Y. TSUCHIYA and Y. IKARASHI	120
Novel automated identification and quantification database using liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry for quick, comprehensive, cheap and extendable organic micro-pollutant analysis in environmental systems		

K. KADOKAMI, T. MIYAWAKI, S. TAKAGI, K. IWABUCHI, H. TOWATARI, T. YOSHINO, M. YAGI, Y. AITA, T. ITO, S. TAKEMINE, D. NAKAJIMA and X. Li . . .	121
Development of an analytical method for simultaneous determination of the 20 aldehyde precursors using a high-performance liquid chromatograph-mass spectrometer (LC-MS/MS) (in Japanese) M. KOIKE, J. YOSHIDA and N. YAMAGUCHI	121
Presence of fipronil and four fipronil degradation products in raw and drinking water in Osaka, Japan (in Japanese) M. KOIKE, Y. HASEGAWA, S. TAKAGI, J. YOSHIDA, F. ADACHI, Y. KOIZUMI, T. NAKAJIMA, T. TAKENAKA and N. YAMAGUCHI	122
Development of an analytical method for ipfencarbazone in tap water using a gas chromatograph mass spectrometer (GC/MS) (in Japanese) J. YOSHIDA and S. TAKAGI	122
A trial of external quality assessment in standard plate count of tap water (in Japanese) F. ADACHI, J. YOSHIDA, N. YOSHIDA, T. TANIGUCHI, T. TAKENAKA, Y. UEZAWA and N. YAMAGUCHI	123
Thesis summary	
CHERP regulates the alternative splicing of pre-mRNAs in the nucleus Y. YAMANAKA	124
Changes in bacterial diversity and community structure in drinking water distribution system revealed by high throughput sequencing Y. KOIZUMI	126
Microbial water quality assessment of shallow wells using full-length 16S rRNA gene amplicon sequencing M. MIMURA	128

大阪府における 2022 年の感染症発生動向

山中靖貴^a, 柿本健作^a, 鵜飼友彦^a, 西尾孝之^a, 西田陽子^a,
梶月由香^a, 三山豪士^b, 入谷展弘^a, 本村和嗣^c

我が国において、新型コロナウイルス感染症に対するワクチン接種が進んだことや治療薬が使用されていることで、重症化や入院が抑制され、行動制限や感染防止対策が緩和されている。2022 年大阪府における定点把握感染症の発生動向について、2015～2019、2020 及び 2021 年と比較・検討した。定点把握感染症のうち、多くの感染症で 2022 年における報告数が 2021 年と比較して変化がなかったが、RS ウイルス感染症と突発性発しんは少なかった。我が国より早期に、新型コロナウイルス感染症対策を緩和または撤廃した諸外国では、他の感染症で陽性者数が増加または流行時期が例年と異なるものがあった。我が国もコロナ禍前の日常生活に戻りつつある中で、注意する必要がある。

キーワード：感染症発生動向調査、新型コロナウイルス感染症、2022 年、RS ウイルス感染症、突発性発しん

新型コロナウイルス感染症は、2019 年 12 月に中華人民共和国武漢市で感染者が初めて報告され、世界中に拡大している。南アフリカ共和国で 2021 年 11 月に初確認されたオミクロン株は、新規陽性者数が以前の従来株や変異株による感染拡大時よりも多いことから、感染力が高いと推察される一方、入院や重症化リスクが低い傾向があり¹⁴⁾、また、予防にワクチン接種が推奨され、治療でモノクローナル抗体や抗ウイルス薬が使用され、感染拡大を防止しながら、コロナ禍前の日常生活に戻す取組みが段階的に進められている⁴⁷⁾。

2022 年の大阪府における新型コロナウイルス感染症の新規陽性者数について、第 6 波が第 6 週（2 月 7 日～2 月 13 日）及び第 7 波が第 30 週（7 月 25 日～7 月 31 日）にそれぞれピークに達した（図 1）^{5,6)}。2022 年に大阪府では、まん延防止等重点措置が 1 度発令され、大阪府新型コロナ警戒信号（大阪モデル）の赤信号が 3 度点灯した。また、同年 7 月 1 日時点で、大阪府のワクチン 3 回接種率は全人口で 55.4%、9 月 1 日時点で、4 回接種率は同 20.5%に達

した⁴⁾。

我々は、コロナ禍における 2020、2021 年の大阪府及び全国の感染症発生動向の情報を収集・解析しており^{8,9)}、2022 年の大阪府における感染症の発生動向について、新型コロナウイルス感染症流行以前の過去 5 年（2015～2019 年）、2020 年及び 2021 年と比較または検討した。

方 法

調査期間は 2015 年から 2022 年までとして、2015～2019 年の過去 5 年間で平年とした。

対象疾患は感染症発生動向調査実施要綱に定める定点把握感染症のうち、小児科定点・インフルエンザ定点・眼科定点疾患（小児科・インフルエンザ・眼科定点）とした。

感染症サーベイランスシステム（National Epidemiological Surveillance of Infectious Disease、NESID）より大阪府における各年の感染症報告数情報を収集した。NESID の感染症報告数情報に

a 大阪健康安全基盤研究所公衆衛生部健康危機管理課

b 大阪健康安全基盤研究所公衆衛生部疫学解析研究課

c 大阪健康安全基盤研究所公衆衛生部

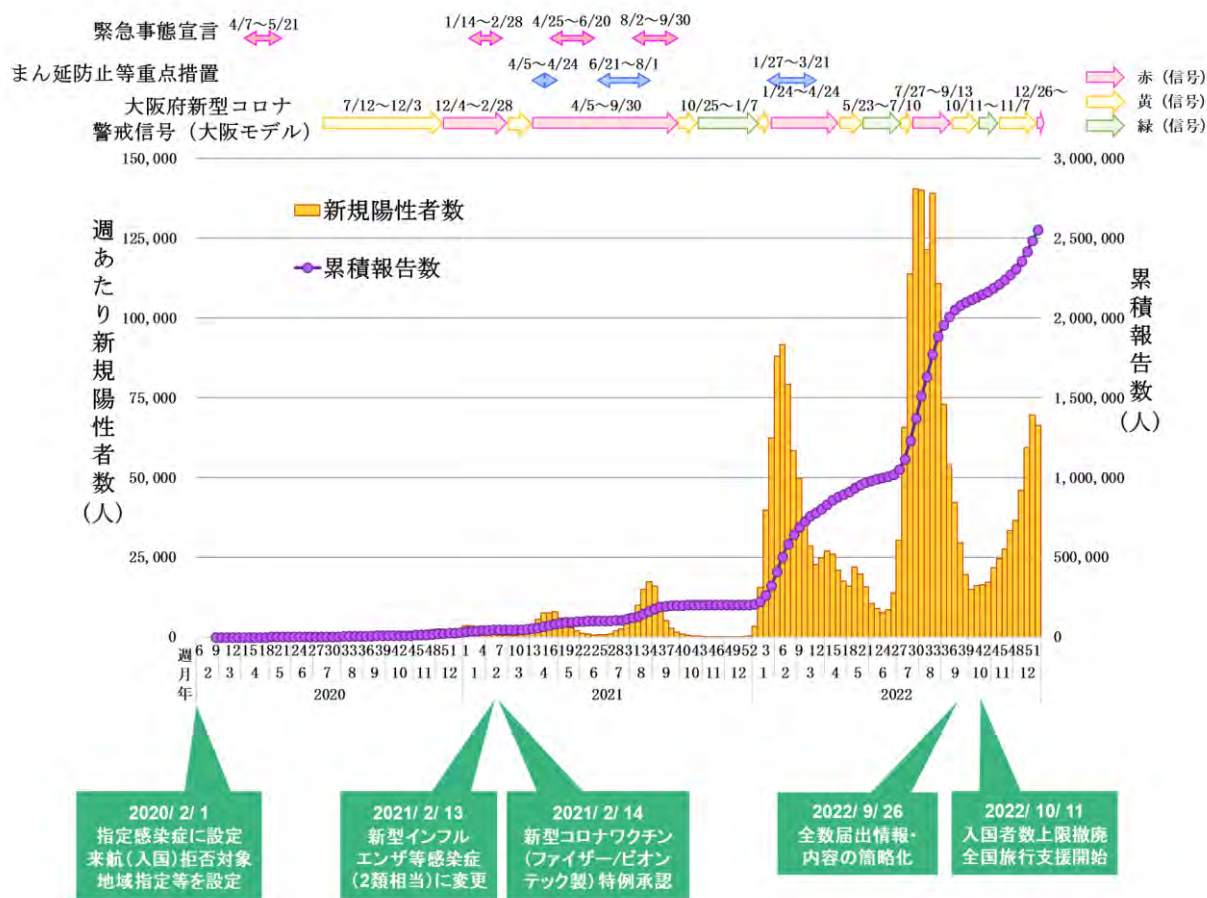


図1 大阪府における新型コロナウイルス感染症週別新規陽性者数・累積者数、規制状況 (大阪府感染症情報センター 新型コロナウイルス感染症 <http://www.iph.pref.osaka.jp/infection/disease/corona.html> を改変)

表1 2020、2021 及び2022 年の報告数と平年との比較表現

2020、2021 及び2022 年の累積報告数	平年との比較
平年 Avg* ¹ +3×平年 SD* ² 以上	多い (+++)
平年 Avg+2×平年 SD 以上	多い (++)
平年 Avg+3×平年 SD 未満	
平年 Avg+平年 SD 以上	多い (+)
平年 Avg+2×平年 SD 未満	
平年 Avg-平年 SD 以上	平年並み
平年 Avg+平年 SD 未満	
平年 Avg-2×平年 SD 以上	少ない (-)
平年 Avg-平年 SD 未満	
平年 Avg-3×平年 SD 以上	少ない (--)
平年 Avg-2×平年 SD 未満	
平年 Avg-3×平年 SD 未満	少ない (---)

*¹2015~2019 年までの年別定点あたり累積報告数の平均 [average、Avg (本稿では平年 Avg と称す)]

*²2015~2019 年までの年別定点あたり累積報告数の標準偏差 [standard deviation、SD (本稿では平年 SD と称す)]

は、週別の報告者数と定点あたり報告者数（週別の報告者数を定点医療機関数で除したもの）が含まれる。各年の週別定点あたり報告数の合計を年別の定点あたり報告数とし解析に用いた。

各感染症における平年の年別定点あたり報告数の平均 [average、Avg（本稿では平年 Avg と称す）] 及びその標準偏差 [standard deviation、SD（本稿では平年 SD と称す）] を算出した。2020、2021 及び 2022 年の報告数と平年 Avg を比較して、表 1 の通り分類するとともに、定点あたり報告数について、週毎の傾向を確認し、コロナ禍における感染症発生動向について検討した。

結 果

2020、2021 及び 2022 年について小児科・インフルエンザ・眼科定点に指定された大阪府の医療機関からの報告数の総計はそれぞれ 88,662、76,119 及び 68,598 例であり、年々減少していた。2020～2022 年の大阪府における定点把握感染症の年別定点あたり累積報告数及び平年との比較を表 2 に示した。2022 年は 2021 年と比較して、多くの感染症で変化がなく、多くなった感染症はなかった。他方、RS ウイルス感染症（2021 年：+++、2022 年：+）と突発性発しん（2021 年：--、2022 年：---）は少な

くなった。

RS ウイルス感染症は、定点あたり報告数が 2022 年第 25 週（6 月 20 日～26 日）で大阪府での流行期入りの目安 0.4 を超え¹⁰⁻¹²、第 29 週（7 月 18 日～24 日）に、2015 年以降で最も高いピーク（7.30）に達したが、ピークの時期が 7 月であった年は 2022 年以外になかった（図 2a）。また 2022 年の定点あたり累積報告数は、過去 10 年で最多の報告数が確認された 2021 年より少ないが¹⁰、平年と 2020 年より多かった（表 2、図 3a）。0～5 歳児の各年齢別感染者割合について、2022 年は 2021 年と比較して、大きな変化がなかった（図 4）

突発性発しんは、2022 年第 22 週（5 月 30 日～6 月 5 日）がピーク（0.44）で、第 8 週（2 月 21 日～27 日）が最も低い値（0.09）であった。年間を通して、毎週の定点あたり報告数は一定であった（図 2b）¹³。また 2015 年以降、定点あたり累積報告数が年々減少し、2022 年は最も少なかった（表 2、図 3a）。2007 年以降に大阪府において、0 歳児人口の減少と共に、年別定点あたり累積報告数が年々減少傾向であり（図 5a）¹⁴、0 歳の占める割合が減少した一方で、1～5 歳以上の割合が増加傾向であった（図 5b）。

インフルエンザと手足口病はそれぞれ 2021 年と 2022 年の間で報告数に変化がないという結果であったが（表 2）、両疾患とも平年、2020 または 2021

表 2 2020、2021 及び 2022 年の大阪府における定点把握感染症の年別定点あたり累積報告数及び平年との比較

感染症		平年Avg	平年SD	2020年	平年と2020年の比較*	2021年	平年と2021年の比較	2022年	平年と2022年の比較
小児科・インフルエンザ	インフルエンザ	272.70	60.49	143.69	— —	0.32	— — —	12.16	— — —
	RS ウイルス感染症	53.87	7.81	5.76	— — —	81.93	+ + +	62.85	+
	咽頭結膜熱	25.66	1.31	10.45	— — —	11.41	— — —	11.00	— — —
	A 群溶血性レンサ球菌咽頭炎	110.89	3.93	47.89	— — —	24.77	— — —	16.79	— — —
	感染性胃腸炎	304.24	42.55	120.88	— — —	190.58	— —	176.93	— —
	水痘	21.10	4.16	9.06	— —	4.90	— — —	3.78	— — —
	手足口病	78.84	55.87	3.17	—	40.06	平年並み	32.83	平年並み
	伝染性紅斑	16.57	13.67	3.85	平年並み	0.57	—	0.52	—
	突発性発しん	23.43	2.87	19.43	—	16.87	— —	13.22	— — —
	ヘルパンギーナ	29.87	7.42	7.93	— —	12.84	— —	10.14	— —
流行性耳下腺炎	25.39	27.73	2.85	平年並み	2.44	平年並み	1.97	平年並み	
眼科	急性出血性結膜炎	0.71	0.19	0.22	— —	0.29	— —	0.29	— —
	流行性角結膜炎	22.57	4.38	7.04	— — —	5.42	— — —	6.29	— — —

*平年との比較は、表1に従い分類した。

年と異なる挙動を示した。

インフルエンザは、2022年第51週（12月19日～25日）で流行期入りの目安1を超えて流行が始まり、第52週（12月26日～1月2日）には4.39に増加し（図2c）¹⁵⁾、年末にかけてインフルエンザウイルスAH3(A/H3)が増加傾向であった（表2）¹⁶⁾。インフルエンザの流行は2019/2020年シーズン以来

であった。2022年の定点あたり累積報告数も、2021年より増加した（表2、図3b）。

手足口病は2021年秋～冬に流行が認められたが、2022年第34週（8月22日～28日）で定点あたり報告数1を超え、第36週（9月5日～11日）でピーク（2.35）に到達した（図2d）¹⁷⁾。2022年第36週に記録したピークは、2015年以降隔年の流行で記録

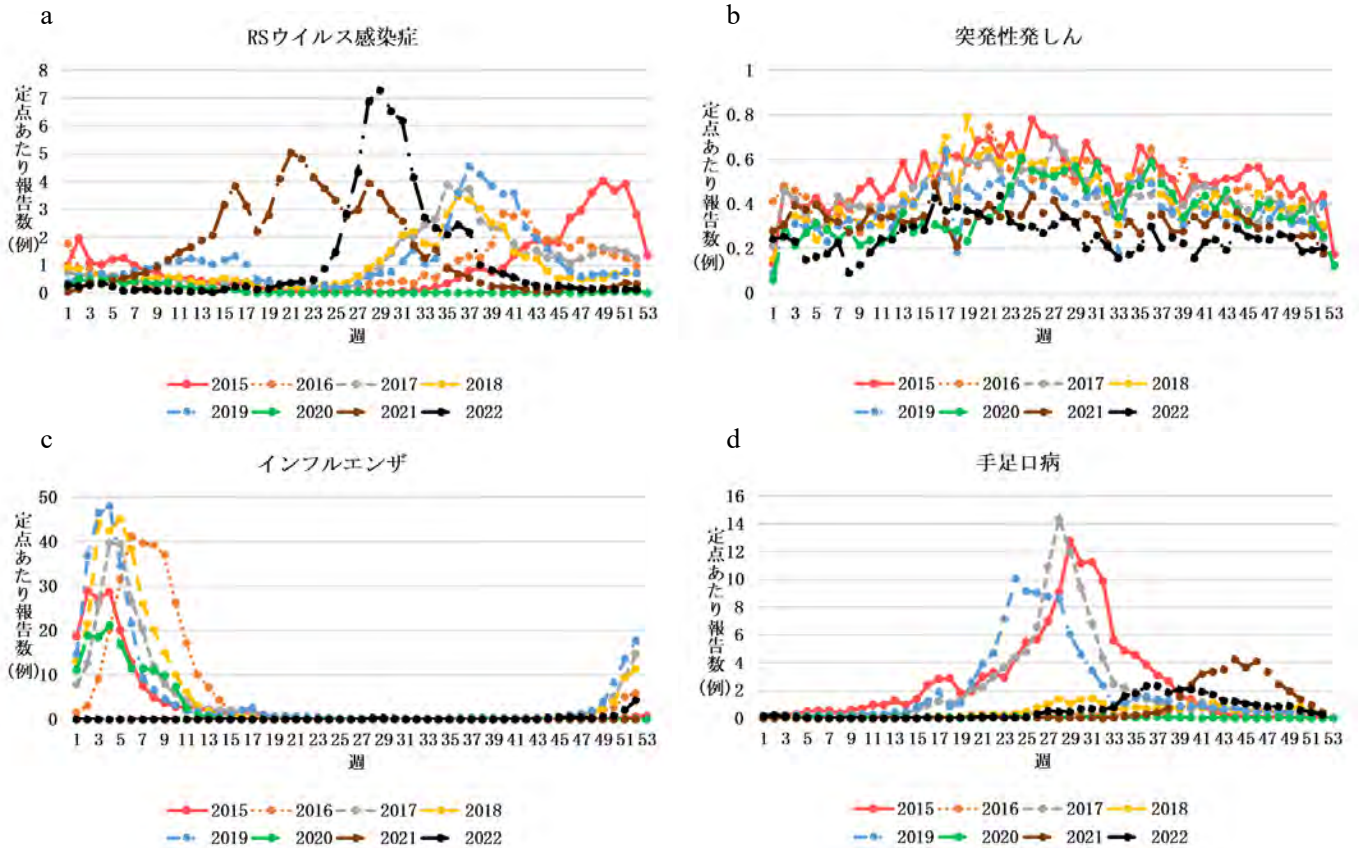


図2 2015～2021年大阪府における (a) RSウイルス感染症、(b) 突発性発しん、(c) インフルエンザ及び (d) 手足口病の週別定点あたり報告数

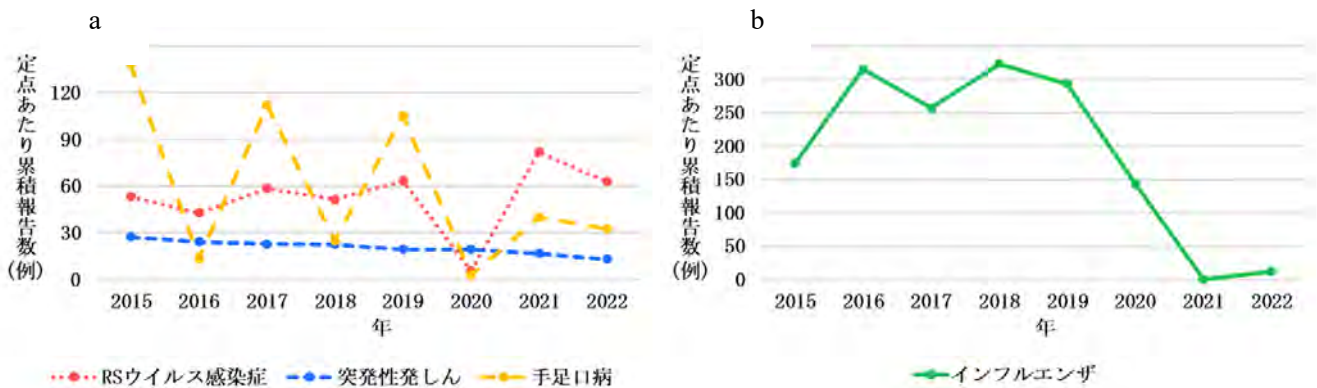


図3 2015～2022年大阪府におけるRSウイルス感染症、突発性発しん及び手足口病、(b) インフルエンザの年別累積報告数

したそれぞれのピークより低かった。また、2022年は2021年と比べて、定点あたり累積報告数は減少したが（表2）、定点あたり報告数が第34週に1を超えた後（図2d）、小規模な流行となり、主にコクサッキーウイルス A6 (Coxsackievirus A6, CA6) が確認された¹⁸⁾。

考 察

新型コロナウイルス感染症に対する感染症防止対策と社会経済活動の両立が進む中で、大阪府における定点把握感染症の小児科・インフルエンザ・眼科定点（医療機関）からの報告数は2020、2021年に引き続き2022年も減少した。

RSウイルス感染症について、2022年は2021年と比較して報告数が少なかったが、新型コロナウイルス感染症対策により、2021年に大きく増加した感受性個体の一部が2022年に先送りされたことで、平年と比べると多くなったと考えられる（表2）。また、2022年1～4、7～9月は新型コロナウイルス感染症が流行したことに伴い、全国的に保育園・保育所等の休園が増加した¹⁹⁾。先送りされた感受性個体が保育園・保育所等が再び開園した2022年5～7月にかけて感染し、報告数が急に増加したと推察される（図2a）。

突発性発しんは、季節性がほとんどなく、毎週の定点あたり報告数が一定している。2007年以降に大阪府のみならず全国でも、0歳児人口が減少し、年別定点あたり累積報告数は年々減少傾向である²⁰⁾。年別累積報告数が年々減少傾向であるのは、報告例の年齢が0歳と1歳で毎年80%以上を占める中で、0歳児の減少、つまり出生数の減少に依る影響が大きいと考えられる（図5）。

2021年と比較した2022年の報告数について、変化がなかった上記以外の感染症の感染経路は飛沫、接触または経口であるため、既報の通り、行動様式の変化、感染防止対策、渡航制限による影響を受けたと考えられた⁸⁹⁾。またこれらの感染症について、感受性個体数が増加していると考えられるが、流行が起きなかった詳細な原因は不明であった。

インフルエンザについて、2022年は6月にオーストラリアで主にA/H3、12月に米国や欧州でA/H3、A/H1N1pdm09及びB/Victoriaが検出されるなど、2021年より陽性者数が増加した国が確認された。米国では、新型コロナウイルス感染症パンデミックが始まった後、2020年4月以降2021年を含めて、陽性者数が例年と比較して少なかった²²⁻²⁴⁾。しかしながら、2022年3月に最も厳しい対策を講じたハワイ州を最後に全州でマスク着用義務を含む規制が撤廃された。その前後で全米における陽性者数が増

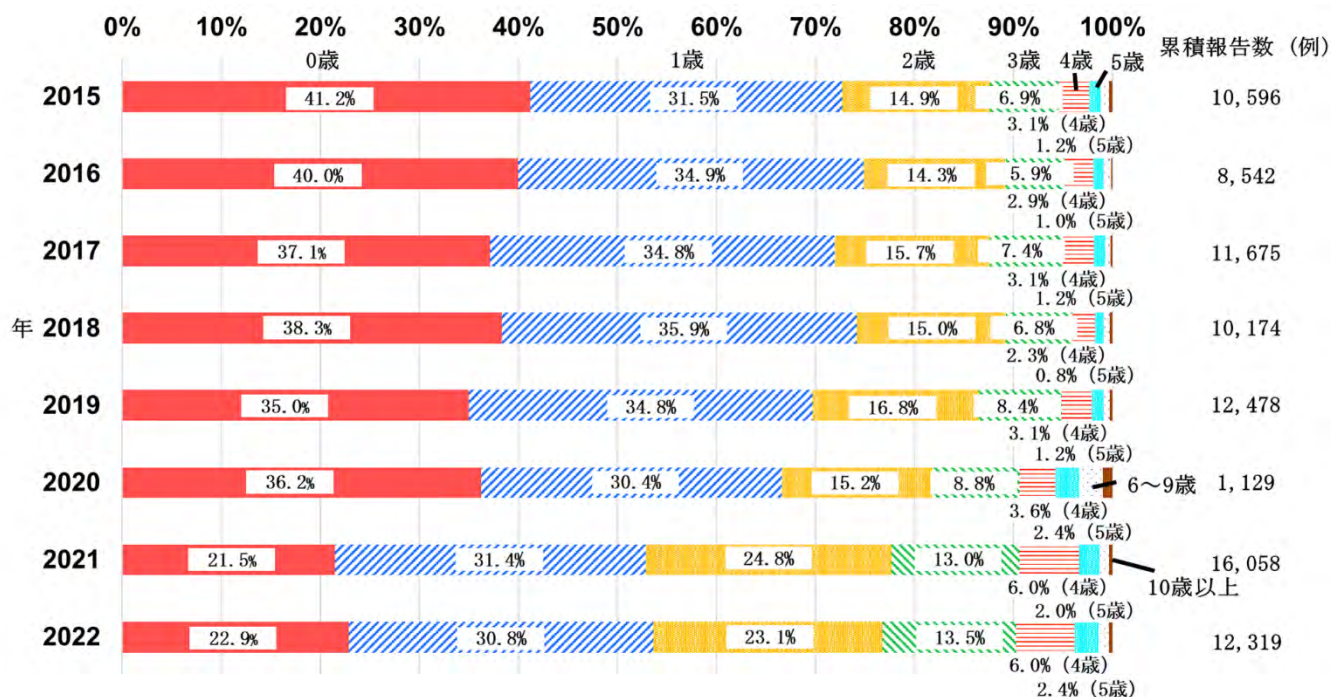
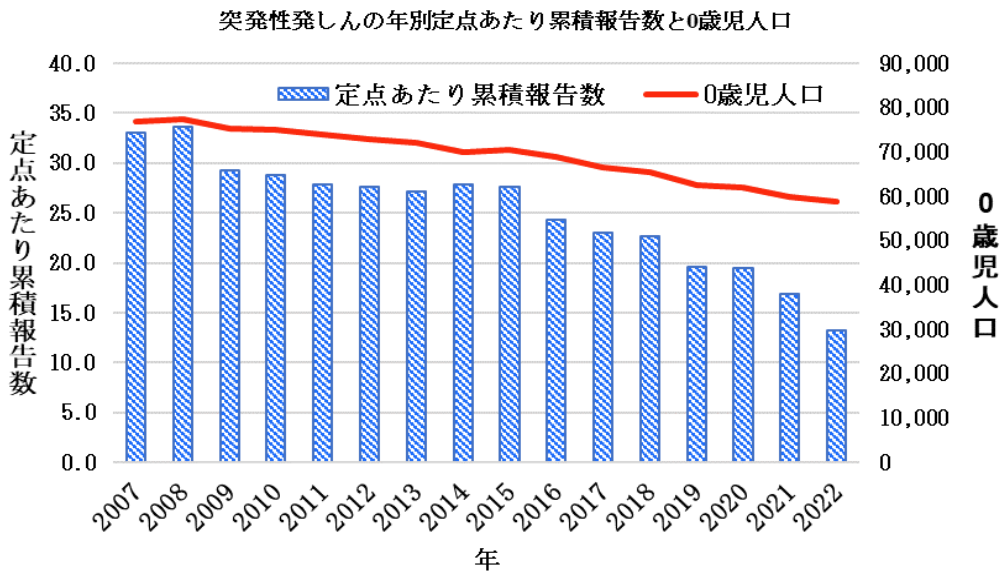


図4 2015～2022年大阪府におけるRSウイルス感染症の年別累積報告数と年齢階級別累積報告数の割合

a



b

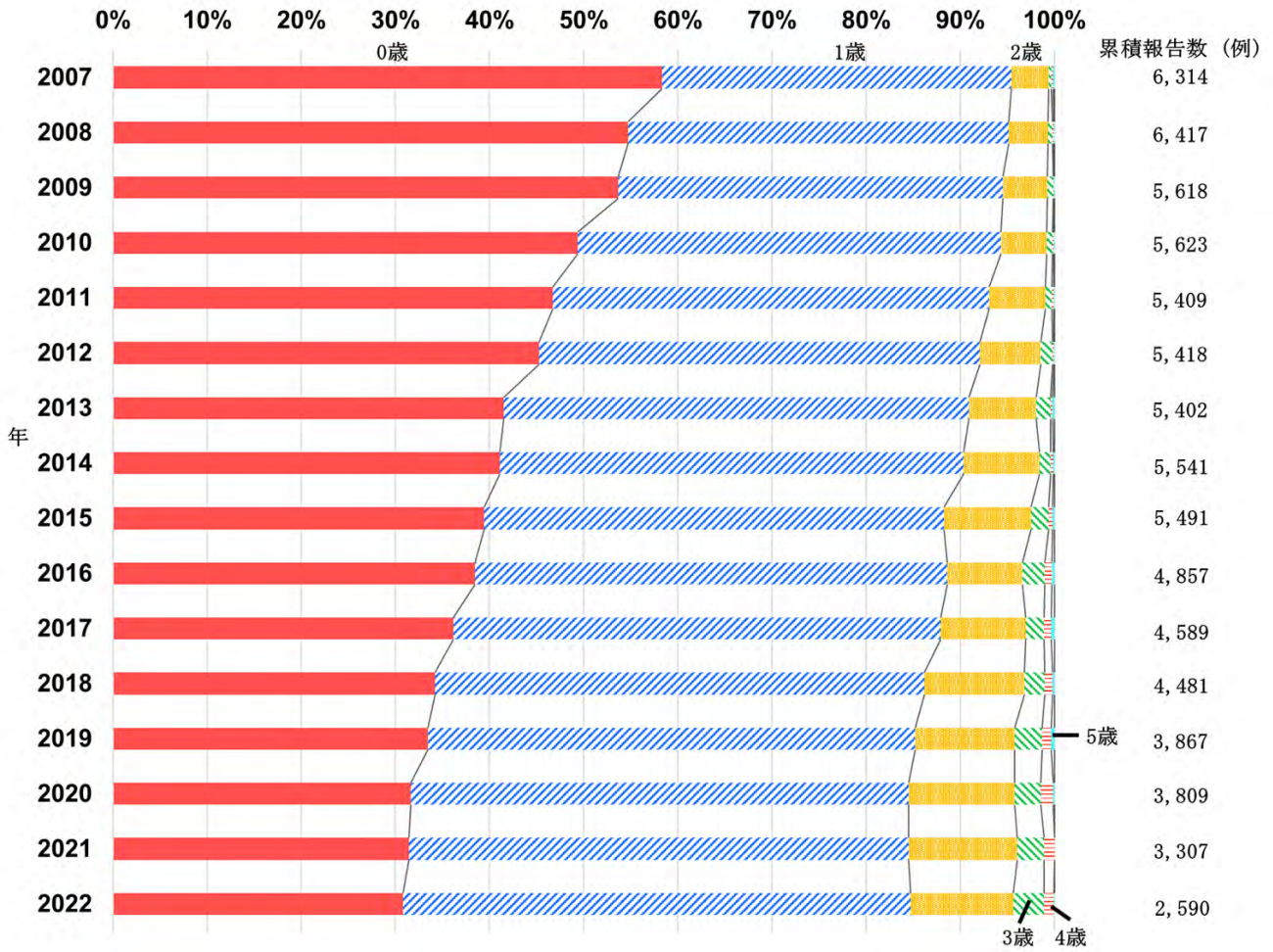


図5 2007～2022年大阪府における突発性発しんの (a) 年別定点あたり累積報告数と0歳児人口と (b) 0～5歳児の年別累積報告数と年齢別累積報告数の割合

加しており、2022/2023 年シーズンは、陽性者数が 2013～2014 年以降で最も多かった²⁵⁾。規制が緩和または撤廃されたことにより、人流が活発になり、陽性者数が増加したと考えられる。

手足口病については、平年では 2015、2017 及び 2019 年の隔年で CA6 が主に検出され^{26,27)}、夏に流行した²⁸⁾。2021 年は CA6 による流行が確認されたが²⁹⁾、秋～冬にかけて流行したことで、報告数が流行年と比較して大きく増加しなかった点が、平年と異なっていた⁹⁾。2021 年から 2 年続けて流行した原因の 1 つとして、2022 年に報告数が主に東日本で増加したことで、その影響が西日本にも及び、小規模な流行に繋がったと考えられる。

諸外国では我が国より早期に、新型コロナウイルス感染症に対する行動制限や感染防止対策に関する規制の緩和や撤廃が実施されている。そのような状況で、2023 年度に報告数が増加する可能性がある感染症の 1 つとして、2022 年に米国、英国、仏国、オランダ、アイルランドやスウェーデン等の欧米諸国で流行した A 群溶血性レンサ球菌咽頭炎が考えられる^{29,30)}。特に米国では、重篤な症状を呈する侵襲性 A 群レンサ球菌感染症が、例年の流行時期 11～3 月より早い 9～11 月に発生した³⁰⁾。また一部の州では、陽性者数が例年の水準を上回った³¹⁾。英国イングランド地方では、2022/2023 年シーズンの 2022 年第 28～46 週（第 38、41 週を除く）に報告された侵襲性 A 群レンサ球菌感染症陽性者数が各週いずれにおいても、2017 年第 37 週以降で最も多かった^{29,32)}。

我が国においても、行動制限や感染防止対策の緩和が段階的に進められており、2023 年以降の大阪府において、A 群溶血性レンサ球菌咽頭炎などの他の感染症発生動向に注意が必要である。

総括

コロナ禍では、報告数及び流行時期が平年と異なる動向を示す感染症が確認されている。2022 年大阪府における定点把握感染症の発生動向に関して、2021 年と比較して 2022 年における報告数が多くの感染症で変化がなかったが、RS ウイルス感染症と突発性発しんは少なかった。我が国より早期に、新型コロナウイルス感染症対策を緩和または撤廃した欧米などの諸外国では、インフルエンザや A 群溶血性レンサ球菌咽頭炎などで陽性者数

が増加または流行時期が例年と異なった。我が国もコロナ禍以前の日常生活に戻りつつあり、個々の感染症発生動向に注意する必要がある。

謝辞

本稿を執筆するにあたり、大阪府感染症発生動向調査にご協力賜りました自治体、保健所等の関係機関及び医療機関の皆様には深謝申し上げます。

利益相反

開示すべき利益相反はない。

文献

- 1) 厚生労働省 新型コロナウイルス感染症の国内発生動向
<https://www.mhlw.go.jp/content/10906000/001094012.pdf>
- 2) 厚生労働省 療養状況等及び入院患者受入病床数等に関する調査について
https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/newpage_00023.html
- 3) 厚生労働省 データからわかる—新型コロナウイルス感染症情報—
<https://covid19.mhlw.go.jp/>
- 4) 大阪府 保健・医療分野における第一波から第八波までの新型コロナウイルス感染症への対応
https://www.pref.osaka.lg.jp/attach/37375/00441611/03-2_bessatu.pdf
- 5) 大阪府感染症情報センター 新型コロナウイルス感染症
<http://www.ipf.pref.osaka.jp/infection/disease/corona.html>
- 6) 厚生労働省 水際対策強化に係る新たな措置（34）（外国人の新規入国制限、入国時検査、入国後待機及び入国者総数の管理の見直し）
<https://www.mhlw.go.jp/content/000993077.pdf>
- 7) 観光庁 全国旅行支援の実施について
https://www.mlit.go.jp/kankochonews06_000570.html
- 8) 梶月由香、本村和嗣、西田陽子、柿本健作、西尾孝之、三山豪士、入谷展弘、小林和夫. 大阪府における 2020 年感染症発生動向. *地方独立行政法人大阪健康安全基盤研究所研究年報*

- 令和3年度: 2021; 5, 1-10
- 9) 山中靖貴、梶月由香、西田陽子、柿本健作、鶴飼友彦、西尾孝之、三山豪士、入谷展弘、本村和嗣. 大阪府における2021年感染症発生動向. *地方独立行政法人大阪健康安全基盤研究所研究年報 令和4年度*: 2022; 6, 1-8
 - 10) 大阪府感染症情報センター RS ウイルス感染症 <http://www.iph.pref.osaka.jp/teiten/20210128105633.html>
 - 11) 大阪府感染症情報センター RS ウイルス感染症流行期入りの目安 <http://www.iph.pref.osaka.jp/040/20220616162424.html>
 - 12) Miyama T, Kakimoto K, Iritani N, Nishio T, Ukai T, Satsuki Y, Yamanaka Y, Nishida Y, Shintani A and Motomura K. Exploring the threshold for the start of respiratory syncytial virus infection epidemic season using sentinel surveillance data in Japan. *Front Public Health*. 2023; 11; 1062726.
 - 13) 大阪府感染症情報センター 突発性発しん <http://www.iph.pref.osaka.jp/teiten/20210128110059.html>
 - 14) 厚生労働省 人口動態調査 <https://www.mhlw.go.jp/toukei/list/81-1a.html>
 - 15) 大阪府感染症情報センター インフルエンザ <http://www.iph.pref.osaka.jp/teiten/20210127162117.html>
 - 16) 国立感染症研究所 都道府県別、分離・検出報告状況 2016/17～2022/23 シーズン *IASR* 2023年6月14日 https://www.niid.go.jp/niid/images/iasr/rapid/inf3/2019_36w/2223inf3_230614.gif
 - 17) 大阪府感染症情報センター 手足口病 <http://www.iph.pref.osaka.jp/teiten/20210128110012.html>
 - 18) 国立感染症研究所 都道府県別病原体別手足口病由来ウイルス 2022年 *IASR* 2022年12月30日作成 <https://www.niid.go.jp/niid/images/iasr/arc/ot/2022/data2022116j.pdf>
 - 19) 厚生労働省 保育所等における新型コロナウイルスによる休園等の状況 <https://www.mhlw.go.jp/content/11920000/001080493.pdf>
 - 20) 突発性発疹 2000～2020年 *IASR* 2020; 41: 211-212. <https://www.niid.go.jp/niid/ja/exanthem-subitum-m/exanthem-subitum-iasrtpc/9350-490t.html>
 - 21) 国立感染症研究所 注目すべき感染症 インフルエンザ *IDWR* 2023年第3号 <https://www.niid.go.jp/niid/ja/flu-m/flu-idwrc.html>
 - 22) 渡邊真治、長谷川秀樹. 2021/22 シーズンの世界のインフルエンザの流行状況について *IASR* 2022; 43: 255-257. <https://www.niid.go.jp/niid/ja/typhi-m/iasr-reference/2571-related-articles/related-articles-513/11630-513r04.html>
 - 23) 世界保健機関 Influenza surveillance report <https://www.who.int/teams/global-influenza-programme/surveillance-and-monitoring/influenza-surveillance-outputs>
 - 24) 世界保健機関 Influenza laboratory information virus detections by subtype reported to FluNet <https://app.powerbi.com/view?r=eyJrIjoiZTkxODcyOTYtZjA5YS00Zm00LWZkZGUtODIxNGI5OTE3YjM0IiwidCI6ImY2MTBjMGI3LWJkMjQfNGIzOS04MTBiLTNkYzI4MGFmYjU5MCIslmMiOjh9>
 - 25) アメリカ疾病予防管理センター Weekly U.S. Influenza Surveillance Report National Influenza and COVID-19 surveillance report Week 23 report (up to week 22 data) 8 June 2023
 - 26) 国立感染症研究所 手足口病 都道府県別主なエンテロウイルス 2009-2015年 *IASR* 2016年11月1日現在 https://www.niid.go.jp/niid/images/iasr/rapid/natsu/teashi/150903/tetizu_161101.gif
 - 27) 国立感染症研究所 手足口病 都道府県別主なエンテロウイルス 2016-2019年 *IASR* 2019年11月18日現在 https://www.niid.go.jp/niid/images/iasr/rapid/natsu/teashi/150903/tetizu_191118.gif
 - 28) 大阪府 感染症発生動向調査事業報告書 第38報 [2019年版]
 - 29) 世界保健機関 Increased incidence of scarlet fever and invasive Group A Streptococcus infection-multi-country Disease Outbreak News 15 December 2022 <https://www.who.int/emergencies/disease-outbreak-news/item/2022-DON429>
 - 30) アメリカ疾病予防管理センター Increase in Invasive Group A Strep Infections, 2022-2023 <https://www.cdc.gov/groupastrep/igas-infections-investigation.html#print>
 - 31) Meghan Barnes, Erin Youngkin, Jennifer Zipprich, Kayla Bilski, Christopher J. Gregory, Samuel R. Dominguez, Erica Mumm, Melissa McMahan,

Kathryn Como-Sabetti, Ruth Lynfield, Sopia Chochua, Jennifer Onukwube, Melissa Arvay, Rachel Herlihy. Notes from the Field: Increase in Pediatric Invasive Group A Streptococcus Infections Colorado and Minnesota, October–December 2022 *MMWR*, March 10, 2023, **72**, 10; 265–267
<https://www.cdc.gov/mmwr/volumes/72/wr/mm7210a4.htm>

- 32) 英国保健安全保障庁 Group A streptococcal infections: report on seasonal activity in England, 2022 to 2023 15 May 2023
<https://www.gov.uk/government/publications/group-a-streptococcal-infections-activity-during-the-2022-to-2023-season/group-a-streptococcal-infections-report-on-seasonal-activity-in-england-2022-to-2023>

WEB サイトの内容は 2023 年 8 月 4 日に確認した。

Surveillance of infectious diseases in Osaka Prefecture in 2022

Yasutaka YAMANAKA, Kensaku KAKIMOTO, Tomohiko UKAI, Takayuki NISHIO, Yoko NISHIDA,
Yuka SATSUKI, Takeshi MIYAMA, Nobuhiro IRITANI and Kazushi MOTOMURA

In Japan, vaccination and therapeutic drug usage for coronavirus disease 2019 (COVID-19) have progressed and the restrictions on COVID-19 have been relieved. In this study, we surveyed infectious diseases other than COVID-19 in the Osaka Prefecture in 2020, 2021, and 2022. Among sentinel infections, the number of reported infections in 2022 was unchanged compared to that in 2021 for most infections. However, the number of respiratory virus infections and exanthem subitum cases were low. Conversely, the legal restrictions against COVID-19 in other countries were deregulated and abolished earlier than those in Japan. In these countries, the number of positive cases for other infectious diseases increased or the epidemic period showed behavior that was different from usual. As we return to our daily lives before the COVID-19 pandemic, we must pay attention to trends in other infectious disease outbreaks.

Key words: surveillance of infectious diseases, coronavirus disease 2019 (COVID-19), 2022, RS virus infection, exanthem subitum

大阪府における severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 の系統解析 およびスパイクタンパク質の変異解析

若林友騎, 河原隆二, 柿本健作, 山口貴弘, 梅川奈央, 平井佑治, 西嶋駿弥, 森川佐依子, 廣井 聡,
白井達哉, 池森 亮, 阪野文哉, 岡田和真, 前田和穂, 小山芽以, 澁谷祐子, 徳永佑亮, 村野晃一,
永吉晴奈, 上野 亮, 北口大毅, 田上貴臣, 安達史恵, 阿部仁一郎, 森 治代, 本村和嗣, 川津健太郎

2022年1月1日から2022年12月31日までに大阪府内で検出され、全ゲノム配列が解読された severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) について、全ゲノム配列情報に基づく分子系統解析およびスパイク (S) タンパク質の変異解析を実施した。第1週～第10週までは優勢な遺伝子系統が認められたが、第11週以降は同時期に多様な遺伝子系統株が検出された。S タンパク質の変異解析では、特定のアミノ酸残基に置換が集中しており、特に免疫逃避に関与するアミノ酸残基においては、収斂進化が起こっていることが示唆された。今後の SARS-CoV-2 のゲノムサーベイランスにおいては、遺伝子系統解析に加えて、S タンパク質を中心とした変異解析が重要であると考えられた。

キーワード：severe acute respiratory syndrome coronavirus 2、分子疫学解析、全ゲノム配列解析、S タンパク質、receptor binding domain

Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) は新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) の原因ウイルスである。29.9 kb の一本鎖 RNA ゲノムを有する SARS-CoV-2 は、そのゲノム複製の過程で少しずつゲノム上に変異を蓄積する。2019 年末に中国で初めて検出された SARS-CoV-2 は、2023 年 6 月 2 日時点で、複数の懸念される変異株 (Variants of concern, VOC) を含む 2,500 以上の遺伝子系統に進化している¹⁾。Nextstrain による初期の分子系統解析では、SARS-CoV-2 の変異蓄積速度は 8×10^4 塩基置換/サイト/年と推定されたが²⁾、VOC は Stem Branch において高度な変異蓄積が報告されている³⁾。特に VOC Omicron では、それまでの VOC と比較して、スパイク (S) タンパク質領域に高頻度な変異蓄積が認められている⁴⁾。

S タンパク質は、宿主細胞の受容体と結合し、ウイルスの細胞侵入に関与する。S タンパク質は、受容体結合に関与する S1 と膜融合に関与する S2 の 2 つに大きく分けられており、S1 はさらに N 末端ドメイン (N-terminal domain, NTD) と受容体結合ド

メイン (Receptor binding domain, RBD) の 2 つの領域に分けられる。このうち RBD は、受容体であるアンギオテンシン変換酵素 2 (ACE2) との結合にかかわる領域であることから、RBD 上に生じた変異は、ACE2 との結合効率に影響を与えると考えられている⁵⁾。RBD は、中和抗体の主要な結合部位の 1 つでもあることから、RBD 上の変異はウイルスの免疫逃避にも関係すると考えられている⁶⁾。

SARS-CoV-2 の系統分類法としては、2 種類の分類法が主に使用されており、それぞれ異なるアルゴリズムに基づいて遺伝子系統が決定される。すなわち、Nextstrain チームが提唱した Clade 分類は、ゲノム上の特徴的な塩基置換の有無に基づいて、SARS-CoV-2 を分類する方法である⁷⁾。一方、O'Toole らが提唱した PANGO 系統は、ウイルスの遺伝子系統発生に基づく系統分類法であり、ウイルス系統の親子関係が明確になるように一定のルールに則って命名される⁸⁾。

本研究では、大阪府内における SARS-CoV-2 の流行動態を明らかにする目的で、2022 年 1 月 1 日か

大阪健康安全基盤研究所

ら 2022 年 12 月 31 日までの 1 年間に大阪府内で検出された SARS-CoV-2 について、全ゲノム配列情報に基づく分子系統解析を実施し、大阪府内の SARS-CoV-2 の流行株の推移について調査した。加えて、S タンパク質 RBD の変異解析を実施し、大阪府内で検出された SARS-CoV-2 の RBD におけるアミノ酸置換検出率を経時的に比較した。

実験方法

1. 全ゲノム配列の解読

感染症発生動向調査の一環として大阪健康安全基盤研究所に搬入された RNA、あるいは、感染症発生動向調査の一環として搬入された臨床検体から抽出した RNA を解析に使用した。SARS-CoV-2 の全ゲノム配列は、国立感染症研究所が公開するプロトコールに準じて解読した⁹⁾。シーケンスには、iSeq 100 (Illumina) あるいは MinION Mk1b (Oxford Nanopore) を使用した。配列の構築には、国立感染症研究所が提供する解析サーバーを使用した。また、Global Initiative on Sharing All Influenza Data (GISAID) に登録された配列データ (fasta 形式) をダウンロードし解析に加えた¹⁰⁾。本研究で使用した配列データのアクセッション番号一覧は要望に応じて開示できる (連絡先: wakabayashi@iph.osaka.jp)。

2. PANGO 系統および Clade 判定

SARS-CoV-2 の系統の判定には、PANGOLIN (version 4.2) および Nextclade CLI (version 2.13.1) プログラムを使用し、それぞれ PANGO 系統および Clade を決定した^{7,8)}。

3. 分子系統解析および変異解析

分子系統解析には、Nextstrain CLI (version 5.0.0) および Auspice (version 2.29.1) を使用した¹¹⁾。S タンパク質のアミノ酸変異の探索には Nextclade CLI を使用し、Morpheus を使用してヒートマップを描画した¹²⁾。武漢株 (Wuhan-Hu-1、GenBank ID: MN908947) のアミノ酸残基を野生型として解析した。

4. COVID-19 感染拡大期の定義

本研究では、大阪府における COVID-19 の感染拡大期について、2021 年 12 月 17 日～2022 年 6 月 24 日を第 6 波、2022 年 6 月 25 日～2022 年 9 月 26 日を第 7 波、2022 年 9 月 27 日以降を第 8 波とそれぞれ定義した¹³⁾。なお、2022 年 9 月 26 日以降、全数届出の見直しが行われたため、9 月 27 日以降の新

規陽性者数は、医療機関より報告された患者数および大阪府陽性者登録センター登録数の合計を表す。各疫学週に対応する期間 (年月日) を表 1 に示した。

結果

大阪健康安全基盤研究所において、3,437 検体の良質な全ゲノム配列を新規に解読した。これに GISAID からダウンロードした 22,591 検体のゲノムデータを加え、合計 26,028 検体の全ゲノム配列を解析に使用した。解読した SARS-CoV-2 の Clade 判定結果の推移と大阪府内で報告された新規陽性者数の推移を図 1 に示した。また、ゲノム解読した SARS-CoV-2 に占める、各 PANGO 系統株の割合を図 2 に示した。

第 6 波の初期 (第 1 週～第 11 週) においては、Clade 21K に分類されるウイルスが主に検出された。一方、第 6 波の後期 (第 12 週～第 25 週) においては、Clade 21L に分類されるウイルスが主に検出された。第 7 波および第 8 波では Clade 22B に分類されるウイルスが主に検出された。

Clade 21K が主であった第 1 週～第 10 週においては、第 2 週を除いて、PANGO 系統の BA.1.1 あるいは BA.1.1.2 に分類されるウイルスがゲノム解読株の 5 割以上を占めていた。第 11 週以降は、Clade 21L あるいは 22B に分類されるウイルスの中でも、多様な PANGO 系統株が検出されており、特定の優勢な PANGO 系統株は認められなかった。第 7 波 (第 26 週～第 39 週) においては、BA.5.2 あるいは BA.5.2.1 の検出割合が高かったが、第 8 波 (第 40 週以降) においては、BA.5.2.1 の下位系統である BF.5 の検出割合が概ねそれらを上回った。第 40 週以降には Clade 22F に分類される BQ.1 系統の、第 44 週以降には Clade 22D に分類される BA.2.75 系統 (BN 系統等の下位系統を含む) の検出割合が増加した。

S タンパク質 RBD (331～531 番目のアミノ酸残基) におけるアミノ酸置換の検出割合の推移を図 3 に示した。評価対象とした全 201 残基のうち、125 残基ではアミノ酸置換が認められなかった。一方、解析したゲノム配列の 0.1%以上 (26 ゲノム以上) でアミノ酸置換が認められた残基は、28 残基であった。S タンパク質の 339、371、373、375、417、440、477、478、484、498、501、505 番目のアミノ酸残基については、全調査期間にわたって解析した

ウイルスの 90%以上がいずれかのアミノ酸置換を有していた。

S タンパク質の 346 番目のアミノ酸残基については、第 1 週～第 11 週までは、アルギニン (R, 野生型) からリシン (K) へのアミノ酸置換を有するウイルスが主に検出された (図 4A)。その後、野生型であるアルギニン残基を有するウイルスが主に検出されたが、第 39 週以降、スレオニン (T) へのアミノ酸置換を有するウイルスの検出割合が増加し

た。スレオニン (T) へのアミノ酸置換を有するウイルスは単系統を形成せず、複数の遺伝子系統株が独立してアミノ酸置換を獲得していた (図 4B)。

S タンパク質の 446 番目のアミノ酸残基については、第 1 週～第 11 週までは、グリシン (G, 野生型) からセリン (S) へのアミノ酸置換を有するウイルスが、第 12 週目以降は野生型であるグリシン残基 (G) を有するウイルスが主に検出されていたが、第 44 週以降では、セリン (S) あるいはアスパラギ

表 1. 各疫学週に対応する年月日一覧

疫学週	始期	終期	疫学週	始期	終期
2022-01	2022 年 1 月 3 日	2022 年 1 月 9 日	2022-27	2022 年 7 月 4 日	2022 年 7 月 10 日
2022-02	2022 年 1 月 10 日	2022 年 1 月 16 日	2022-28	2022 年 7 月 11 日	2022 年 7 月 17 日
2022-03	2022 年 1 月 17 日	2022 年 1 月 23 日	2022-29	2022 年 7 月 18 日	2022 年 7 月 24 日
2022-04	2022 年 1 月 24 日	2022 年 1 月 30 日	2022-30	2022 年 7 月 25 日	2022 年 7 月 31 日
2022-05	2022 年 1 月 31 日	2022 年 2 月 6 日	2022-31	2022 年 8 月 1 日	2022 年 8 月 7 日
2022-06	2022 年 2 月 7 日	2022 年 2 月 13 日	2022-32	2022 年 8 月 8 日	2022 年 8 月 14 日
2022-07	2022 年 2 月 14 日	2022 年 2 月 20 日	2022-33	2022 年 8 月 15 日	2022 年 8 月 21 日
2022-08	2022 年 2 月 21 日	2022 年 2 月 27 日	2022-34	2022 年 8 月 22 日	2022 年 8 月 28 日
2022-09	2022 年 2 月 28 日	2022 年 3 月 6 日	2022-35	2022 年 8 月 29 日	2022 年 9 月 4 日
2022-10	2022 年 3 月 7 日	2022 年 3 月 13 日	2022-36	2022 年 9 月 5 日	2022 年 9 月 11 日
2022-11	2022 年 3 月 14 日	2022 年 3 月 20 日	2022-37	2022 年 9 月 12 日	2022 年 9 月 18 日
2022-12	2022 年 3 月 21 日	2022 年 3 月 27 日	2022-38	2022 年 9 月 19 日	2022 年 9 月 25 日
2022-13	2022 年 3 月 28 日	2022 年 4 月 3 日	2022-39	2022 年 9 月 26 日	2022 年 10 月 2 日
2022-14	2022 年 4 月 4 日	2022 年 4 月 10 日	2022-40	2022 年 10 月 3 日	2022 年 10 月 9 日
2022-15	2022 年 4 月 11 日	2022 年 4 月 17 日	2022-41	2022 年 10 月 10 日	2022 年 10 月 16 日
2022-16	2022 年 4 月 18 日	2022 年 4 月 24 日	2022-42	2022 年 10 月 17 日	2022 年 10 月 23 日
2022-17	2022 年 4 月 25 日	2022 年 5 月 1 日	2022-43	2022 年 10 月 24 日	2022 年 10 月 30 日
2022-18	2022 年 5 月 2 日	2022 年 5 月 8 日	2022-44	2022 年 10 月 31 日	2022 年 11 月 6 日
2022-19	2022 年 5 月 9 日	2022 年 5 月 15 日	2022-45	2022 年 11 月 7 日	2022 年 11 月 13 日
2022-20	2022 年 5 月 16 日	2022 年 5 月 22 日	2022-46	2022 年 11 月 14 日	2022 年 11 月 20 日
2022-21	2022 年 5 月 23 日	2022 年 5 月 29 日	2022-47	2022 年 11 月 21 日	2022 年 11 月 27 日
2022-22	2022 年 5 月 30 日	2022 年 6 月 5 日	2022-48	2022 年 11 月 28 日	2022 年 12 月 4 日
2022-23	2022 年 6 月 6 日	2022 年 6 月 12 日	2022-49	2022 年 12 月 5 日	2022 年 12 月 11 日
2022-24	2022 年 6 月 13 日	2022 年 6 月 19 日	2022-50	2022 年 12 月 12 日	2022 年 12 月 18 日
2022-25	2022 年 6 月 20 日	2022 年 6 月 26 日	2022-51	2022 年 12 月 19 日	2022 年 12 月 25 日
2022-26	2022 年 6 月 27 日	2022 年 7 月 3 日	2022-52	2022 年 12 月 26 日	2023 年 1 月 1 日

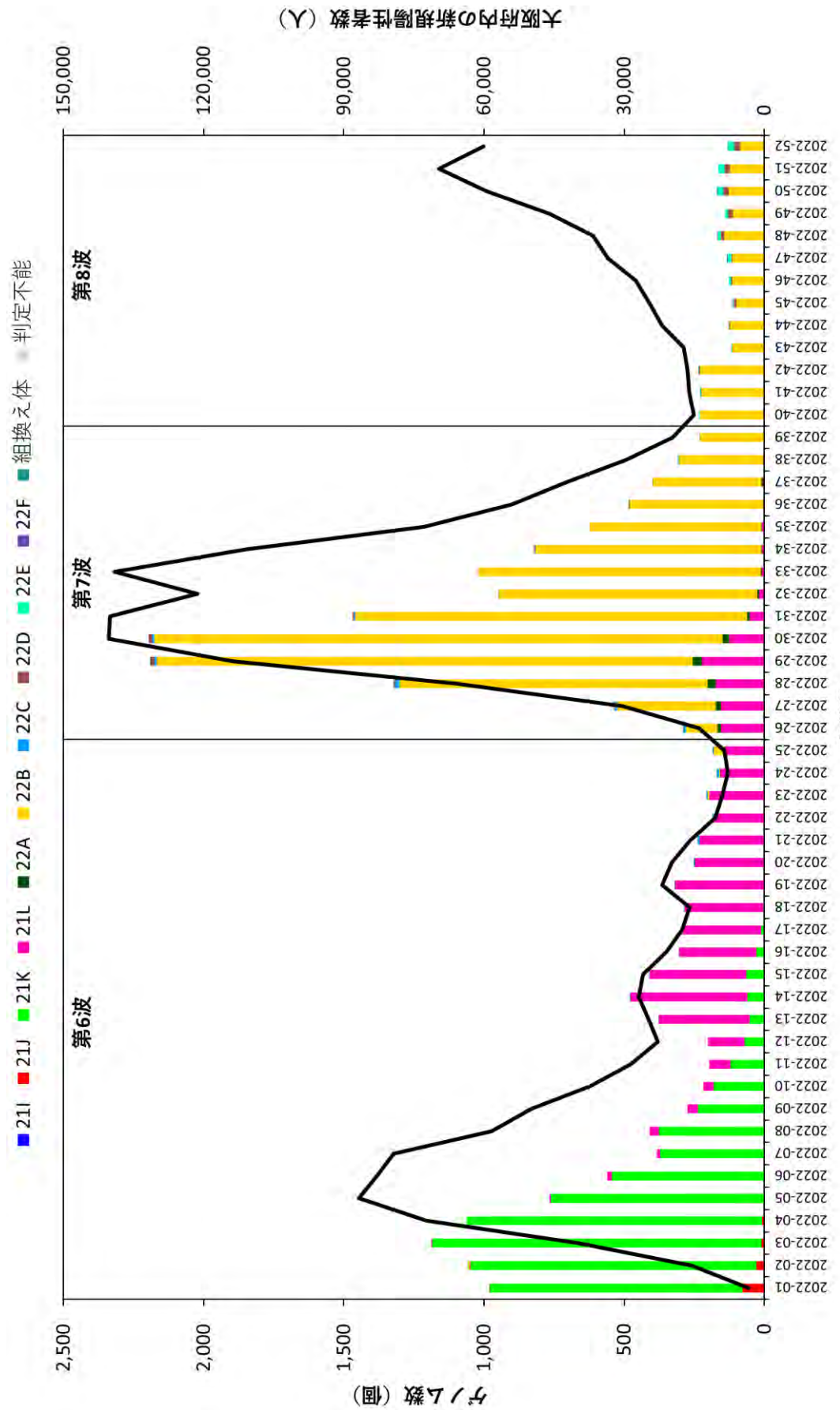


図1 2022年に大阪府内で検出されたSARS-CoV-2のClade判定結果（積み上げ棒グラフ、左軸）と各感染拡大期における大阪府内の新規陽性者数の推移（折れ線グラフ、右軸）。第52週は、2022年12月26日から12月31日までの総計。また、2022年1月1日および2日は、2021年の第52週に該当するた
め、本グラフ中に含まれない。

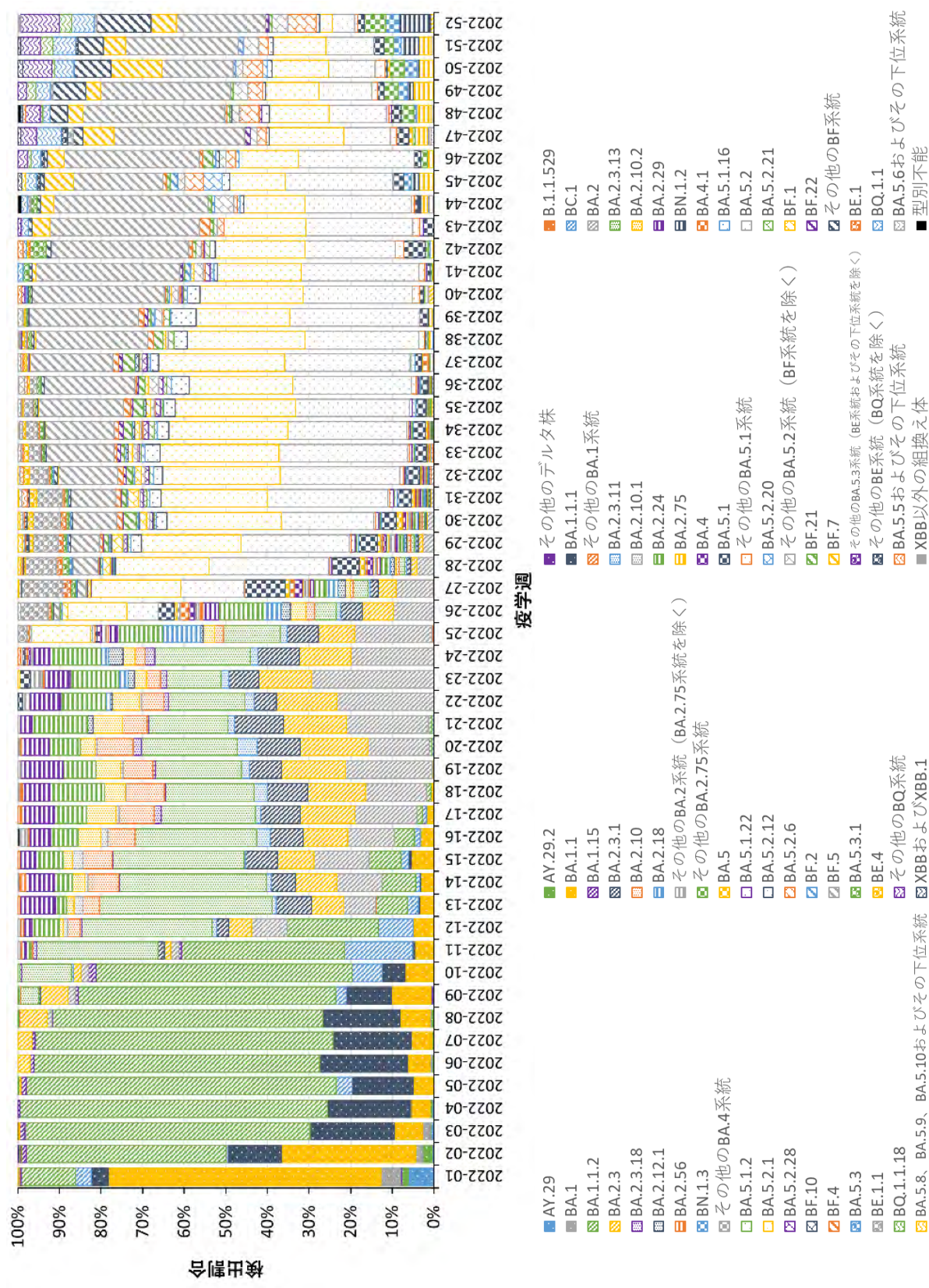


図2 解析した SARS-CoV-2 に占める各 PANGO 系統の検出割合の推移。

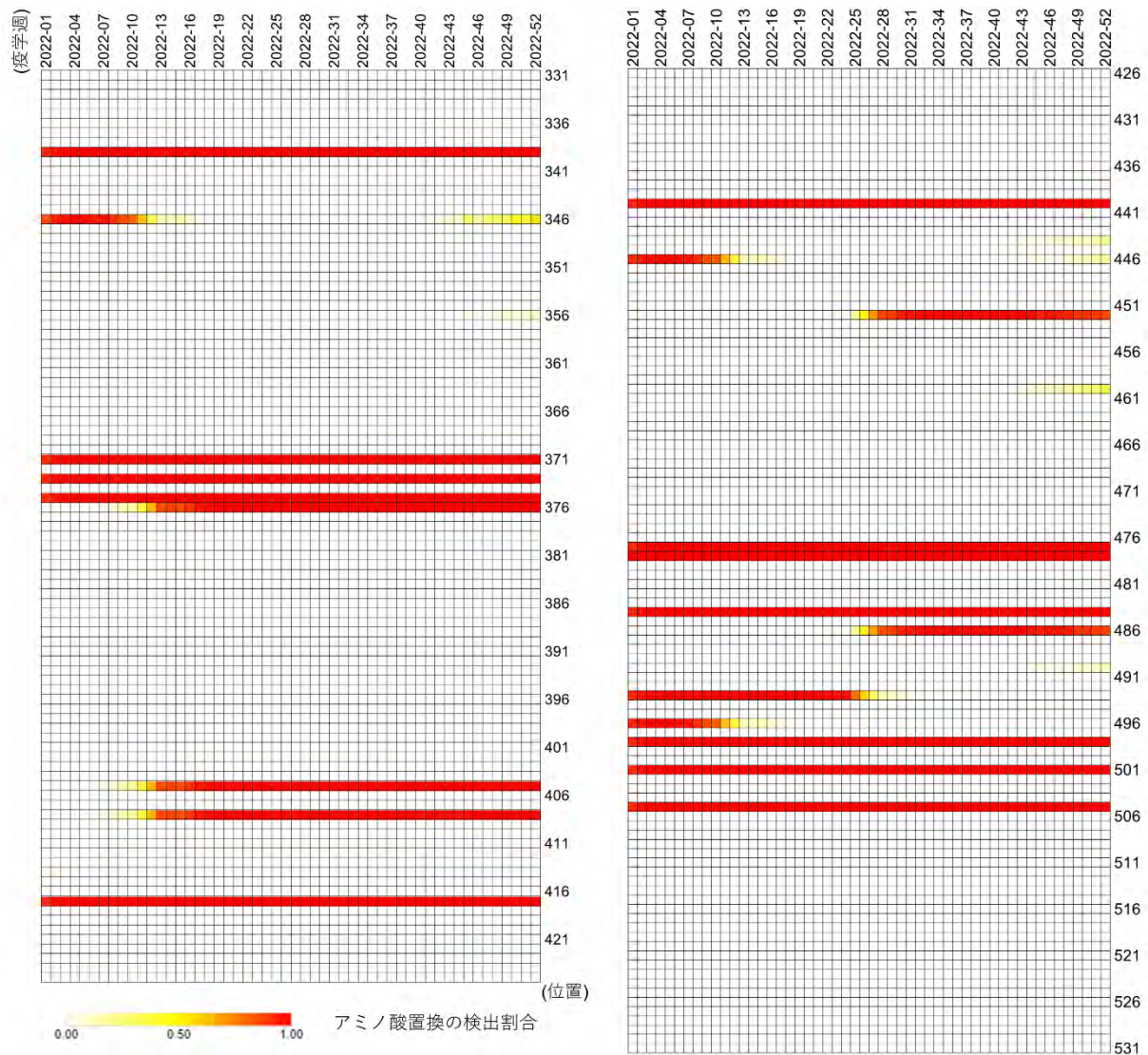


図3 2022年に大阪府内で検出されたSARS-CoV-2のSタンパク質RBDにおけるアミノ酸置換の検出割合の推移。

ン酸 (D) に置換したウイルスの検出割合が増加した (図 5A)。セリン (S) へのアミノ酸置換を有するウイルスのうち、2022 年の初期に検出されたウイルス株は、Clade 21L に分類される遺伝子系統株が中心であったが、2022 年 8 月頃から Clade 22D に分類される遺伝子系統株が中心になった (図 5B)。

339 番目のアミノ酸残基については、全調査期間にわたって、グリシン (G) からアスパラギン酸 (D) へのアミノ酸置換を有する株が主に検出されたが、第 11 週～第 29 週にはアスパラギン (N) へのアミノ酸置換を有するウイルス株が、第 42 週以降にはヒスチジン (H) へのアミノ酸置換を有するウイルス株が、それぞれ一定数検出された (図 6A)。これらのウイルス株は、グリシン (G) からアスパラギ

ン酸 (D) へのアミノ酸置換を有する株が、さらに異なるアミノ酸への変異を獲得した株であった (図 6B)。

上記以外では、444 番目および 460 番目のアミノ酸残基に置換を有するウイルスが検出され、主に第 43 週以降に検出割合が増加した (図 3)。444 番目では、スレオニン (T)、アスパラギン (N)、アルギニン (R)、メチオニン (M) へのアミノ酸置換が、460 番目ではリシン (K) へのアミノ酸置換が検出されたが、いずれも単系統のウイルスではなく、複数の遺伝子系統のウイルスが独立してアミノ酸置換を獲得していた (図 7A および B)。同様に、356 番目および 490 番目のアミノ酸残基に置換を有する株の検出割合が第 45 週以降に増加したが、これ

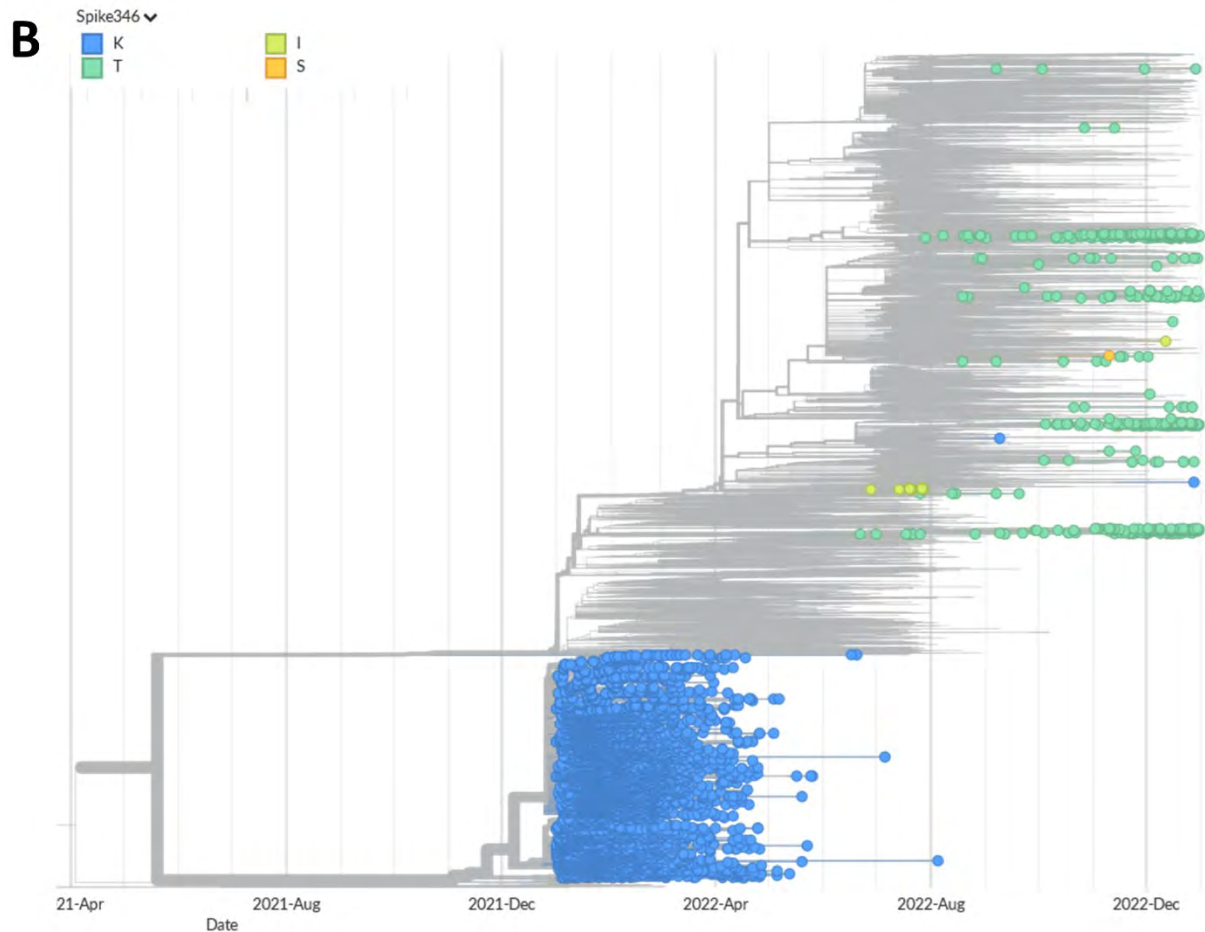
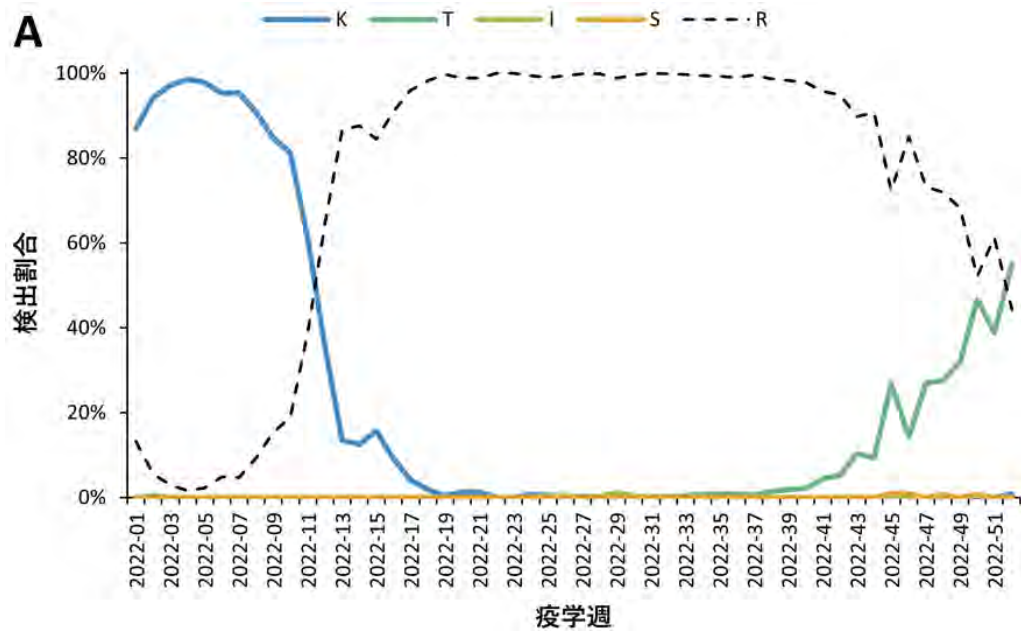


図4 Sタンパク質RBDの346番目アミノ酸残基における各アミノ酸置換の検出率の経時的推移 (A) および各アミノ酸置換を有する株の検出数の推移と時間系統樹上における遺伝子系統関係 (B)。(A) 黒破線は野生型のアミノ酸残基を表す。(B) いずれかのアミノ酸置換を有するウイルス株を色付円で示し、野生型のアミノ酸残基を有するウイルス株は灰色で示した。アミノ酸残基は以下の略号で示した。I, イソロイシン; K, リシン; R, アルギニン; S, セリン; T, スレオニン。

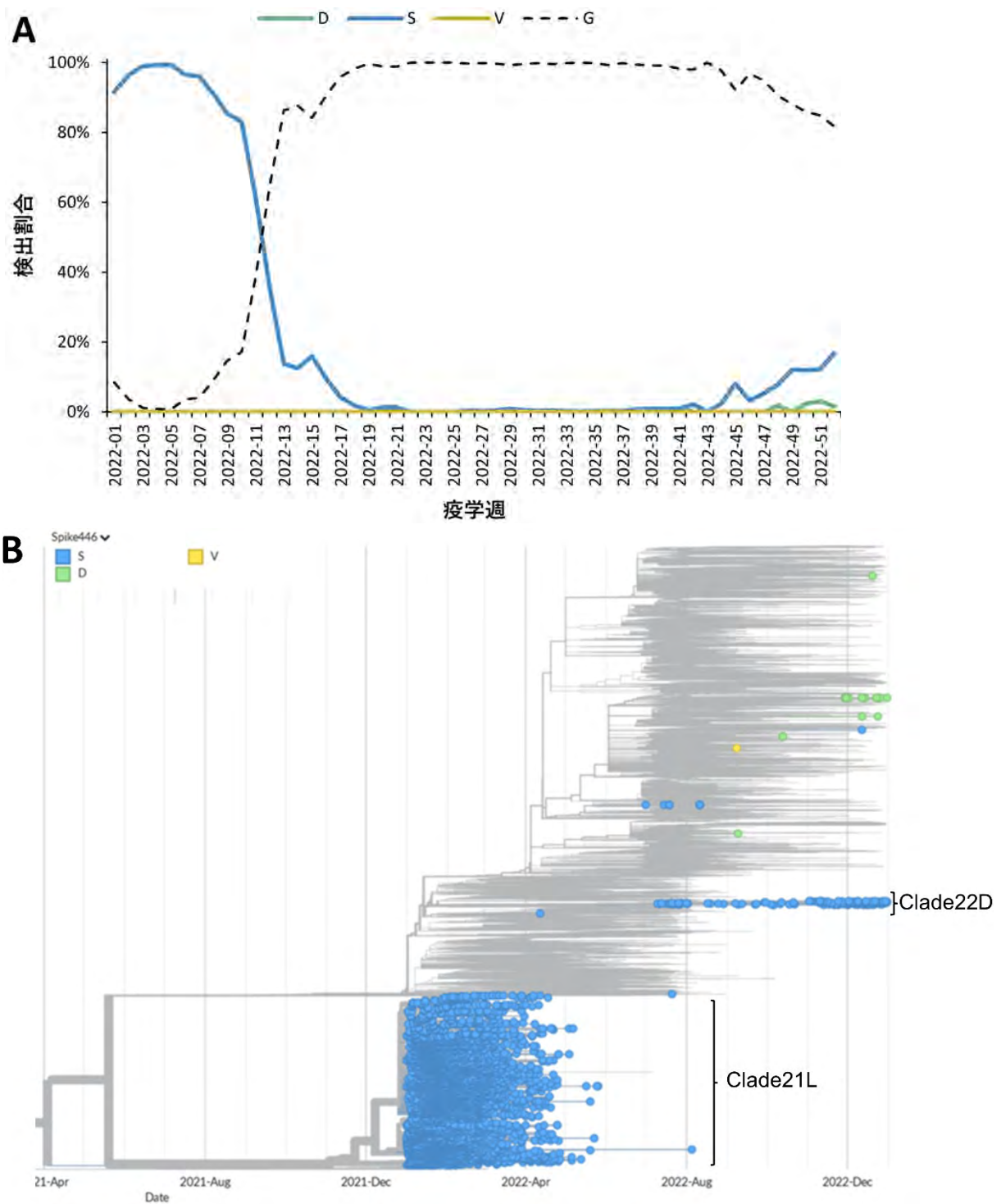


図5 Sタンパク質RBDの446番目アミノ酸残基における各アミノ酸置換の検出率の経時的推移(A)および各アミノ酸置換を有する株の検出数の推移と時間系統樹上における遺伝子系統関係(B)。(A)黒破線は野生型のアミノ酸残基を表す。(B)いずれかのアミノ酸置換を有するウイルス株を色付円で示し、野生型のアミノ酸残基を有するウイルス株は灰色で示した。また、Clade 21LおよびClade 22Dに該当する遺伝子系統を括弧で示した。アミノ酸残基は以下の略号で示した。D, アスパラギン酸; G, グリシン; S, セリン; V, バリン。

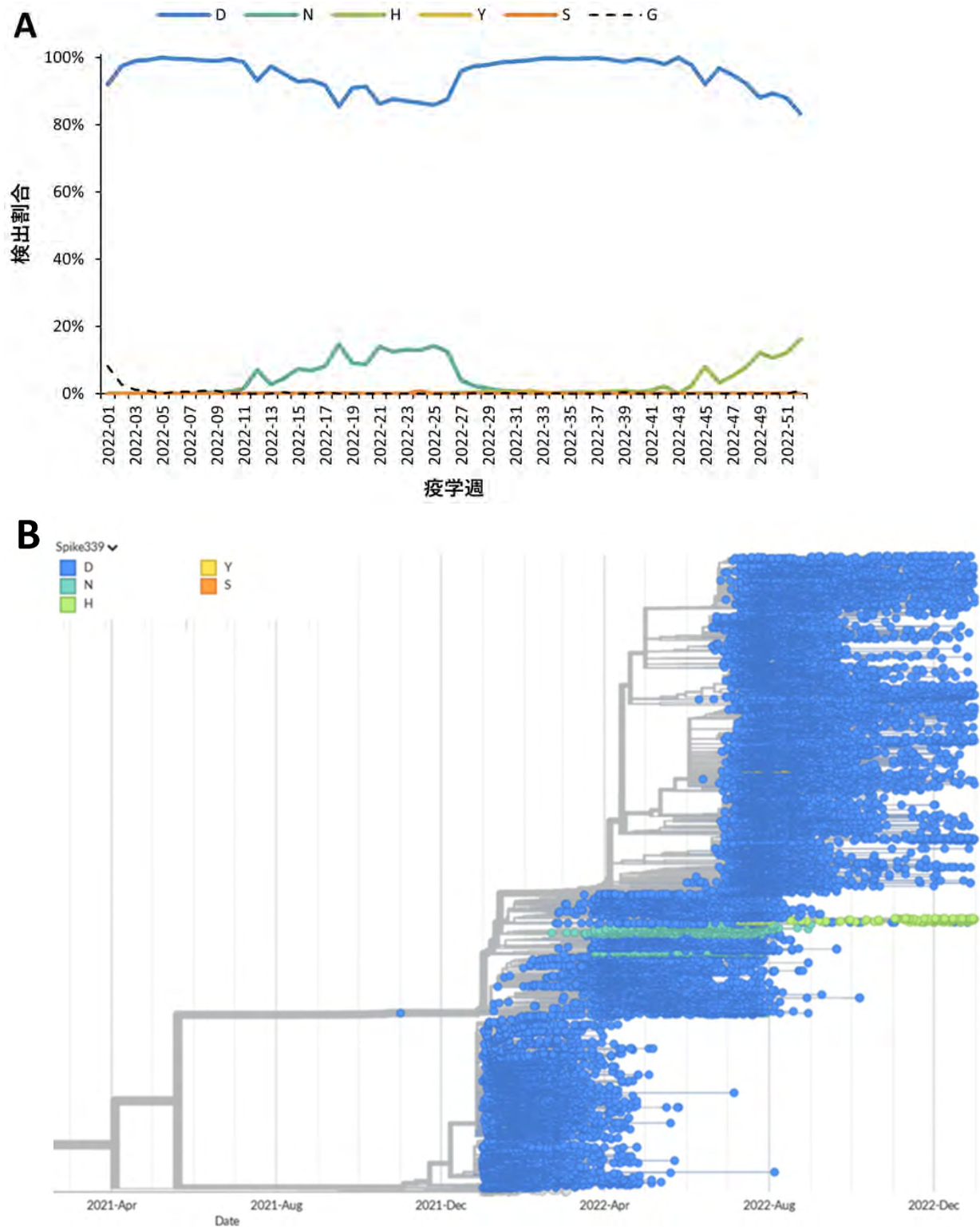


図6 Sタンパク質RBDの339番目アミノ酸残基における各アミノ酸置換の検出率の経時的推移(A)および各アミノ酸置換を有する株の検出数の推移と時間系統樹上における遺伝子系統関係(B)。(A)黒破線は野生型のアミノ酸残基を表す。(B)いずれかのアミノ酸置換を有するウイルス株を色付円で示し、野生型のアミノ酸残基を有するウイルス株は灰色で示した。アミノ酸残基は以下の略号で示した。D, アスパラギン酸; G, グリシン; H, ヒスチジン; N, アスパラギン; S, セリン; Y, チロシン。

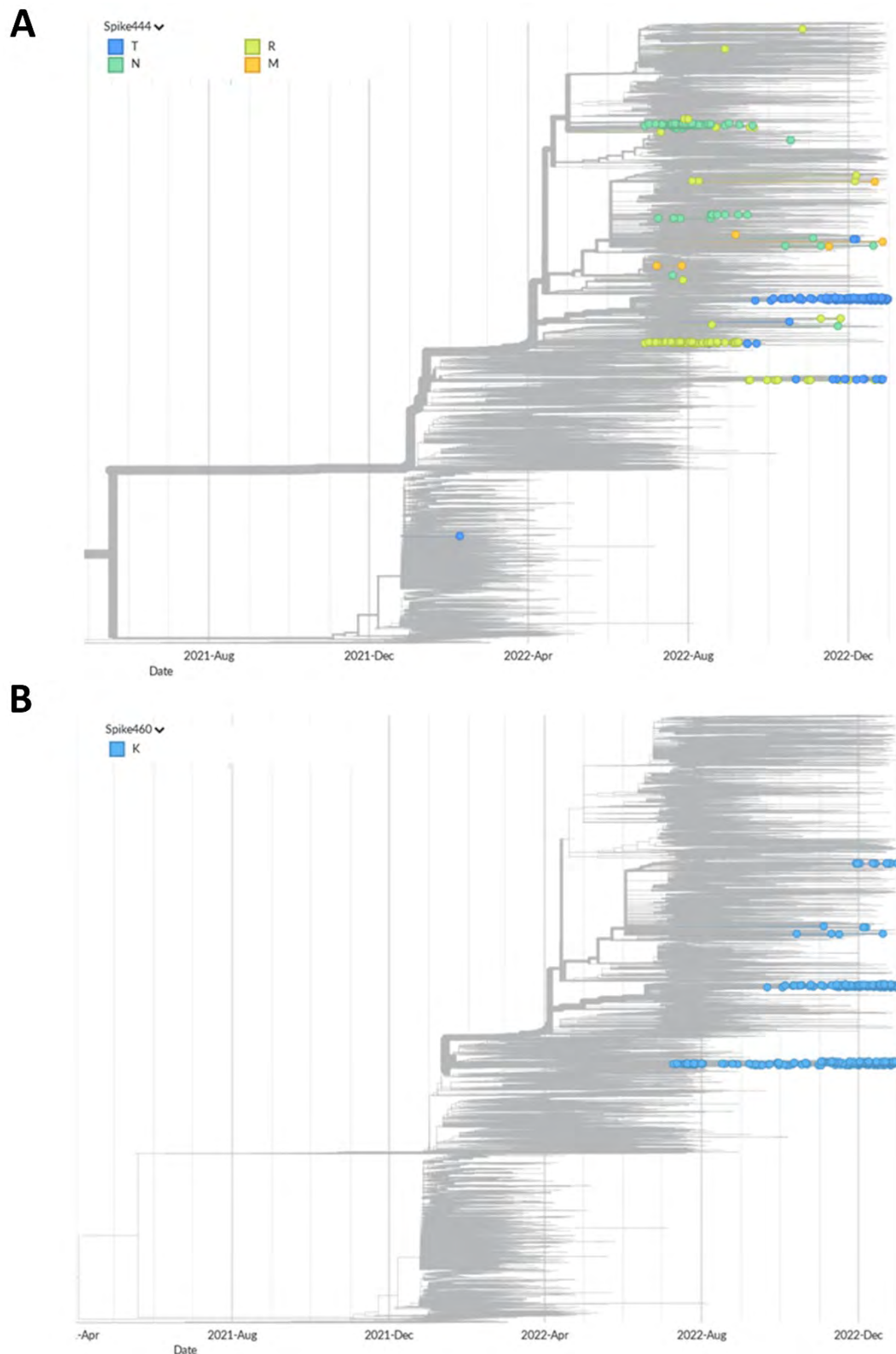


図7 Sタンパク質RBDの444番目(A)および460番目(B)アミノ酸残基における各アミノ酸置換を有する株の検出数の推移と時間系統樹上における遺伝子系統関係。いずれかのアミノ酸置換を有するウイルス株を色付円で示し、野生型のアミノ酸残基を有するウイルス株は灰色で示した。アミノ酸残基は以下の略号で示した。K, リシン; M, メチオニン; N, アスパラギン; R, アルギニン; T, スレオニン。

らは単系統のウイルス株 (Clade 22D に属するウイルス株) の増加に起因していた (図は割愛する)。

考 察

本研究では、2022 年に大阪府で検出された SARS-CoV-2 の全ゲノム配列情報に基づく系統解析を実施し、各感染拡大期におけるウイルス系統の推移を調査した。第 6 波においては主に Clade 21K に分類されるウイルスが、第 7 波においては主に Clade 22B に分類されるウイルスが、新規陽性者数の増加に対応するように検出された。また、主要な流行株が Clade 21L に推移した第 12 週以降にも新規陽性者数の増加が認められており、2021 年と同様に、流行株の変化が新規陽性者数の増加につながった可能性が考えられた¹⁴⁾。S タンパク質 RBD のアミノ酸置換についても、流行株の Clade の推移にともなって、第 10 週～第 13 週、あるいは第 25 週～第 28 週にかけて検出パターンに変化が認められており、ウイルスの抗原性の変化が新規陽性者数の増加に寄与したことが示唆された。

第 8 波においては、第 7 波と同様に Clade 22B に分類されるウイルスが主に検出されたが、PANGO 系統の BF.5 や BF.7 を始めとする BF 系統の検出割合が増加した。いずれも BA.5.2.1 の子孫系統に該当するが、BF.5 系統は S タンパク質の 1020 番目のアラニン (A) からセリン (S) へのアミノ酸置換を、BF.7 系統は 346 番目のアルギニン (R) からスレオニン (T) へのアミノ酸置換をそれぞれ獲得している。また、第 8 波においては、S タンパク質の 444 番目や 460 番目など、RBD にアミノ酸置換を有するウイルス株の検出割合が増加していた。加えて、2022 年の後半には、Clade 22D に分類されるウイルスや、Clade 22B の子孫系統である Clade 22F に分類されるウイルスの検出割合が増加した。このように、第 8 波の感染拡大では、Nextclade による系統分類が異なるほど流行株の大きな変化は認められなかったものの、ウイルス株の抗原性に変化が生じたと予想され、そのことが感染拡大に寄与した可能性が考えられた。

S タンパク質 RBD のアミノ酸置換の検出率を比較したところ、解析対象とした全アミノ酸残基のうち、62%にあたる 125 残基ではアミノ酸置換が 1 つも検出されなかった。これらの多くは、Starr らが Deep Mutational Scan 法によって明らかにした、

ACE2 との結合能を低下させるアミノ酸置換箇所に合致していた¹⁵⁾。例えば、431 番目あるいは 488 番目のアミノ酸残基に生じたアミノ酸置換は、ACE2 との結合能を著しく低下させることが実験的に報告されているが、今回検出されたウイルス株の中にはこれらの箇所にアミノ酸置換を有する株は存在しなかった。このような ACE2 結合能の低下を引き起こす変異を獲得したウイルスは、宿主細胞への感染効率が低下するために自然淘汰され、検出されなかったと考えられた。

一方で、S タンパク質 RBD におけるアミノ酸置換は、201 残基のうち 28 残基に集中して発生していた。VOC Delta で認められた S タンパク質の 452 番目のロイシン (L) からアルギニン (R) へのアミノ酸置換は、ウイルスの細胞膜融合能を向上させることが報告されているが¹⁶⁾、同じ変異は Clade 22B でも認められている。また、339 番目のアミノ酸残基に認められたグリシン (G) からアスパラギン酸 (D)、あるいはアスパラギン (N)、ヒスチジン (H) へのアミノ酸置換は、いずれも ACE2 との結合能に大きく影響を与えないが、RBD の発現量を上昇させることが報告されている¹⁵⁾。ヒトへの感染を繰り返す中で、SARS-CoV-2 はヒトへの感染により適合するように進化している可能性が示唆された。

S タンパク質の 346 番目、444 番目、446 番目、および 460 番目のアミノ酸残基では、アミノ酸置換が複数の遺伝子系統株で認められた。これらは、液性免疫からの逃避や抗体治療薬の効果に影響を及ぼす変異として報告されている^{17,18,19)}。Cao らは、ヒトにおける集団免疫の獲得およびワクチンの追加接種が S タンパク質 RBD の収斂進化を引き起こした可能性について述べている¹⁷⁾。大阪府内で検出された SARS-CoV-2 においても同様に、抗体からの免疫逃避に関与する領域で、収斂進化が発生している傾向が認められた。

新型コロナウイルス感染症の感染症法上の位置づけが 5 類感染症に変更された 2023 年 5 月 8 日以降も、全ゲノム配列解析によるゲノムサーベイランスが継続されている。本研究の結果、特に 2022 年第 12 週以降は、複数の遺伝子系統株が同時に検出されていたことがわかった。これは、単独の遺伝子系統株によって感染が拡大した第 4 波や第 5 波とは異なる状況であり、Nextclade や PANGO 分類による系統分類では、流行株の特徴づけが困難になっ

ていることを示唆している。一方で、Sタンパク質のアミノ酸置換に着目すると、ウイルスの遺伝子系統とは無関係に、特定のアミノ酸残基に置換が集中して検出されていることが明らかになった。今後のゲノムサーベイランスにおいては、検出されたSARS-CoV-2ウイルスの遺伝子系統解析に加え、検出されたウイルスがどのようなアミノ酸置換を有しているか、特にSタンパク質RBDを中心とした変異解析が重要であると考えられた。

謝 辞

本研究では、GISAIDに登録された配列データを解析に使用しました。GISAIDの配列登録者である、以下の先生方に深くお礼申し上げます（五十音順、アルファベット順）。大阪大学微生物病研究所（Daisuke Motooka, Hiroya Oki, Kentaro Tanaka, Shota Nakamura）、大阪母子医療センター（Itaru Yanagihara, Satoshi Yanagihara, Yukiko Nakura, Yuya Fujisawa）、関西医科大学（Masami Kashihara）、国立感染症研究所（Akina Ogamino, Harutaka Katano, Kentaro Itokawa, Makoto Kuroda, Masanori Hashino, Naobumi V. Sasaki, Norio Ohmagari, Rina Tanaka, Shinji Saito, Shun Iida, Tadaki Suzuki, Tsuyoshi Sekizuka, Yuichiro Hirata）、地域医療機能推進機構大阪病院（Emi Yoshinaga, Yuichi Yamashita）

また、大阪健康安全基盤研究所でSARS-CoV-2の全ゲノム配列を解読するにあたり、技術的な支援をいただきました国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センターの黒田誠先生、関塚剛先生、糸川健太郎先生に感謝申し上げます。

利 益 相 反

開示すべき利益相反はない。

文 献

- 1) GitHub cov-lineages/pango-designation https://github.com/cov-lineages/pango-designation/blob/master/lineage_notes.txt
- 2) A. Rambaut, “Phylogenetic Analysis | 176 genomes | 6 Mar 2020,” *Virological* 2020; <https://virological.org/t/phylogenetic-analysis-176-genomes-6-mar-2020/356>.
- 3) Markov PV, Ghafari M, Beer M, Lythgoe K, Simmonds P, Stilianakis NI, Katzourakis A. The evolution of SARS-CoV-2. *Nat Rev Microbiol* 2023; **21**: 361-379.
- 4) Tian D, Sun Y, Xu H, Ye Q. The emergence and epidemic characteristics of the highly mutated SARS-CoV-2 Omicron variant. *J Med Virol* 2022; **94** (6): 2376-2383.
- 5) Wrapp D, Wang N, Corbett KS, Goldsmith JA, Hsieh CL, Abiona O, Graham BS, McLellan JS. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science* 2020; **367**(6483): 1260-1263.
- 6) Barnes CO, Jette CA, Abernathy ME, Dam KA, Esswein SR, Gristick HB, Malyutin AG, Sharaf NG, Huey-Tubman KE, Lee YE, Robbiani DF, Nussenzweig MC, West AP Jr, Bjorkman PJ. SARS-CoV-2 neutralizing antibody structures inform therapeutic strategies. *Nature*. 2020; **588**(7839): 682-687.
- 7) Aksamentov I, Roemer C, Hodcroft EB, Neher RA. Nextclade: clade assignment, mutation calling and quality control for viral genomes. *J Open Source Softw.* 2021; **6**(67): 3773.
- 8) O’Toole Á, Scher E, Underwood A, Jackson B, Hill V, McCrone JT, Colquhoun R, Ruis C, Abu-Dahab K, Taylor B, Yeats C, du Plessis L, Maloney D, Medd N, Attwood SW, Aanensen DM, Holmes EC, Pybus OG, Rambaut A. Assignment of epidemiological lineages in an emerging pandemic using the pangolin tool. *Virus Evol.* 2021; **7**(2): veab064.
- 9) 国立感染症研究所病原体検出マニュアル 新型コロナウイルスゲノム解析マニュアル https://www.niid.go.jp/niid/ja/lab-manual-m/9559-20_20-04-14-10-09-54.html
- 10) Khare S, Gurry C, Freitas L, Schultz MB, Bach G, Diallo A, Akite N, Ho J, Lee RT, Yeo W, Curation Team GC, Maurer-Stroh S. GISAID’s Role in Pandemic Response. *China CDC Wkly.* 2021; **3**(49): 1049-1051.
- 11) Hadfield J, Megill C, Bell SM, Huddleston J, Potter B, Callender C, Sagulenko P, Bedford T, Neher RA. Nextstrain: real-time tracking of pathogen evolution. *Bioinformatics.* 2018; **34**(23): 4121-4123.
- 12) Joshua Gould Morpheus <https://software.broadinstitute.org/morpheus>
- 13) 第 88 回大阪府新型コロナウイルス対策本部会議【資料 3-1】現在の感染・療養状況について

https://www.pref.osaka.lg.jp/attach/38215/00453234/3-1_kansenzoukyou230428.pdf

- 14) 若林友騎, 河原隆二, 柿本健作, 山口貴弘, 梅川奈央, 西嶋駿弥, 森川佐依子, 廣井 聡, 池森亮, 白井達哉, 阪野文哉, 前田和穂, 岐部亜子, 平井佑治, 岡田和真, 永吉晴奈, 徳永佑亮, 上野亮, 村野晃一, 北口大毅, 田上貴臣, 安達史恵, 森 治代, 本村和嗣, 小笠原準. 全ゲノム配列情報に基づく大阪府内の severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 の分子疫学解析. 地方独立行政法人大阪健康安全基盤研究所研究年報. 2022;**6**, 9-19.
- 15) Starr TN, Greaney AJ, Hilton SK, Ellis D, Crawford KHD, Dingens AS, Navarro MJ, Bowen JE, Tortorici MA, Walls AC, King NP, Veesler D, Bloom JD. Deep mutational scanning of SARS-CoV-2 receptor binding domain reveals constraints on folding and ACE2 binding. *Cell*. 2020; **182**(5): 1295-1310.
- 16) Zhang Y, Zhang T, Fang Y, Liu J, Ye Q, Ding L. SARS-CoV-2 spike L452R mutation increases Omicron variant fusogenicity and infectivity as well as host glycolysis. *Signal Transduct Target Ther*. 2022; **7**(1): 76.
- 17) Cao Y, Jian F, Wang J, Yu Y, Song W, Yisimayi A, Wang J, An R, Chen X, Zhang N, Wang Y, Wang P, Zhao L, Sun H, Yu L, Yang S, Niu X, Xiao T, Gu Q, Shao F, Hao X, Xu Y, Jin R, Shen Z, Wang Y, Xie XS. Imprinted SARS-CoV-2 humoral immunity induces convergent Omicron RBD evolution. *Nature*. 2023; **614**(7948): 521-529.
- 18) Laurini E, Marson D, Aulic S, Fermeglia A, Prici S. Molecular rationale for SARS-CoV-2 spike circulating mutations able to escape bamlanivimab and etesevimab monoclonal antibodies. *Sci Rep*. 2021; **11**(1): 20274.
- 19) 国立感染症研究所 新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) に対する治療薬の効果に影響を及ぼす可能性があるウイルスゲノム変異によるアミノ酸置換について (第3版) https://www.niid.go.jp/niid/images/cepr/covid-19/20230405_SARS-CoV-2_mutation_3.pdf

WEB サイトの内容は 2023 年 6 月 2 日に確認した。

Phylogenetic analysis and spike mutation profiles of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 in Osaka

Yuki WAKABAYASHI, Ryuji KAWAHARA, Kensaku KAKIMOTO, Takahiro YAMAGUCHI, Nao UMEKAWA, Yuji HIRAI, Syunya NISHIJIMA, Saeko MORIKAWA, Satoshi HIROI, Tatsuya SHIRAI, Ryo IKEMORI, Fumiya BANNO, Kazuma OKADA, Kazuho MAEDA, Mei KOYAMA, Yuko SHIBUTANI, Yusuke TOKUNAGA, Koichi MURANO, Haruna NAGAYOSHI, Ryo UENO, Daiki KITAGUCHI, Takaomi TAGAMI, Fumie ADACHI, Niichiro ABE, Haruyo MORI, Kazushi MOTOMURA and Kentaro KAWATSU

We conducted a phylogenetic analysis and spike mutation profiling of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) genomes sampled in Osaka Prefecture in 2022. At the beginning of 2022, the predominant lineages accounted for more than half of the sequenced genomes. However, after the eleventh week of 2022, various lineages of viruses were detected simultaneously. Almost all mutations in the receptor binding domain (RBD) of the spike protein were found in only 28 of the 201 amino acid residues analyzed. Convergent evolution of the spike RBD was also implied. These results indicate the importance of analyzing spike mutation profiles as well as genetic lineages for surveillance of SARS-CoV-2.

Key words: severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, molecular epidemiology, whole-genome sequencing, spike protein, receptor binding domain

大阪府内における 2022/2023 シーズンのインフルエンザ流行状況

森川佐依子, 廣井 聡, 阿部仁一郎, 森 治代

大阪健康安全基盤研究所ウイルス課では、年間を通じインフルエンザウイルスの検出、分離・型別を行い、国立感染症研究所へより詳細な解析用に一部の分離株を提供している。さらに、インフルエンザ以外のウイルス性呼吸器疾患の紛れ込みの検出、分離された A 型インフルエンザウイルス HA 遺伝子の系統樹解析によるワクチン株と流行株の差異について解析している。

2022/2023 シーズンの大阪府内におけるインフルエンザの流行は、2022 年第 51 週に定点あたり患者数が 1.0 を越え流行期入りし、2023 年第 5 週をピークとしてその後は減少し、第 15 週に定点当たり報告数が 1.0 を下回り非流行期となった。今シーズンの流行を形成したタイプは、AH3 亜型インフルエンザウイルスであった。研究期間中に検出された他のインフルエンザウイルス型は、B 型 Victoria 系統が 1 株のみで、A 型の H1pdm09 亜型と B 型の Yamagata 系統は検出されなかった。AH3 亜型インフルエンザウイルス分離株の系統樹解析の結果、全国と同様に複数のクレードに分かれたが、各クレードに属する分離株の割合は全国とは異なっていた。

インフルエンザ指定提出機関にてインフルエンザと診断された患者から採取された検体であったが、当課での検査の結果、季節性インフルエンザウイルスが検出されなかったものが 5 検体 (6.2%) あった。その内の 3 検体からは他の呼吸器ウイルスが検出された。2 検体からパレコウイルスが検出され、残り 1 検体はライノウイルスが検出された。

キーワード：インフルエンザウイルス、病原体サーベイランス、呼吸器ウイルス

インフルエンザはインフルエンザウイルスの感染によって引き起こされる急性熱性の呼吸器感染症である。我が国においては沖縄県を除き毎年冬期に流行するため、流行時期に合わせ毎年第 36 週 (8 月末から 9 月始め) から翌年の第 35 週 (8 月末) までの 1 年間で「インフルエンザシーズン」と定義されている。

インフルエンザに罹患すると多くは 1 週間程度で回復するが、高齢者においては肺炎、循環器疾患をはじめとする慢性基礎疾患の悪化による死者数の増加 (超過死亡) の一因となっており、さらに小児では脳症、肺炎など重症化の主要因となるなど、その対策は我が国の医療施策において重要な課題である。インフルエンザワクチンは感染や発症そのものを完全には防御できないが、重症化や合併症の発生を予防する効果が証明されている²⁾。インフルエンザ株サーベイランスは世界保健機関 (World Health Organization: WHO) の世界インフルエンザ監視・対応システム (Global Influenza Surveillance and Response System: GISRS) によって、地球規模で実施されており、このサーベイランスの結果をもとに流行予測とワクチン株選定が行われている³⁾。大阪健康安全基盤研究所ウイルス課では、国および大阪府の感染症発生動向調査事業の一環として、大阪府内のインフルエンザの流行状況を把握することを目的に、年間を通じインフルエンザウイルスの検出、分離・型別を行っている。さらに国立感染症研究所と共同で実施している「感染症発生動向調査に基づくインフルエンザサーベイランス」の一環として、我が国のインフルエンザウイルスの詳細な流行状況を把握することを目的とし、一部の分離株の提供を行い、それらは遺伝子解析、抗原性解析、薬剤耐性変異株の検索に用いられている。

Health Organization: WHO) の世界インフルエンザ監視・対応システム (Global Influenza Surveillance and Response System: GISRS) によって、地球規模で実施されており、このサーベイランスの結果をもとに流行予測とワクチン株選定が行われている³⁾。大阪健康安全基盤研究所ウイルス課では、国および大阪府の感染症発生動向調査事業の一環として、大阪府内のインフルエンザの流行状況を把握することを目的に、年間を通じインフルエンザウイルスの検出、分離・型別を行っている。さらに国立感染症研究所と共同で実施している「感染症発生動向調査に基づくインフルエンザサーベイランス」の一環として、我が国のインフルエンザウイルスの詳細な流行状況を把握することを目的とし、一部の分離株の提供を行い、それらは遺伝子解析、抗原性解析、薬剤耐性変異株の検索に用いられている。

大阪健康安全基盤研究所微生物部ウイルス課

ここでは、新型コロナウイルス感染症の流行の影響を受け、3 シーズンぶりの流行となった2022/2023 シーズン流行期のうち2022 年第36 週から2023 年第17 週の大阪府内のインフルエンザ流行状況に加え、分離株の遺伝子系統樹解析、および季節性インフルエンザウイルスの検出が陰性であった検体について他の呼吸器ウイルスの検出を行ったので併せて報告する。

研究 方 法

1. インフルエンザ定点サーベイランス

大阪府内の流行状況の把握には、大阪府感染症発生動向調査事業に則り、大阪府感染症情報センターから発出される患者情報、定点あたり患者数を用いた。警報レベル、流行期入りの目安についても同センターの基準値に従った⁴⁾。

2. インフルエンザ病原体サーベイランス

大阪府感染症発生動向調査事業に基づきインフルエンザ指定提出機関にて採取された上気道由来検体を対象とした。2022/2023 シーズンのうち、2022 年第36 週(9月5日～9月11日)から2023 年第17 週(4月24日～4月30日)までに採取され、大阪健康安全基盤研究所ウイルス課に搬入された81 検体についてインフルエンザウイルスの検出および遺伝子解析を行った。

3. インフルエンザウイルスまたは他の呼吸器ウイルスの遺伝子検出

搬入された上気道由来検体の200 μ L を核酸抽出に供した。核酸抽出はMagDEA Viral DNA/RNA200 (GC) キット (Precision System Science) を用い、全自動核酸抽出機 (Precision System Science) にて行った。抽出した核酸はインフルエンザ診断マニュアル⁵⁾ に従いリアルタイム RT-PCR (reverse transcription- polymerase chain reaction) 法によるインフルエンザウイルス遺伝子の検出を行った。

インフルエンザウイルスの検出が陰性であった検体については、リアルタイム PCR 法による呼吸器ウイルスの検出を行った⁶⁾。エンテロウイルス (EV) およびライノウイルス (RV) は共通領域を検出するため、陽性となった場合は、核酸を用いて VP4-2 領域に対する semi-nested RT-PCR 法を行い、増幅産物のダイレクトシーケンスにて遺伝子配列を決定し、BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) にて型別を行った⁷⁾。

4. インフルエンザウイルスの分離培養と分離株の解析

24 ウェルプレートに単層培養した Madin - Darby Canine Kidney (MDCK) 細胞にヒト2,6-シアル酸転移酵素 cDNA をトランスフェクションし、細胞表面の糖鎖末端をアルファ 2-6 結合のシアル酸が多く占めるよう作製された AX-4 細胞 (東京大学医学研究所 河岡教授より分与)⁸⁾ に各ウェル 300 μ L の検体を接種し34 $^{\circ}$ C、30 分吸着後、分離用培地である3 μ g/mL アセチルトリプシン (SIGMA) 添加 DMEM (SIGMA) 培地に交換し、34 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 存在下で1 週間培養し細胞変性効果 cytopathic effect (CPE) を観察した。

CPE が観察された場合、培養上清を回収し、型別に供した。CPE が観察されない場合は盲継代を行い、2 代目で CPE が観察されない場合は分離陰性とした。

CPE が陽性であった培養上清は、3 μ L を蒸留水にて50 倍に希釈し、その5 μ L を検体として直接リアルタイム RT-PCR 法によるウイルス遺伝子の検出を行うことで型別を実施した⁵⁾。

また、A 型分離株については、RNA を抽出後、HA 遺伝子の全長の塩基配列を決定し⁵⁾、インフルエンザウイルス遺伝子データベース GISAID (Global Initiative on Sharing All Influenza Data)⁹⁾ から入手したワクチン株とともに最尤法による系統樹解析を行った。解析に供した株は流行期において地区、検体採取日が偏らないよう分離株を選択した。系統樹上のクレード、サブクレードの区別については全国データを参考とした。

3 月末までに型別にて AH3 亜型と判定された株については、培養上清の50 倍希釈液から核酸抽出を実施し、ポリメラーゼ A (PA) 遺伝子の部分塩基配列を決定し、キャップ依存性エンドヌクレアーゼ阻害剤であるバロキサビルマルボキシル (商品名ゾフルーザ) の耐性遺伝子変異を検索した。

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は、GISRS の一環として、病原体検出情報システムに登録された全国の分離株情報をもとに、無作為に抽出した株の分与を各地方衛生研究所に依頼し、分与株の詳細な抗原性解析や遺伝子解析を行なっている。これらのデータは WHO および国内のインフルエンザ流行予測、ワクチン株選定の資料となる他、地方衛生研究所へと還元されている。したがって、本報告中のインフルエンザウイルス HA

遺伝子の塩基配列データ 5 株分 (A/OSAKA/〇〇/〇〇〇〇と大阪のアルファベット表記が全て大文字として区別)、詳細な抗原性解析データ 3 株分については、当課からの分与株に関して国立感染症研究所から還元された解析結果である。

本報告の一部は、地方独立行政法人大阪健康安全基盤研究所倫理審査委員会の承認を得て(承認番号 1402-02-5)、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」を順守して実施したものである。

結 果

1. インフルエンザ定点サーベイランス、病原体サーベイランスに基づく大阪府内のインフルエンザ流行状況とインフルエンザウイルス検出結果

2022/2023 シーズンにおいて、インフルエンザ流行期入りの目安となる「定点あたりの患者数」が 1 を超えたのは、前回流行が見られた 2019/2020 シーズンより 4 週遅い第 51 週 (12 月 19 日～12 月 25 日)であった。定点あたり患者数が 30.0 を超えた警報域の週は認められず、2023 年第 5 週にピークの 29.9 となった後患者数は速やかに減少した。2019/2020 シーズンの流行と比較すると、ピークに達するまでの患者数の増加傾向、ピーク後の患者数の減少は急速で、ピーク時の患者数は多く、期間中の患者報告数合計も 2019/2020 シーズンの 57285 人より増加した 59936 人であった¹⁰⁾ (図 1)。

インフルエンザウイルスの検出を、流行期を含む 2022 年第 36 週～2023 年第 17 週までに採取され、当所に搬入された 81 検体に対して実施した。シーズン最初の検体搬入は第 44 週であり、以降 6 月 14 日現在も少数ではあるが断続的に検体搬入が続いている状態である。研究期間中に検出されたウイルスは 75 検体が AH3 亜型陽性、1 検体が B 型 Victoria 系統陽性であったことから、今シーズンの流行は AH3 亜型の単独流行であり、地域的に B 型 Victoria 系統が小さく流行したと考えられた。研究期間中に AH1pdm09 亜型、B 型 Yamagata 系統は検出されなかった (図 1)。

また、前シーズンである 2021/2022 シーズンは定点あたり患者数が 1.0 を超えるインフルエンザの流行期は認められなかった。しかし、シーズン終了近くの 2022 年第 27 週から府内で患者数報告が増加し、第 27 週から週を追うごとに 17、75、104、57

例の患者発生が報告され、搬入された検体からは AH3 亜型が検出された (データ示さず)。

2. インフルエンザウイルス分離株の遺伝子系統樹解析および抗原性解析

国内における AH3 亜型ウイルス分離株の遺伝子系統樹解析の結果については、国立感染症研究所公表のクレードの記載法に従った¹¹⁾。HA 遺伝子系統樹上の各クレードは、3C.2a1b.2a (K83E, Y94N, I522M) 内に属している () 内は特徴的なアミノ酸変異)。このクレード内には 3C.2a1b.2a.1 (F193S, Y195F, G186S, S198P) および 3C.2a1b.2a.2 (F193S, Y195F, Y159N, T160I, L164Q, G186D, D190N) が派生している。3C.2a1b.2a.2 は更に、3C.2a1b.2a.2a (H156S)(省略名: 2a、代表株 A/Darwin/9/2021)、3C.2a1b.2a.2b (E50K, F79V, I140K)、3C.2a1b.2a.2c (S205F, A212T)、3C.2a1b.2a.2d (G62R, H156Q, S199) に分岐している。また 2a 内は 2a.1 (D53G, D104G, K276R)、2a.1a (2a.1 + L157I, S262N)、2a.1b (2a.1 + I140K, R299K)、2a.2 (2a + I25V, D53G, R201K, S219Y)、2a.3 (2a + D53N, N96S, I192F, N378S)、2a.3a (2a.3 + E50K)、2a.3a.1 (2a.3a + I140K, I223V)、2a.3b (2a.3 + I140M) に細分化される。

大阪府内での 2022 年 7 月からの分離株について解析した結果、全国と同様に 7 月、11 月の分離株である A/OSAKA/1/2022、A/OSAKA/2/2022 は 2a 内で D53N, P289S, R307K を持つウイルスであったが (図 2 今期ワクチン株 A/Darwin/9/2021 の上部 2 株)、流行期に入ってから分離された A/OSAKA/1/2023 以降の分離株は 2a.3a と 2a.1 に属する株がおおよそ 1:1 であり、2a.1 内では 2a.1b に属する株が多くを占めた (図 2)。

抗原性解析に関する 2022/2023 シーズンの還元データでは、解析された 3 株はいずれもワクチン株である A/Darwin/9/2021 に対し抗原類似株と判定された。

キャップ依存性エンドヌクレアーゼ阻害剤であるバロキサビルマルボキシルの耐性遺伝子変異を検出するため PA 遺伝子の部分塩基配列を決定したが、2023 年 3 月末までの全ての分離株においては、耐性遺伝子変異は見られなかった。

3. インフルエンザウイルス以外の呼吸器ウイルスの検出

2022/2023 シーズン流行期において、臨床症状からインフルエンザと診断されたが、その患者から採取された上気道由来検体からインフルエンザウイ

ルスが検出されなかった検体は5検体であった。その内、迅速診断キットにてA型インフルエンザ陽性と診断されていた患者の検体は2検体、キットにてB型が陽性であった検体は2検体、他の1検体はキット実施状況が不明であった。

この5検体のうちで、他の呼吸器ウイルスが検出されたのは3検体で、全てキット陽性例からであった(表1)。検出されたウイルスはパレコウイルスが2検体、ライノウイルスが1検体であり、ライノウイルスはBLASTを用いた型別の結果、C16型と判定された。

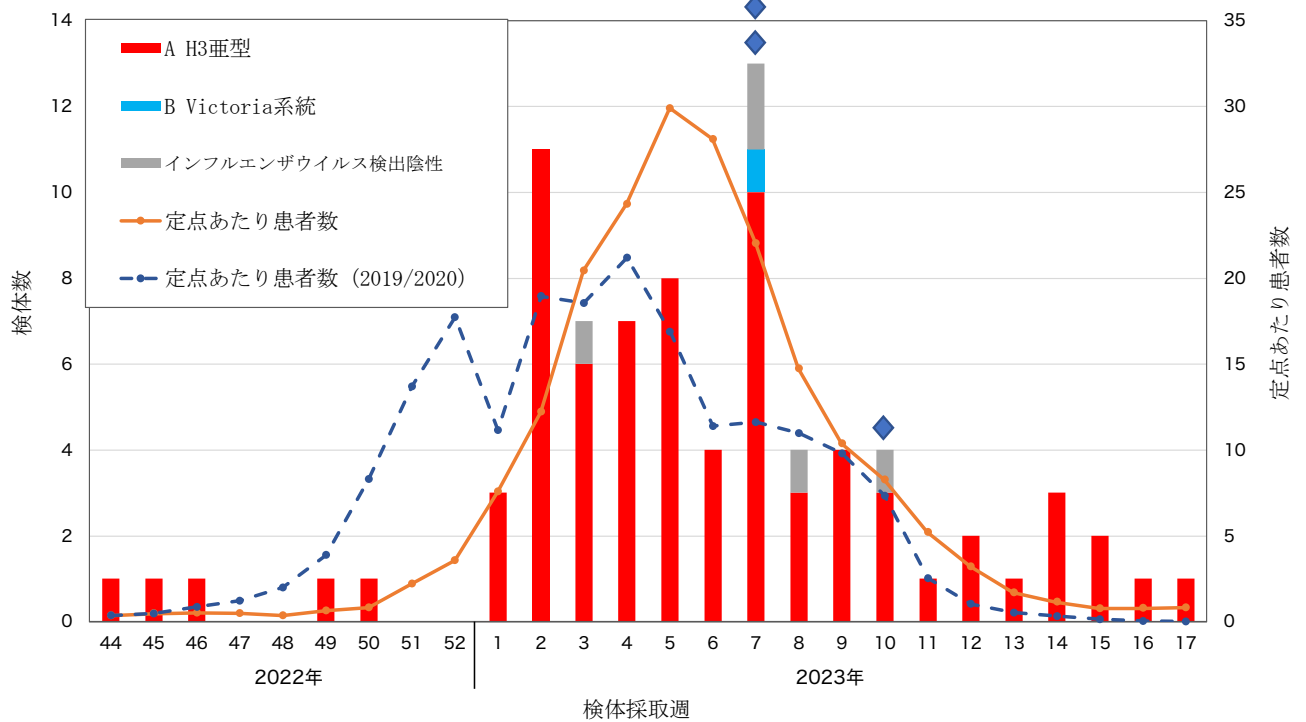


図1. 2022年第44週～2023年第17週のインフルエンザウイルス検出状況と定点あたり患者数の推移
各週の棒グラフ上のシンボル(◆)は、当該週にインフルエンザウイルス (Flu) 陰性であった検体1検体につき、インフルエンザウイルス以外の呼吸器ウイルスが検出されたことを示す。検出ウイルス種については表1に掲載。

表1 インフルエンザウイルス陰性検体からの他の呼吸器ウイルス検出状況

検体採取週	検出ウイルス (インフルエンザ迅速診断キットの情報)
2023年 第7週	パレコウイルス (A型インフルエンザ陽性)
第7週	C群ライノウイルス16型 (B型インフルエンザ陽性)
第10週	パレコウイルス (A型インフルエンザ陽性)

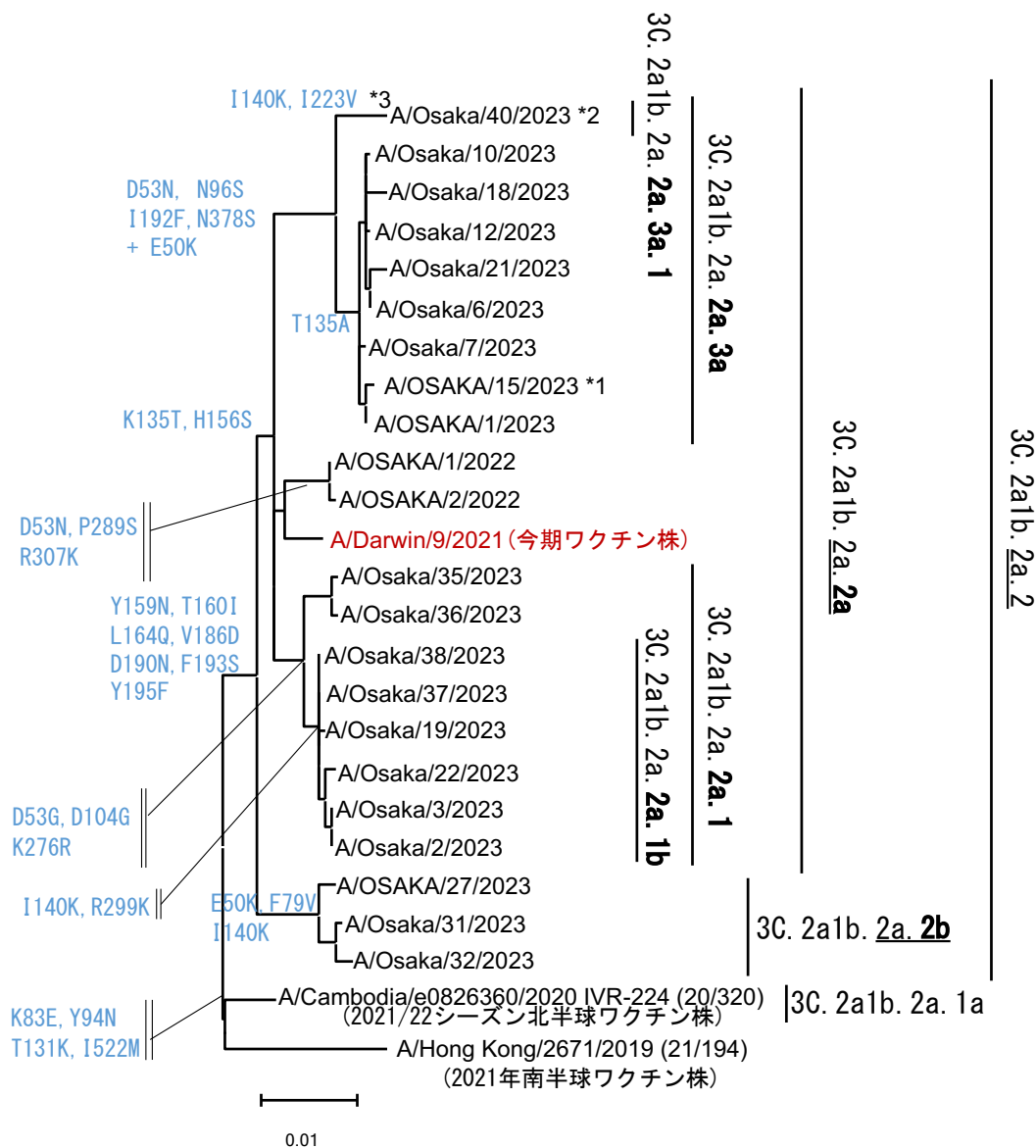


図2 2022/2023 シーズン AH3 亜型大阪府分離株の HA 全長の遺伝子系統樹解析

- *1. OSAKA 表記は国立感染症研究所でのシーケンスデータ
- *2. Osaka 表記は当課でのシーケンスデータ
- *3. 各クレードの分岐点に、クレードごとに共通の特徴的なアミノ酸変異を青字にて示す

考 察

2022/2023 シーズンの大阪府内におけるインフルエンザの流行は、前回の流行シーズンより 4 週遅い 2022 年第 51 週に定点あたりの患者数が 1.0 を超え流行期入りとなった。患者数はその後増加し、2023 年第 5 週に定点あたり患者数が 29.9 となったのをピークに減少に転じ、第 15 週に定点あたり 1.0 を下回り流行期終了となった。前回流行が認められた

2019/2020 シーズンと同様に定点あたり患者数が 30.0 を超えた警報域の週はなく小規模な流行となった。これは、新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) の感染拡大防止策として、一般的な飛沫感染防止策 (手洗い実施、マスク着用) が継続して徹底されていることが影響していると考えられる。

当課にインフルエンザ指定提出機関から搬入される検体は、迅速診断キットでインフルエンザ陽性であった患者由来のものが多く、迅速診断結果が表

記されていない検体も含めた 81 検体に対するインフルエンザウイルスの検出率は 93.8%と高値であった。

2022/2023 シーズンの病原体サーベイランスに基づく検査による検出ウイルスは、全国データでも AH3 亜型がほとんどを占めており¹²⁾、大阪府においても同様であった。前回流行が認められた 2019/2020 シーズンは AH1pdm09 亜型と B 型 Victoria 系統の検出が主であり、全国的に AH3 亜型の検出が少なかったこと、さらにその後 2 シーズンは新型コロナウイルスの流行の影響を受けインフルエンザの流行が見られなかったことから、地域の AH3 亜型に対する感染抗体の保有率は低下しており、感染防止策が徹底されていた中でも流行が見られたと考えられた。

国内における AH3 亜型ウイルス分離株の遺伝子系統樹解析の結果については、国立感染症研究所から、HA 遺伝子系統樹上のクレード 3C.2a1b.2a 内の 3C.2a1b.2a.1 および 3C.2a1b.2a.2 について、「流行の中心は 3C.2a1b.2a.2 であり、更にこれらが 3C.2a1b.2a.2a、3C.2a1b.2a.2b、3C.2a1b.2a.2c、3C.2a1b.2a.2d に分岐し、また 2a 内には 2a.1、2a.1b、2a.3、2a.3a、2a.3a.1、2a.3b が出現しており遺伝子的に多様化が進んでいる。国内流行株では、2022 年 7~8 月は 2a 内で D53N, P289S, R307K を持つウイルスが主流であったが、2022 年 9 月以降は 2a.3a(39.7%)、2a.3a.1 (16.4%)、3C.2a1b.2a.2b (26.0%) に属するウイルスが主流となっている。」と公表されている¹¹⁾。

大阪府内では前回流行が見られた 2019/2020 シーズンに当課で分離された 2 株は 3C.2a1b.1 に属した。2019/2020 シーズンにおいては、2019 年 9 月以降の全国の分離株の 56.0%がこのクレードに属していたが、現在はこのクレードから派生した株は報告されていない。大阪府内での 2022 年 7 月からの分離株について解析した結果、全国と同様に 7 月、11 月の分離株である A/OSAKA/1/2022、A/OSAKA/2/2022 は 2a 内で D53N, P289S, R307K を持つウイルスであったが、流行期に入ってから分離された A/OSAKA/1/2023 以降の分離株は 2a.3a と 2a.1 に属する株がおおよそ 1 : 1 であり、2a.1 内では 2a.1b に属する株が多くを占めた (図 2)。また、3C.2a1b.2a.2b に属する分離株の割合は全国とは異なりやや少なく、2a.3a や 2a.1 に属する株の 3 分の 1 程度であった。一方、2a.3a.1 に属する分離株は解

析した中では 1 株のみであった。府内においては、初夏になっても継続してウイルスが検出されており、今後どのクレードに属するウイルスが増加してくるのか注目される。

抗原性解析結果においては、国立感染症研究所から還元された 2022 年 7 月の AH3 亜型分離株の解析結果では、2021/2022 シーズンの WHO のワクチン推奨株である A/Cambodia/e0826360/2020 (細胞分離株) に対するフェレット感染血清と反応性の低下が認められたが、2022/2023 シーズンのワクチン推奨株である A/Darwin/9/2021 (細胞分離株) とは類似の抗原性であったことが報告されており、また、2022/23 シーズン流行期の分離株 2 株の解析結果も同様であった。全国データでも、抗原変異株と判定された株は解析株のうちの 1.0%であり¹¹⁾、WHO の次シーズン 2023/2024 のワクチン推奨株も AH3 亜型は変更なく A/Darwin/9/2021³⁾となっている。一方、2022/2023 シーズンに流行しなかった AH1pdm09 亜型、B 型については、世界各国での流行株の抗原性解析結果を受けて、それぞれ推奨株が A/Victoria/4897/2022、B/Austria/1359417/2021 と変更されており、さらに我が国では 3 シーズン流行が見られていないことから、次シーズン流行前のワクチン接種が重要である。

2023 年 5 月 8 日以降、新型コロナウイルス感染症の類型が 5 類へと移行となり、それに先立って 3 月 13 日よりマスク着用が個人の判断に委ねられることとなった¹³⁾。これまでは新型コロナウイルス感染症対策として飛沫感染防止策が徹底されていたことで、飛沫感染を主な感染ルートとする呼吸器ウイルス感染症の流行は総じて抑えられてきた。インフルエンザの地域での流行は学校内へのウイルスの持ち込みによる集団感染によって拡大していくことが多く、校内でのマスク着用が個々の判断となった後、集団での感染リスクは増加すると考えられる。このことより、2023/2024 シーズンは、ワクチン接種のみならず、冬期の本格的な流行期までの夏から初秋にかけて、地域流行の探知と流行株の解析による早期のインフルエンザ対策が重要と考えられる。

PA 遺伝子の部分塩基配列を決定し、キャップ依存性エンドヌクレアーゼ阻害剤であるバロキサビルマルボキシルの耐性遺伝子変異の有無を調査した。大阪府内における 3 月末までのインフルエンザウイルス分離株では耐性遺伝子変異は検出されな

かったが、6月14日に更新された全国データを見ると、全国から報告があったAH3亜型317株のうち4株(1.3%)で耐性変異が検出されており、3株は薬剤未投与例からの検出例であったと報告されている¹⁴⁾。抗インフルエンザウイルス薬の使用状況に影響されるが、今後耐性変異を有する株が広がってくるのか、引き続きのモニタリングが必要である。

2022/2023シーズンのインフルエンザの流行は小規模であったため、当課に搬入されたインフルエンザ疑いの検体数は少なく、それに応じてインフルエンザウイルスが検出されなかった検体も5検体と少なかった。他の呼吸器ウイルスが陽性となった検体も3検体と少なく、うち2検体からパレコウイルス、1検体からはC群ライノウイルス16型が検出された。全国的には2022年夏期にパレコウイルス3型、その後秋期に1型の検出が増加していたが、2023年に入ってからほとんど検出されておらず¹⁵⁾、今回検出された2検体においては散発例であったと考えられた。

謝 辞

本研究の一部は、厚生労働行政推進調査事業費補助金「ワクチンの有効性・安全性の臨床評価とVPDの疾病負荷に関する疫学研究」の一環として行われた。

本研究において、検体採取、情報提供、諸連絡等に携わって頂きました、全ての皆様に深謝致します。

利 益 相 反

開示すべき利益相反はない。

文 献

- 1) 国立感染症研究所. IDWR 感染症の話「インフルエンザとは」.
<https://www.niid.go.jp/niid/ja/kansennohanashi/219-about-flu.html>
- 2) 福島若葉. 6歳未満児におけるインフルエンザワクチンの有効性:2013/14および2014/15シーズン (厚生労働省班研究報告として). *IASR* 2016; **37**: 230-231.
- 3) WHO. Recommendations announced for influenza vaccine composition for the 2023-2024 northern hemisphere influenza season.
<https://www.who.int/news/item/24-02-2023-recommendations-announced-for-influenza-vaccine-composition-for-the-2023-2024-northern-hemisphere-influenza-season>
- 4) 大阪府感染症情報センター. インフルエンザ関連情報.
<http://www.iph.pref.osaka.jp/infection/influ/shingata.html>
- 5) 国立感染症研究所. インフルエンザ診断マニュアル(第3版)リアルタイムRT-PCR(TaqMan Probe法)による同定. 平成26年. 24-28.
- 6) Morikawa S, Hiroi S, Kase T. Detection of respiratory viruses in gargle specimens of healthy children. *J Clin Virol* 2015; **64**: 59-63.
- 7) Ishiko H, Shimada Y, Yonaha M, Hashimoto O, Hayashi A, Sakae K, Takeda N. Molecular diagnosis of human enteroviruses by phylogeny-based classification by use of the VP4 sequence. *J Infect Dis* 2002; **185**: 744-754.
- 8) Hatakeyama S, Sakai-Tagawa Y, Kiso M, Goto H, Kawakami C, Mitamura K, Sugaya N, Suzuki Y, Kawaoka Y. Enhanced expression of an α 2,6-linked sialic acid on MDCK cells improves isolation of human influenza viruses and evaluation of their sensitivity to a neuraminidase inhibitor. *J Clin Microbiol* 2005; **43**: 4139-4146.
- 9) GISAID (The Global Initiative on Sharing All Influenza Data). Epi Flu™.
<http://platform.gisaid.org/epi3/frontend#1832a9>
- 10) 森川佐依子, 廣井聡, 本村和嗣. 大阪府内における2019/2020シーズンのインフルエンザ流行状況. *大阪健康安全基盤研究所 研究年報* 2020; **4**: 9-17.
- 11) 国立感染症研究所. 「インフルエンザウイルス流行株抗原性解析と遺伝子系統樹(2023年3月30日)」.
<https://www.niid.go.jp/niid/ja/flu-antigen-phylogeny.html>
- 12) 国立感染症研究所. IASR インフルエンザウイルス分離・検出速報(自動更新 2023年6月14日作成)
<https://kansen-levelmap.mhlw.go.jp/Byogentai/Pdf/data2j.pdf>
- 13) 厚生労働省. 感染症対策・健康や医療相談の情報「新型コロナウイルス感染予防のために」

- https://www.mhlw.go.jp/stf/covid-19/kenkou-iryousoudan.html#h2_1
- 14) 国立感染症研究所. 抗インフルエンザ薬耐性株サーベイランス 2022/2023 シーズン エンドヌクレアーゼ阻害薬耐性変異株検出情報 最終更新日 2023/6/14
<https://www.niid.go.jp/niid/images/flu/resistance/20230613/dr22-23j20230613-5.pdf>
- 15) 国立感染症研究所. IASR Topics グラフ (RS ウ

イルス/ムンプスウイルス/EV68/パレコウイルス/A 型肝炎ウイルス) パレコウイルス月別分離・検出報告数

<https://www.niid.go.jp/niid/ja/typhi-m/iasr-reference/510-graphs/4563-iasrgtopics.html>

WEB サイトの内容は 2023 年 6 月 14 日に確認した。

Epidemic situation of influenza during the 2022/2023 season in Osaka prefecture

Saeko MORIKAWA, Satoshi HIROI, Niichiro ABE and Haruyo MORI

Influenza virus isolation and viral genome detection from clinical specimens was performed throughout the year to understand the epidemic situation of influenza in Osaka Prefecture. Furthermore, influenza viruses were isolated and the antigenic and genetic properties of the circulating strains were analyzed every winter influenza season.

During the 2022/2023 influenza season in Osaka prefecture, influenza activity increased in the 51st week in 2022, peaked in the 5th week in 2023 and decreased. During this season, influenza AH3 subtype virus predominated. Influenza B Victoria lineage virus was detected in the 7th week 2023. We tested specimens delivered by the end of April 2023. As a result, influenza AH1pdm09 subtype and influenza B Yamagata lineage viruses were not detected. The phylogenetic tree of the hemagglutinin (HA) gene of influenza viruses isolated nationwide was divided into multiple clades. HA genes of isolates from Osaka Prefecture were also divided into multiple clades; however, the ratio of isolates belonging to each clade differed from that of isolates from Japan.

We also tested five influenza virus-negative specimens for other respiratory viruses. Respiratory viruses other than influenza virus were detected in three samples, two of which were positive for parechovirus. Rhinovirus was detected in one other sample.

Key words : influenza virus, infectious agents surveillance, respiratory virus

大阪府におけるエンテロウイルス感染症の流行状況と分子疫学的解析 (2022 年度)

中田恵子, 前田和穂, 森 治代

2022 年度の手足口病 (16 名) またはヘルパンギーナ (6 名) の患者から検出されたエンテロウイルスはそれぞれ、コクサッキーウイルス A6 型 (CV-A6) (7 名)、コクサッキーウイルス A16 型 (CV-A16) (4 名) と CV-A6 (5 名)、CV-A16 (1 名) であった。無菌性髄膜炎患者からはエンテロウイルスは検出されなかった。CV-A6 および CV-A16 の分離株の Viral Protein 1 領域を用いた系統樹解析の結果、2022 年度の CV-A6 の 6 株、CV-A16 の 3 株はそれぞれ同じクラスターに分類され、遺伝子型はそれぞれ D と B であった。また、2022 年度の CV-A6 の 6 株は、2019、2021 年度の大阪健康安全基盤研究所 (当所) 分離株および 2017 年、2018 年、2019 年の中国株と同じクラスターを形成した。一方、2022 年度の CV-A16 の 3 株は 2019 年度の当所分離株および 2017 年の中国株と同じクラスターを形成した。2022 年度シーズンに検出された CV-A6 および CV-A16 はともに 2019 年度シーズン以前に国内に流入した後、国内で循環していた可能性が考えられた。エンテロウイルス感染症では、各疾患の原因ウイルスの遺伝子型および系統が毎年異なることから、今後も引き続きその動向を調査する必要がある。

キーワード：手足口病、ヘルパンギーナ、無菌性髄膜炎、エンテロウイルス

毎年夏季に小児の患者数が増加するエンテロウイルス (Enterovirus; EV) 感染症の中で、手足口病、ヘルパンギーナ、無菌性髄膜炎は「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) において 5 類感染症の定点把握疾患に指定されている。各疾患の原因となるウイルスの型は年毎に変動があり、患者から検出されるウイルスは疾患ごとに特徴がある¹⁾。また、ウイルス型によっては中枢神経症状を引き起こす等、重症化との関連が疑われる²⁾ ことや、流行するウイルス型が一定の周期で繰り返される傾向が認められるため³⁾、流行を予測する観点から毎年の流行解析は重要である。本稿では、2022 年 4 月 1 日から 2023 年 3 月 31 日の期間に手足口病、ヘルパンギーナまたは無菌性髄膜炎と診断された患者検体から検出されたウイルスと患者の疫学情報を集約し、EV 遺伝子の分子疫学的解析を実施し、EV の流行状況を検討したので大阪健康安全基盤研究所微生物部ウイルス課

報告する。

調 査 方 法

1. 検体及び情報収集

2022 年 4 月 1 日から 2023 年 3 月 31 日の期間に、大阪府内 (ただし、堺市、2023 年 2 月までは大阪市を除く) の定点医療機関から当所に搬入された手足口病、ヘルパンギーナまたは無菌性髄膜炎と診断された 32 名から採取された 41 検体を対象とした。検体種別の内訳は髄液が 9 検体、咽頭ぬぐい液 (鼻腔ぬぐい、鼻汁含む) が 26 検体、便 (直腸ぬぐい含む) が 6 検体であった。患者情報 (患者の年齢、性別、診断名、発症日) は感染症法に基づく感染症発生動向調査事業によって得られた調査票より収集した。

2. 検体からのウイルス遺伝子検出および遺伝子型別

便乳剤の遠心分離後の上清およびその他の全ての検体からそれぞれ 200 μ L を採取し、ウイルス RNA 抽出用検体とした。ウイルス RNA の抽出は、Magtration®-MagaZorb RNA Common Kit (PSS 社) を用いて、全自動核酸抽出装置 Magtration® System 6GC または 12GC (PSS 社) で行った。抽出したウイルス RNA を用いて EV の Viral Protein (VP) 4-2 領域に対する seminested RT-PCR⁴⁾ を実施後、増幅産物のダイレクトシーケンスを行ない、BLAST 解析にて遺伝子型を決定した。

3. 培養細胞によるウイルス分離

培養細胞によるウイルス分離には、ウシ胎児血清を 10% の濃度で添加したアディキュアイーグル MEM 培地 (島津ダイアグノスティクス) を用いて、48 ウェルプレートで培養した RD-A、VeroE6、FL、Caco-2 細胞を使用した。咽頭ぬぐい液は、綿棒で咽頭を擦過後、検体輸送用培地に浸漬した溶液 (検体溶液) を、髄液は無処理でそれぞれ 100 μ L ずつを各細胞に接種した。便は、緩衝液 (ラク トアルブミン水解物溶解液) で 10% 懸濁液 (便乳剤) を作製し、15,000 rpm で 5 分間遠心分離後、その上清を同緩衝液で 10 倍希釈し、0.45 μ m シリンジフィルターでろ過した溶液を 100 μ L ずつを各細胞に接種した。各細胞への検体接種後、CO₂ 濃度 5%、37°C のインキュベーターで 1 週間培養し、細胞変性効果 (cytopathic effect; CPE) を観察した。CPE が出現した場合にウイルス分離陽性と判定し、培養上清を回収した。なお、3 代盲継代を繰り返し、CPE が出現しなかった場合をウイルス分離陰性と判定した。

4. 哺乳マウスによるウイルス分離および系統樹解析

手足口病およびヘルパンギーナの患者由来検体については哺乳マウスを用いてウイルス分離を実施した。生後 72 時間以内の哺乳マウス 3 匹を 1 群とし、ウイルス分離用に上述のように処理した検体を頸部皮下に 5-10 μ L 接種した。その後、1 週間観察し、麻痺を呈した個体から筋肉部分を回収した。回収した筋肉を緩衝液と混和後、ホモジナイズし、15,000 rpm で 5 分間遠心分離した。その上清から 200 μ L を採取し、上述の方法でウイルス RNA を抽

出した。抽出したウイルス RNA を用いて EV の VP1 領域に対する RT-PCR⁵⁾ を実施後、増幅産物のダイレクトシーケンスを行ない、近隣結合法を用いた系統樹解析を実施した。なお、検体を接種した哺乳マウスが麻痺を起こさなかった場合、ウイルス分離陰性とした。

動物実験は、地方独立行政法人大阪健康安全基盤研究所動物実験委員会により承認された動物実験計画書に沿って、適切に実施した (承認番号 D-H30-2-5)。

本研究は、地方独立行政法人大阪健康安全基盤研究所倫理審査委員会の承認を得て実施したものである (承認番号 1310-05-6)。

結 果

1. 患者情報のまとめ

検体が採取された患者のうち、手足口病と診断された患者は 16 名で、年齢の中央値が 1 歳 5 か月 (1 歳 4 歳 3 か月)、性別は男性 9 名、女性 7 名であった。ヘルパンギーナと診断された患者は 6 名で、年齢の中央値は 1 歳 11 か月 (0 歳 7 か月-3 歳 4 か月)、性別は男性 3 名、女性 3 名であった。無菌性髄膜炎と診断されたのは 10 名で、年齢の中央値は 1 歳 (範囲: 0 か月-3 歳 11 か月)、性別は男性 3 名、女性 7 名であった。

2. 検体からの EV 検出状況と疾患別月別の検出 EV の遺伝子型

手足口病、ヘルパンギーナあるいは無菌性髄膜炎と診断された合計 32 名分、41 検体のうち 17 名分、17 検体で EV 遺伝子検出が陽性となった。手足口病患者では 16 名中 7 名からコクサッキーウイルス A6 型 (Coxsackievirus A6; CV-A6)、4 名から CV-A16 の遺伝子が検出された (表 1)。ヘルパンギーナ患者では 6 名中 5 名から CV-A6、1 名から CV-A16 の遺伝子が検出された (表 2)。無菌性髄膜炎患者の 10 名からは EV 遺伝子は検出されなかった (表 3)。手足口病またはヘルパンギーナ患者で CV-A6 または CV-A16 遺伝子が陽性であった (表 1、2)。手足口病の患者検体において、CV-A6 は 7 月から 9 月と 11 月に検出された。また、CV-A16 は 8 月と 9 月に検出された (図 1)。ヘルパンギーナ患者からは CV-A6 が 8 月から 12 月まで、CV-A16 が 9 月に検

出された（図2）。

3. 培養細胞および哺乳マウスによるウイルス分離
 全ての検体において、培養細胞によるウイルス分離は陰性であった。一方、哺乳マウスによるウイルス分離では、CV-A6 または CV-A16 遺伝子が検出された手足口病またはヘルパンギーナ患者検体、それぞれ6検体と3検体から分離できた（表1、2）。

4. CV-A6 および CV-A16 の VP1 領域を用いた系統樹解析

CV-A6 および CV-A16 の哺乳マウス分離株（それぞれ6株と3株）について、ウイルス抗原決定領域である VP1 領域（解析が可能であった656塩

基と593塩基）を用いた系統樹解析を実施した。その結果、2022年度のCV-A6の6株は全てクレードD（サブクレードD3）に分類された。また、2019年度以降の当所分離株および2021年、2023年の国内株、2014年、2017年、2018年の中国株と同じクラスターを形成した（図3）。また、CV-A16については、2022年度の3株は全て、クレードB（サブクレードB1a）に分類され、単一のクラスターを形成したが、2019年度の当所分離株と最も近縁であった。2022年度のCV-A16分離株は2018年度以前の当所分離株よりも2017年の中国株、2013年、2014年のフランス株、2008年の中国株とより近縁であった（図4）。

表1. 手足口病患者由来検体におけるウイルス検出結果

	咽頭ぬぐい液 (n=14)			鼻汁 (n=1)			糞便 (n=1)		
	遺伝子検査	分離培養 (細胞)	分離培養 (哺乳マウス)	遺伝子検査	分離培養 (細胞)	分離培養 (哺乳マウス)	遺伝子検査	分離培養 (細胞)	分離培養 (哺乳マウス)
CV-A6	7	0	3	0	0	0	0	0	0
CV-A16	3	0	2	1	0	0	0	0	0
合計 (%)	10 (71)	0	5 (36)	1 (100)	0	0	0	0	0

表2. ヘルパンギーナ患者由来検体におけるウイルス検出結果

	咽頭ぬぐい液 (n=6)		
	遺伝子検査	分離培養 (細胞)	分離培養 (哺乳マウス)
CV-A6	5	0	3
CV-A16	1	0	1
合計 (%)	6 (100)	0	4 (67)

表3. 無菌性髄膜炎患者由来検体におけるウイルス検出結果

	髄液 (n=9)		咽頭ぬぐい液・鼻汁 (n=5)		糞便・直腸ぬぐい (n=5)	
	遺伝子検査	分離培養 (細胞)	遺伝子検査	分離培養 (細胞)	遺伝子検査	分離培養 (細胞)
合計 (%)	0	0	0	0	0	0

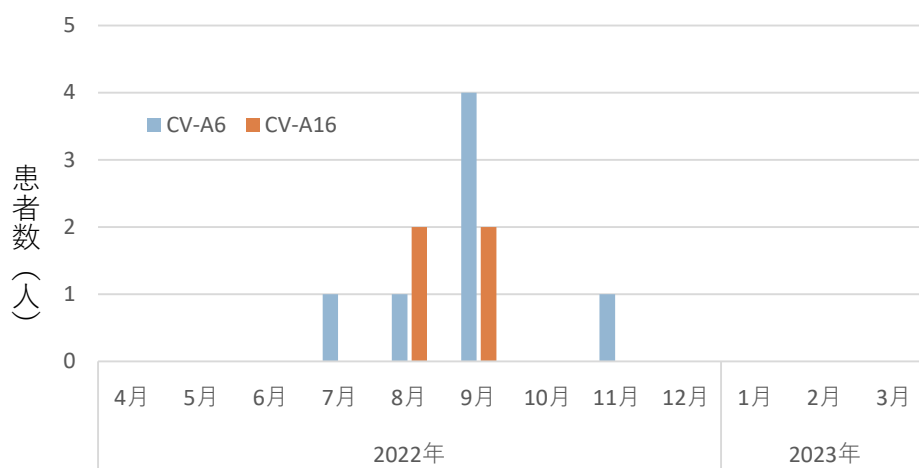


図1. 手足口病患者からの月別ウイルス検出状況

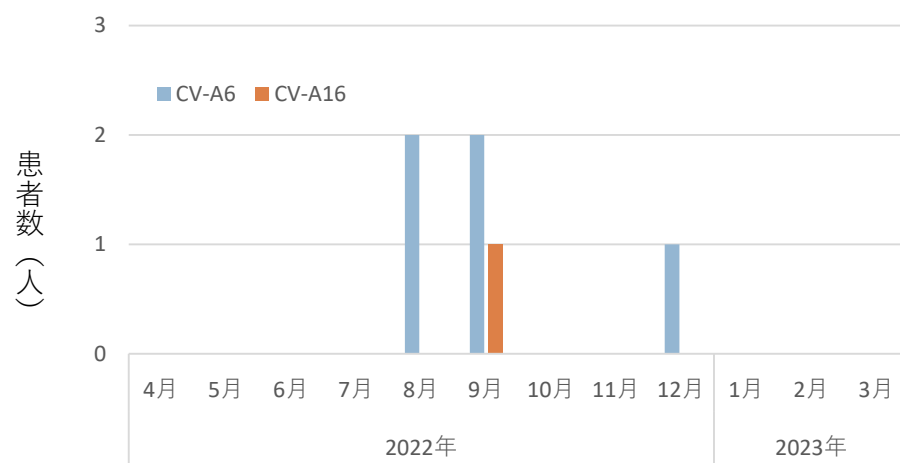


図2. ヘルパンギーナ患者からの月別ウイルス検出状況

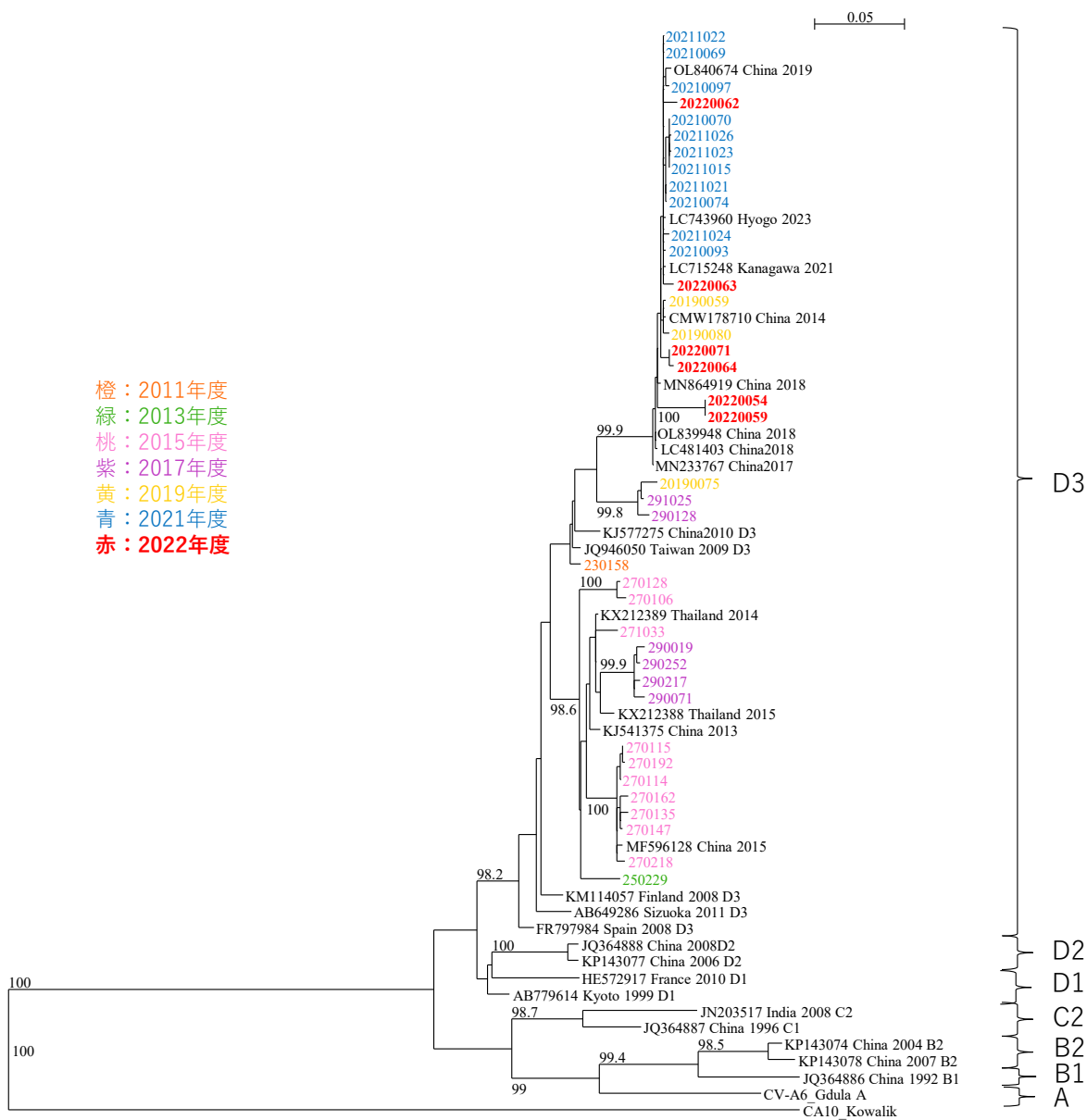


図 3. VP1 領域を用いた CV-A6 の系統樹解析 (656 塩基)

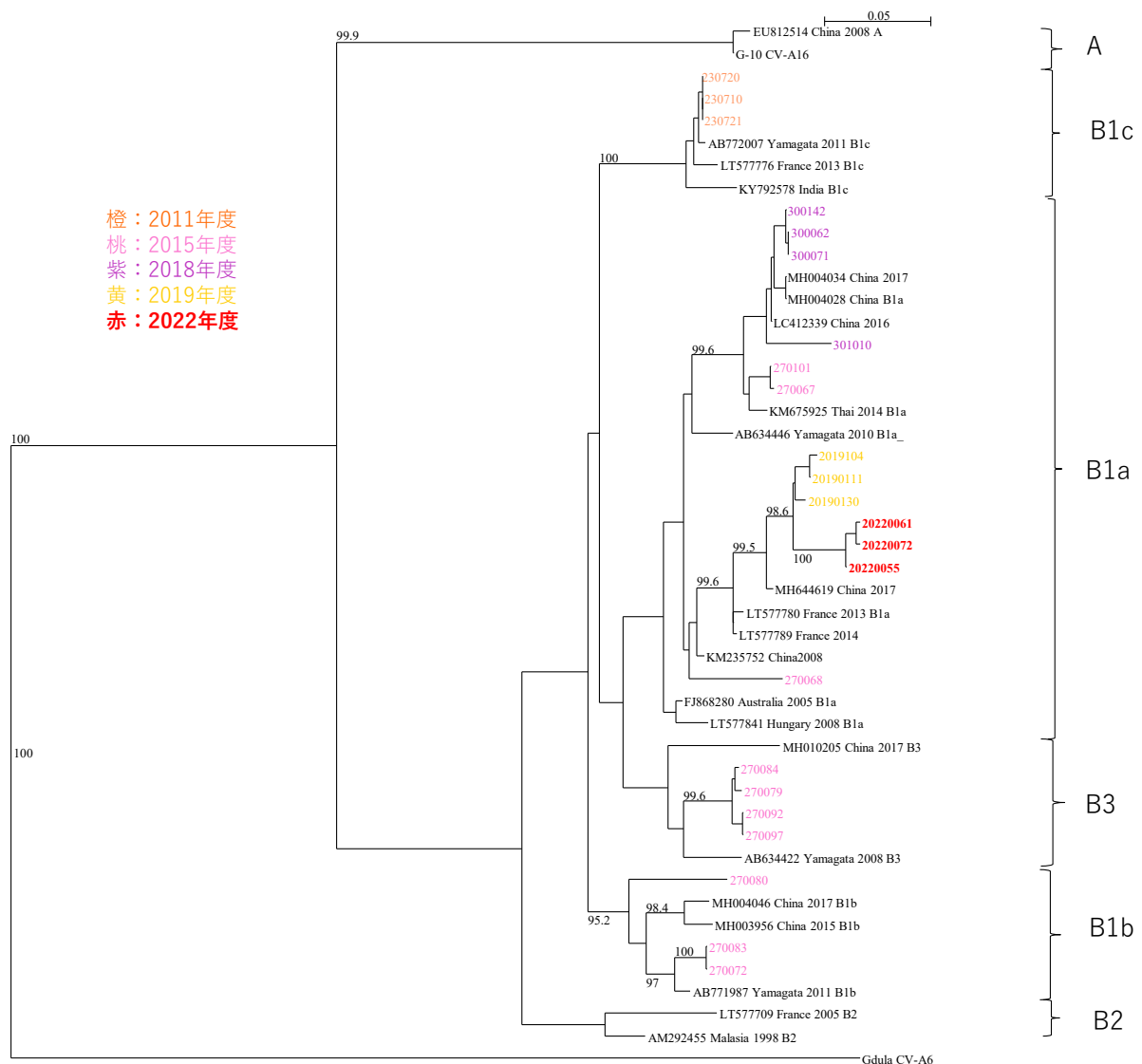


図 4. VP1 領域を用いた CV-A16 の系統樹解析 (593 塩基)

考 察

2022 年度、大阪府では手足口病およびヘルパンギーナの患者から CV-A6 および CV-A16 が検出された。その検出状況から手足口病は CV-A6 と CV-A16 の混合流行、ヘルパンギーナは CV-A6 が主な流行ウイルスであったと考えられた。2011 年の手足口病の大流行を契機に、それまでヘルパンギーナの病原ウイルスとして知られていた CV-A6 は、手足口病とヘルパンギーナの両疾患の原因として認識されるようになり¹⁷⁾、2022 年度はいずれの疾患においても主原因ウイルスとなった。2011 年度以降、大阪府では CV-A6 の検出の増加は隔年であ

ったが⁶⁻¹⁶⁾、2022 年度は 2021 年度に引き続いて夏季に CV-A6 の検出増加が認められた。大阪府では、CV-A6 が流行した 2015 年度、2017 年度および 2019 年度は、手足口病の定点医療機関当たりの患者数が 10 (警報レベルは定点医療機関当たり患者数が 5) を超える大きな流行となった¹⁸⁾。そのため、手足口病の好発年齢 (1 歳から 2 歳程度) の者の多くが流行時に CV-A6 による手足口病に罹患したと考えられる。CV-A6 による手足口病の流行が隔年であったのは、流行年に好発年齢の者の多くが CV-A6 に対する抗体を獲得し、その集団免疫状態が翌年まで維持されることが原因の一つとして推測できる。しかし、2021 年度の手足口病は、警報レベルには達さない程度の患者数であ

り、特に流行が小さかったため、手足口病の好発年齢の感受性者が多数残存する状態で2022年度を迎えた。そのため、2022年度は、2011年度以降では初めて、前年度に引き続き手足口病の患者でCV-A6が主な原因となったと考えられる。CV-A6の系統樹解析では、2019年度の分離株の一部と2021年度、2022年度の分離株が同じクラスターに分類された。2019年から同じ系統のCV-A6が国内で循環し、2022年度の流行に影響したことが示唆されるが、これは、新型コロナウイルス感染症（COVID-19）の感染防御策として国外からの人流が抑制されていたため、国外からのEVの流入が阻止されたことが原因と考えられる。CV-A16についても、2022年度分離株は全て2019年度分離株と同じクラスターに分類された。こちらも、CV-A6と同様に2019年度以降、国外から流入するEVの影響が少なかったことによると考えられた。さらに、2022年度、無菌性髄膜炎患者からEVが検出されなかったことについても、患者数や検査数の減少のみならず、手足口病やヘルパンギーナと同様にCOVID-19の流行が無菌性髄膜炎の流行動態に影響を与えたと考えられる。

CV-A6は培養細胞では比較的分離が困難なウイルスであるが、CV-A16は通常、RD-A細胞でよく増殖する。しかし、2022年度は培養細胞によるウイルス分離が両ウイルス共にできなかった。遺伝子検査で陽性となった検体がCV-A6が12検体、CV-A16が6検体と多くないとはいえ、培養細胞のみならずこれらのウイルスの分離効率が高いと言われている哺乳動物による分離培養においても両ウイルスともに半数程度しか分離ができなかった。本稿で、系統樹解析に用いた抗原決定領域であるVP1領域は、細胞への感染時にも重要な役割を果たすと考えられている。しかし、両ウイルスにおけるこの領域の系統樹解析の結果からは、2019年以降の分離株と大きな遺伝学的差異が認められていない。分離が困難になった原因にはウイルスの遺伝学的変化が考えられるため、VP1領域以外の領域の塩基配列についても解析を行う必要があると考えられた。

2022年度の大阪府におけるEV感染症は、流行サイクルやウイルス分離状況等において近年のEV感染症の傾向とは異なっていた。これは、COVID-19の流行による感染防止対策の徹底により、COVID-19以外の感染症の流行状況が大きく

変化したことが影響していると考えられる。ポストCOVID-19下ではさらに大きな変化があるかもしれない。

EV感染症は、流行するウイルスの型によって症状や疫学的動向も異なり、抗体保有状況によっては大規模な流行も懸念される。今後も引き続き、国内の流行解析に加えて世界的なEV感染症の動向を注視する必要があると考えられた。また、流行状況に合わせた検査情報を発信し、流行予測および流行拡大防止のための啓発に役立つ必要があると考えられた。

謝 辞

感染症発生動向調査事業に基づき、患者検体採取にご協力いただいた医療機関の先生方に深謝いたします。

利 益 相 反

開示すべき利益相反はない。

文 献

- 1) Heinz Z, Hans-Peter G. Clinical virology manual third edition-Enteroviruses. *American Society for Microbiology*, Washington, D. C 2000; 252-69.
- 2) Jones E, Pillay TD, Liu F, Luo L, Bazo-Alvarez JC, Yuan C, Zhao S, Chen Q, Li Y, Liao Q, Yu H, Rogier van Doorn H, Sabanathan S. Outcomes following severe hand foot and mouth disease: A systematic review and meta-analysis. *Eur J Paediatr Neurol* 2018 doi: 10.1016/j.ejpn.2018.04.007.
- 3) Abedi GR, Watson JT, Nix WA, Oberste MS, Gerber SI. Enterovirus and Parechovirus Surveillance - United States, 2014-2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2018; **67**(18): 515-518.
- 4) 石古博昭, 島田康司, 興那覇麻理, 栄賢司. 遺伝子系統解析によるエンテロウイルスの同定. *臨床とウイルス* 1999; **27**(4): 283-93.
- 5) Oberste MS, Maher K, Kilpatrick DR, Pallansch MA. Molecular evolution of the human enteroviruses: correlation of serotype with VP1 sequence and application to picornavirus classification. *J Virol* 1999;

- 73(3): 1941-8.
- 6) 中田恵子, 山崎謙治, 左近直美, 加瀬哲男. 大阪府におけるエンテロウイルスの検出状況と分子疫学的解析 (2011 年度). *大阪府立公衆衛生研究所研究報告 平成24 年*2012; 8-13.
- 7) 中田恵子, 山崎謙治, 左近直美, 加瀬哲男. 大阪府におけるエンテロウイルスの検出状況と分子疫学的解析 (2012 年度). *大阪府立公衆衛生研究所研究報告 平成25 年*2013; 7-13.
- 8) 中田恵子, 山崎謙治, 左近直美, 駒野淳, 加瀬哲男. 大阪府におけるエンテロウイルス感染症の流行状況と分子疫学的解析 (2013 年度). *大阪府立公衆衛生研究所研究報告 平成26 年*2014; 7-14.
- 9) 中田恵子, 山崎謙治, 左近直美, 駒野淳, 加瀬哲男. 大阪府におけるエンテロウイルスおよびヒトパレコウイルス感染症の流行状況と分子疫学的解析 (2014 年度). *大阪府立公衆衛生研究所研究報告 平成27 年*2015; 7-14.
- 10) 中田恵子, 左近直美, 弓指孝博, 加瀬哲男. 大阪府におけるエンテロウイルス感染症の流行状況と分子疫学的解析 (2015 年度). *大阪府立公衆衛生研究所研究報告 平成28 年*2016; 9-16.
- 11) 中田恵子, 弓指孝博, 久米田裕子. 大阪府におけるエンテロウイルスおよびヒトパレコウイルス感染症の流行状況と分子疫学的解析 (2016 年度). *大阪健康安全基盤研究所研究年報 (平成29 年度)*2017; 1-8.
- 12) 中田恵子, 弓指孝博. 大阪府におけるエンテロウイルス感染症の流行状況と分子疫学的解析 (2017 年度). *大阪健康安全基盤研究所研究年報 (平成30 年度)*2018; 1-8.
- 13) 中田恵子, 本村和嗣. 大阪府におけるエンテロウイルスおよびパレコウイルス A 感染症の流行状況と分子疫学的解析 (2018 年度) *大阪健康安全基盤研究所研究年報 (令和元年度)*2019; 9-16.
- 14) 中田恵子, 本村和嗣. 大阪府におけるエンテロウイルス感染症の流行状況と分子疫学的解析 (2019 年度). *大阪健康安全基盤研究所研究年報 (令和2 年度)*2020; 1-8.
- 15) 中田恵子, 山中靖貴, 本村和嗣. 大阪府におけるエンテロウイルス感染症の流行状況と分子疫学的解析 (2020 年度). *大阪健康安全基盤研究所研究年報 (令和3 年度)*2021; 11-17.
- 16) 中田恵子, 森治代. 大阪府におけるエンテロウイルス感染症の流行状況と分子疫学的解析 (2021 年度). *大阪健康安全基盤研究所研究年報 (令和4 年度)*2022; 20-26.
- 17) IDWR 2021 年第 43 号<注目すべき感染症> 手足口病・ヘルパンギーナ
<https://www.niid.go.jp/niid/ja/hfmd-m/hfmd-idwrc/10767-idwrc-2143h.html>
- 18)大阪府感染症情報センターホームページ 感染症発生動向調査 週報 定点把握疾患 手足口病
<http://www.iph.pref.osaka.jp/teiten/20210128110012.html>

WEB サイトの内容は 2023 年 6 月 15 日に確認した。

**Epidemic situation and molecular-epidemiological analysis of enterovirus infection in Osaka Prefecture
(Fiscal 2022 Report)**

Keiko NAKATA, Kazuho MAEDA and Haruyo MORI

From April 2022 to March 2023, two types of enteroviruses were detected in specimens obtained from patients with hand-foot-and-mouth disease and those with herpangina. Coxsackievirus (CV)-A6 and CV-A16 were isolated from seven and four patients with hand-foot-and-mouth disease, respectively; CV-A6 and CV-A16 were isolated from five and one patient with herpangina, respectively. Phylogenetic trees constructed using partial sequences of the viral protein 1 region showed that CV-A6 and CV-A16 isolates from the 2022 epidemic formed a single cluster and all isolates were classified as genotypes D and B, respectively. The 2022 epidemic strains of CV-A6 were closely related to the 2019 and 2021 Osaka strains and 2017, 2018, and 2019 Chinese strains. In addition, the 2022 epidemic strains of CV-A16 were closely related to the 2019 Osaka and 2017 Chinese strains. CV-A6 and CV-A16 isolates from the 2022 epidemic may have been imported before 2019 and then circulated domestically. Because changes in the dynamics of epidemic viruses can be elucidated via analyzing viral genomes, continuing pathogen surveillance is necessary.

Key words : Hand-foot-and-mouth disease, Herpangina, Aseptic meningitis, Enterovirus

大阪府における蚊媒介ウイルス感染症に対するサーベイランス調査 (2022 年度)

青山幾子, 池森 亮, 横田正春, 弓指孝博

大阪府では 2003 年度より蚊媒介ウイルス感染症の発生を監視する目的で、媒介蚊と死亡カラスに対するサーベイランス事業を実施している。

2022 年度は 6 月から 10 月にかけて 2 週に 1 度、府内 29 カ所で蚊の捕集を行った。捕集された雌の蚊 (8 種 4800 匹、424 プール) について蚊媒介ウイルス (ウエストナイルウイルス、デングウイルス、日本脳炎ウイルス、チクングニアウイルス、ジカウイルス) の検出を試みたところ、ウイルス遺伝子は検出されなかった。また、死亡カラス 3 羽についてウエストナイルウイルスの検出を試みたが、ウイルス遺伝子は検出されなかった。

キーワード：蚊媒介感染症、媒介蚊、サーベイランス

主な蚊媒介感染症には、ウイルス性疾患である日本脳炎、デング熱、チクングニア熱、ジカウイルス感染症、ウエストナイル熱および黄熱や、原虫感染症であるマラリアなどがある。現在、日本に常在する蚊媒介感染症は日本脳炎のみであるが、それ以外の感染症に対しても海外から持ち込まれることの警戒が必要になってきている。わが国では古くから土着マラリアが存在し、太平洋戦争以前は年間約 2 万人のマラリア患者が報告されていた¹⁾。1946 年には海外の戦地で感染した人達の帰国に伴い 3 万人に近い患者が見られたが、そののち収束し 1960 年頃には土着マラリアは消滅したと考えられている。また、デング熱も 1942～1945 年にかけて西日本を中心に 20 万人規模の患者が発生し、1944 年には大阪、神戸においても患者数 10 万人規模の発生が見られた²⁾。当時、11 月頃には流行が収束し、翌夏にはまた患者が発生するという、蚊の活動期に合った流行パターンが繰り返されていたが、終戦後デング熱の流行は減少し、やがて国内発生は見られなくなった。しかし、1999 年の感染症法施行後、デング熱の輸入症例は毎年増加傾向を示し、2014 年には東京を中心とした国内流行が発生している³⁾。この

ような過去の事例からも、国内にウイルスが侵入した場合、わが国には国内流行が起きる素地があると考えられる。

2019 年、デング熱やチクングニア熱が世界的に大流行し、日本での患者数もそれぞれ過去最高の 461 人と 49 人が報告された^{4,5)}。その後も海外での流行は続いていたが、新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) の流行に伴う渡航制限のため、輸入症例がほぼなくなり、国内における蚊媒介感染症の患者数は激減した。しかし、渡航制限の緩和後、蚊媒介感染症の輸入症例が再び報告されるようになり、2023 年 5 月の世界保健機関 (WHO) による COVID-19 に対する「国際的に懸念される公衆衛生上の緊急事態 (PHEIC)」の解除により、今後再び増加することが予想されている^{4,6)}。

大阪府では蚊媒介ウイルス感染症の浸淫状況を監視するため、2003 年度に蚊のサーベイランス調査を開始した^{7,9)}。2004 年にはウエストナイル熱対応指針が策定され、蚊のサーベイランス調査や、侵入後の対応を速やかに実施するための体制が整えられた¹⁰⁾。サーベイランス調査開始当初はウエストナイル熱、デング熱および日本脳炎を対象として

いたが、その後海外でのチクングニア熱、ジカウイルス感染症の流行に鑑み、これらの病原ウイルスも検出可能にするよう検査法を改定した¹¹⁾。また、カラスはウエストナイルウイルス (*Orthoflavivirus nilense*: WNV) への感受性が高く、WNV 感染による致死率が高いため、モニタリング調査に利用されている。大阪府においても厚生労働省の通知に従い¹²⁾、死因が不明であるカラスの死骸が同地点で2羽以上確認された場合、そのカラスについて WNV 検査を実施している。ここでは2022年度の大阪府内における媒介蚊と死亡カラスに対するサーベイランス調査結果について報告する。

調査方法

1. 蚊の捕集地点および調査実施期間

大阪府管内、東大阪市内、高槻市内、豊中市内、枚方市内、八尾市内、寝屋川市内および吹田市内に計29カ所の捕集地点を設定し(図1)、2022年6月

第5週から10月第2週までの期間、隔週に1回、計8回捕集調査を実施した。中核市の捕集地点における実施回数は各自治体での実施要領に従い、東大阪市内と高槻市は9月4週までの計7回、東大阪市内(中)地点は月に1回、豊中市(c、d、e)地点は毎回1地点ずつとし、順に設置地点を変更して実施した。

2. 蚊の捕集方法

蚊の捕集には CDC ミニライトトラップ (John. W.Hock Company) を使用し、蚊の誘引のためドライアイス (1~2kg) を併用した。トラップは調査実施日の夕刻16~17時から翌朝9~10時までの約17時間設置した。調査日(回収日)の気象状況は、気象庁大阪地点における天候、最高気温、最低気温を参照した¹³⁾。トラップを設置する高さは地上1.5~2mに設定した。また枚方市の4地点と東大阪市内(中)地点では調査日に8分間ヒト囹法にて蚊を捕集した。捕集終了時、いずれの方法でも捕集網から蚊が

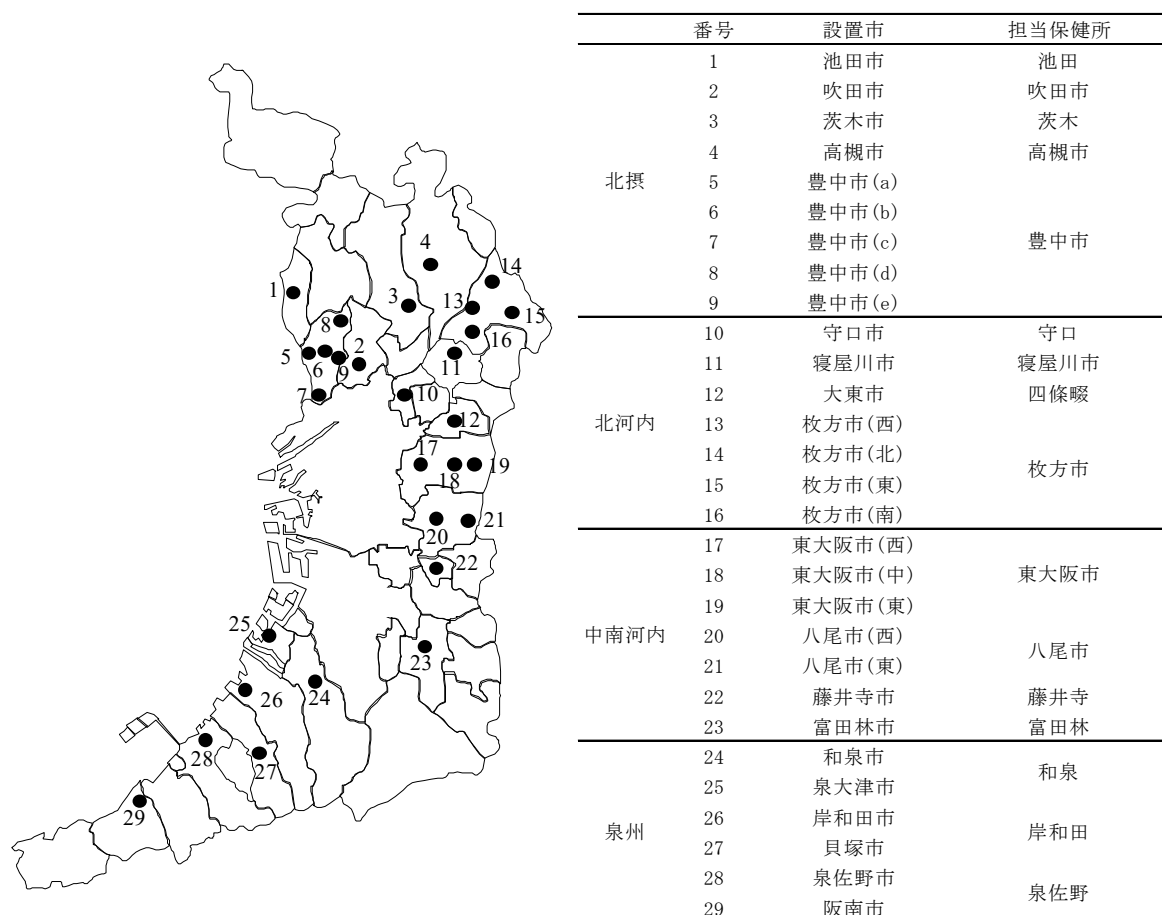


図1 蚊の捕集地点

逃げないように注意し、蚊を捕集網ごと凍結した後に、蚊を取り出して実体顕微鏡下で形態学的に雌雄の鑑別および種の同定を行った^{14,15)}。なお *Culex pipiens pallens* (アカイエカ) と *Culex pipiens molestus* (チカイエカ) については形態学的な同定が困難であるため、それらをまとめて *Culex pipiens complex* (アカイエカ群) とした。蚊は調査日、調査地点、蚊の種類ごとにプールし、ウイルスを媒介する雌の蚊のみウイルス検査に供した。1 地点 1 種類あたりの検体数が 50 匹を超えた場合は、50 匹ごとに複数のプールに分割した。その後、各検体は遺伝子検査実施まで -30°C で冷凍保存した。

3. 蚊からのウイルス検出

蚊からのウイルス検出は、蚊媒介ウイルスのうち、フラビウイルス科オルソフラビウイルス属の WNV、日本脳炎ウイルス (*Orthoflavivirus japonicum*:JEV)、デングウイルス (*Orthoflavivirus denguei*:DENV) およびジカウイルス (*Orthoflavivirus zikaense*:ZIKV)、並びにトガウイルス科アルファウイルス属のチクングニアウイルス (*Chikungunya virus*:CHIKV) を対象として実施した。WNV は多種類の蚊が媒介種となるため、捕集された全ての種類の雌蚊について遺伝子検査を実施し、DENV、CHIKV は媒介種となるヒトスジシマカについて実施した。

蚊の破碎は、2mL のマイクロチューブに検体と滅菌したステンレス製クラッシャーを入れ、0.2% ウシ血清アルブミン (BSA) 加ハanks液を 250 μ L 加えた後、ビーズ式破碎装置 (シェイクマスターオート、バイオメディカルサイエンス) で約 40 秒間振とうして行った。破碎後、マイクロチューブをスピンドウンしてからクラッシャーを除去し、0.2% BSA 加ハanks液を 1 プール 30 匹未満の場合は 500 μ L、30 匹~50 匹の場合は 750 μ L 追加して攪拌した。それを 4°C、13,000 \times g で 15 分間遠心し、その上清を 0.22 μ m または 0.45 μ m Millex フィルター (ミリポア) で濾過したものを蚊乳剤とした。このうち 140 μ L を QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) を使用して RNA 60 μ L を抽出した。

WNV、JEV、DENV、ZIKV の遺伝子検査は One step RT-PCR 法で実施した。RNA 抽出液 2.5 μ L に EmeraldAmp[®] PCR Master Mix (TaKaRa) 12.5 μ L、逆転写酵素 (Super Script IV、Thermo Fisher) 0.15 μ L、25 μ M Forward プライマー及び Reverse プライマー

各 0.2 μ L、リボヌクレアーゼ阻害剤 (40U/ μ L、TaKaRa) 0.1 μ L を加え、蒸留水を加えて最終液量 25 μ L に調製した。これをサーマルサイクラー (DICE Touch、TaKaRa) を用いて、53°C 10 分間の逆転写反応後、92°C 1 分、53°C 1 分、72°C 1 分の PCR 反応を 40 回繰り返した。反応産物 10 μ L を 1.5% アガロース、1 \times TAE 液で電気泳動し、エチジウムブロマイド染色により増幅バンドを確認した。

RT-PCR のプライマーには、フラビウイルス共通プライマー (FU1/cFD2)¹⁶⁾ を用いた。WNV 並びに DENV は FU1/cFD2 で検出可能であるが、さらに検出感度の良い WNV 特異的検出プライマー (WNNY 514/904)¹⁷⁾、及び DENV 特異的検出プライマー (Dus/Duc)¹⁸⁾ も併用した。

CHIKV の遺伝子検査はリアルタイム RT-PCR 法で実施した¹⁹⁾。反応には QuantiTect Probe RT-PCR Kit (QIAGEN) を用い、RNA 抽出液 5 μ L にキット付属の 2x QuantiTect Probe RT-PCR Master Mix 12.5 μ L、QuantiTect RT Mix 0.25 μ L と、100 μ M Forward プライマー (Taq-Chik607F) 及び Reverse プライマー (Taq-Chik638P) 各 0.25 μ L、10 μ M probe (Taq-Chik672R) 0.5 μ L、リボヌクレアーゼ阻害剤 (40U/ μ L、TaKaRa) 0.05 μ L を加え、蒸留水にて最終液量 25 μ L に調製した。これをリアルタイム PCR 装置 (StepOnePlus、Thermo Fisher Scientific) にて、48°C 30 分間の逆転写反応、92°C 10 分反応の後、95°C 15 秒、57°C 1 分の反応を 45 回繰り返し、Threshold 0.5、Ct 値 38 未満で増幅が見られた場合に陽性とした。

4. カラスからのウイルス検出

死因が不明なカラスの死骸が同地点で 2 羽以上確認され、死骸の回収時に腐乱やウジの発生がなく新鮮な状態であった場合、WNV 検査を実施した。死亡カラスは、解剖して採脳した後、0.2% BSA 加ハanks液を用いてカラスごとに 10% 脳乳剤を調製し、蚊と同様に RNA 抽出並びに RT-PCR 法を実施し、WNV 遺伝子の検出を試みた。

結果

1. 蚊の捕集結果について

本年度捕集された雌の蚊は 8 種 4,800 匹であった。もっとも多く捕集された蚊は *Aedes (Stegomyia albopictus)* (ヒトスジシマカ) 3,377 匹 (70.35%)、次

にアカイエカ群 1,321 (27.52%) で、この 2 種で捕集蚊全体の 97.9%を占めた (図 2)。次いで *Culex tritaeniorhynchus* (コガタアカイエカ) 75 匹、*Anopheles sinensis* (シナハマダラカ) 9 匹、*Tripteroides bambusa* (キンバラナガハシカ) 8 匹、*Culex bitaeniorhynchus* (カラツイエカ) 4 匹、*Armigeres subalbatus* (オオクロヤブカ) 3 匹、*Culex sasai* (ヤマトクシヒゲカ) 3 匹が捕集された。

調査期間を通じた捕集数の推移をみると (図 3)、ヒトスジシマカは常に捕集され、捕集数は 8 月下旬にピークを示した。アカイエカ群も常に捕集され 7 月にピークを示した。コガタアカイエカは 6 月から 9 月に捕集され、捕集数は少ないが、7 月に小さなピークを示した。

また、捕集数や捕集される種類には地点によって大きな差がみられた (図 4、5)。すなわち、29 調査地点のうち、ヒトスジシマカは全地点、アカイエカ群は 26 地点で捕集された。コガタアカイエカは全体としての捕集数は少ないものの 15 地点 (池田市、大東市、豊中市 a、b、c、d、e、東大阪市東、八尾市西・東、富田林市、和泉市、岸和田市、貝塚市、阪南市) で捕集された。しかし、シナハマダラカは 4 地点 (富田林市、和泉市、岸和田市、阪南市)、キンバラナガハシカは 1 地点 (和泉市)、カラツイエカは 4 地点 (豊中市 b、東大阪市東、八尾市東、和泉市)、オオクロヤブカは 2 地点 (枚方市東、和泉市) と捕集地点が限られていた。吹田市、豊中市 (a)、寝屋川市、東大阪市 (西・東)、和泉市、泉大津市

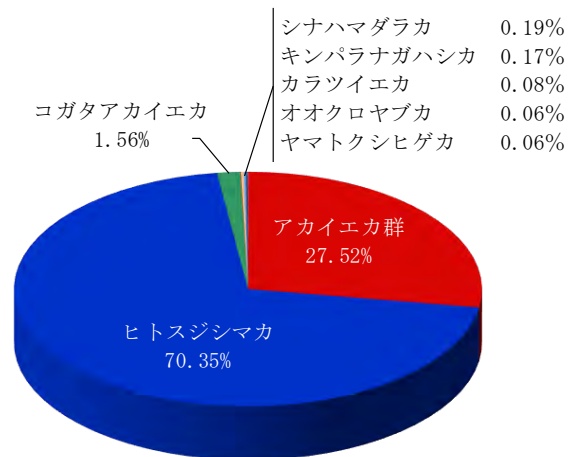


図2 捕集された蚊の比率 (29地点)

ではヒトスジシマカが多く捕集され、8 月に大きなピークが見られた。またこのうち豊中市 a と和泉市、泉大津市などでは調査終了期の 10 月にもヒトスジシマカが多数捕集され、これらの地点での増減が全体のヒトスジシマカの捕集数にも影響したと考えられた。また、多くの地点でヒトスジシマカが優占したが、阪南市ではアカイエカ群が最も多く捕集され、この傾向は昨年度と同様であった。

2. 蚊のウイルス遺伝子検査結果

各地点で捕集された蚊を種類別に分け 424 プールの乳剤を作製して RT-PCR 法による遺伝子検査を実施したところ、すべての検体において WNV、JEV、DENV、ZIKV 遺伝子は検出されなかった。ま

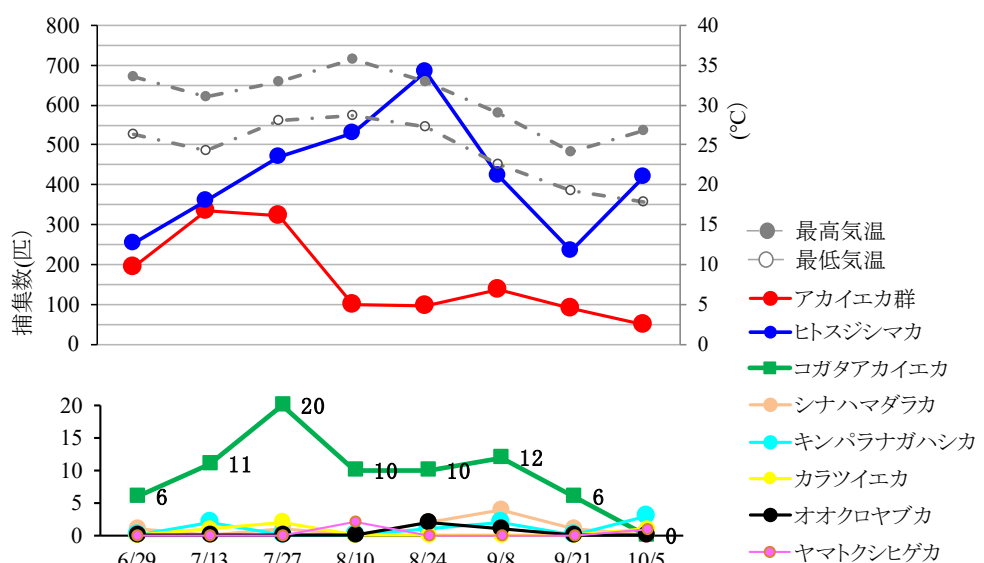


図3 蚊の捕集数の推移

たとえられる。また今回 10 月にヒトスジシマカの捕集数が顕著に増加した地点が多数見られ、捕集数の推移も 9 月初めと同程度まで増加した状態で調査期間が終了となった。過去の調査では、10 月にヒトスジシマカの捕集数が微増する地点は多少あったが、全体として 10 月の捕集数は 9 月に比較して顕著に減少しており、今回のような推移が見られたのは初めてであった。2022 年は世界各地で記録的な高温や大雨などの極端な気象現象が見られた年で、日本でも 6 月下旬から 7 月初めに記録的な高温がみられ、その後の 9 月から 12 月にかけても海面水温が例年より高かったことなど 10 月以降まで夏の高温の影響が長引いていた²⁰⁾。そのため、10 月に捕集数が増加した理由については、夏から秋の台風などの降雨により発生源が確保されたことと、9 月末から 10 月にかけて気温が上昇し、再び蚊の発育条件が揃ったことなどが考えられた。地球温暖化に伴って全球的な気温の上昇傾向が続いているが、今後秋になってもこのような環境条件が続くと、蚊媒介感染症に対しても長期間警戒する必要性が生じる可能性があると考えられる。

また、個々の調査地点のうち、アカイエカ群が捕集されなかった枚方市（北・南）、東大阪市（中）ではいずれも人囀法にて蚊の捕集を実施した。人囀法を用いた地点の捕集蚊は 98～100%がヒトスジシマカであった。デング熱、チクングニア熱、ジカウイルス感染症は、国内ではヒトスジシマカが媒介蚊となるものと考えられる。一方、ウエストナイル熱はヒトスジシマカ以外にも、アカイエカ群など *Culex* 属の蚊が主な媒介種となる¹⁴⁾。そのため、ウエストナイル熱の侵入を想定した対策を考える場合、人囀法のみではなく、ライトトラップなどを併用した蚊の捕集調査の実施が必要であると考えられる。

大阪府では、2025 年に大阪・関西万博の開催が予定されており、海外からの渡航者の増加に伴う蚊媒介感染症のアウトブレイクが危惧される。本サーベイランスにおいて平常時における府内の蚊の生息状況を把握しておくことにより、感染症発生時における蚊の防除対策の際に重要な資料を提供することが可能となる。また、本サーベイランスにおいて定期的に蚊の同定検査が実施されるため、我々のような研究員だけでなく、環境衛生監視員の蚊の同定技術の維持にも寄与しており、各保健所に蚊の同定ができる担当者を配置していることは大阪府の

防疫対策にとって、非常に有効な要素となっている。

今年に入り、海外からの旅行者の数が増加し始めたため²¹⁾、蚊媒介感染症が国内に侵入する危険性は高まってきたと考えられる。デング熱やチクングニア熱、ジカウイルス感染症を媒介するヒトスジシマカは、大阪府内の都市環境でも多くの地点で多数捕集された。この蚊はヒトとの接触・吸血頻度が高い種類であるため、大阪府内にこれらの感染症が浸淫した場合に病原体を媒介する可能性が高く、府内のどの地域でもアウトブレイクが起こる可能性がある。今後アウトブレイクが発生した場合、迅速に対応するためには、本調査で実施しているような地方衛生研究所（大阪健康安全基盤研究所）、保健所および行政間の連携が必要不可欠であることから、本サーベイランス事業は危機管理対策の一環としても重要と考えられる。

謝 辞

本調査は、大阪健康安全基盤研究所、大阪府健康医療部環境衛生課および各保健所の協力のもとに大阪府健康医療部保健医療室医療対策課の事業として実施されたものであり、調査に関係した多くの方々に深謝致します。また、データの提供にご協力頂いた東大阪市保健所、高槻市保健所、豊中市保健所、枚方市保健所、八尾市保健所、寝屋川市保健所、吹田市保健所の関係者の方々に深くお礼申し上げます。

利 益 相 反

開示すべき利益相反はない。

文 献

- 1) 国立感染症研究所. 日本におけるマラリア IASR 1997; **18** (11)
<http://idsc.nih.gov/iasr/18/213/tpc213-j.html>
- 2) 高崎智彦. デング熱研究の歴史とデング熱流行 2014. *J. Vet. Epidemiol.* 2015; **19** (1) :1-3.
- 3) 東京都福祉保健局. 東京都蚊媒介感染症対策会議報告書 2014
<https://www.mhlw.go.jp/file/05-Shingikai-10601000-Daijinkanboukouseikagakuka-Kouseikagakuka/0000071097.pdf>

- 4) 国立感染症研究所. 感染症発生動向調査週報.
<https://www.niid.go.jp/niid/ja/idwr.html>
- 5) Geographical distribution of chikungunya virus disease cases reported worldwide, 2019, European Centre for Disease Prevention and Control.
<https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/geographical-distribution-chikungunya-virus-disease-cases-reported-worldwide-2019>
- 6) 外務省. 新型コロナウイルスにかかる感染症危険情報の解除
https://www.mofa.go.jp/mofaj/press/release/press6_001492.html
- 7) 弓指孝博, 瀧幾子, 齋藤浩一, 伊藤房子, 石田誠良, 倉持隆, 大竹徹, 奥野良信. 大阪府におけるウエストナイル熱に関する蚊のサーベイランス調査 (平成 16 年度報告). *大阪府立公衆衛生研究所所報* 2004; **42**: 57-63.
- 8) 瀧幾子, 弓指孝博, 吉田永祥, 田中智之, 大竹徹, 奥野良信. 大阪府の住宅地域における蚊の分布調査. *大阪府立公衆衛生研究所所報* 2004; **42**: 65-70.
- 9) 青山幾子, 山元誠司, 山口敬治, 石川温子, 弓指孝博. 大阪府における蚊媒介性ウイルス感染症に対するサーベイランス調査 (2016 年度). *大阪健康安全基盤研究所研究年報* 2017; **1**: 29-35.
- 10) 大阪府健康福祉部. ウエストナイル熱対応指針 2004.
- 11) 青山幾子, 弓指孝博, 中田恵子, 佐藤功, 佐藤良江, 倉持隆, 上澤行成, 加瀬哲男, 高橋和郎. 大阪府におけるウエストナイルウイルスに対するサーベイランス調査 (2008 年度). *大阪府立公衆衛生研究所所報* 2009; **47**: 1-7.
- 12) 厚生労働省健康局結核感染症課長通知 (2003 年 12 月 13 日). ウエストナイル熱の流行予測のための死亡カラス情報の収集等について.
https://www.mhlw.go.jp/web/t_doc?dataId=00tb8583&dataType=1&pageNo=1
- 13) 気象庁.過去のデータ検索
<https://www.data.jma.go.jp/obd/stats/etrn/index.php>
- 14) 弓指孝博, 青山幾子. ウエストナイル熱 (脳炎). 大阪府立公衆衛生研究所感染症プロジェクト委員会編 感染症検査マニュアル第Ⅲ集 2004; 1-13.
- 15) ウエストナイル熱媒介蚊対策研究会. ウエストナイル熱媒介蚊対策ガイドライン. 日本環境衛生センター. 2003.
- 16) Kuno G, Chang GJ, Tsuchiya KR, Karabatsos N, Cropp CB. Phylogeny of the Genus *Flavivirus*. *J Virol* 1998; **72**(1): 73-83
- 17) 国立感染症研究所. ウエストナイルウイルス病原体検査マニュアル Ver.4.
https://www.niid.go.jp/niid/images/vir1/div2/WNV_Lbotest.pdf
- 18) 国立感染症研究所. デングウイルス感染症診断マニュアル.
<https://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/Dengue2014.pdf>
- 19) 国立感染症研究所. チクングニアウイルス検査マニュアル Ver1.1.
<https://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/CHIKV.v1.1.pdf>
- 20) 気象庁. 気候変動監視レポート 2022
https://www.data.jma.go.jp/cpdinfo/monitor/2022/pdf/ccmr2022_all.pdf
- 21) 総務省統計局. 出入国管理統計
<https://www.e-stat.go.jp/stat-search?page=1&query=%E5%87%BA%E5%85%A5%E5%9B%BD%E7%AE%A1%E7%90%86>

WEB サイトの内容は 2023 年 6 月 18 日に確認した。

Mosquito-borne virus surveillance in Osaka Prefecture (Fiscal 2022 Report)

Ikuko AOYAMA, Ryo IKEMORI, Masaharu YOKOTA and Takahiro YUMISASHI

In Osaka Prefecture, mosquito-borne arbovirus surveillance has been conducted since 2003 to monitor the invasion of imported infectious diseases caused by arboviruses, such as West Nile virus (WNV), dengue virus (DENV), and domestic Japanese encephalitis virus (JEV). Monitoring of chikungunya virus (CHIKV) and zika virus (ZIKV) has been included in mosquito-based surveillance since 2008 and 2015, respectively.

In 2022, we performed RT-PCR examinations for arboviruses in 424 mosquito pools from 4,800 female mosquitoes (eight species) collected at 29 points in Osaka Prefecture from June to October, and for WNV on three dead wild crows. No positive cases were detected in the mosquito's pools for WNV, DENV, JEV, CHIKV, and ZIKV, and in the crows for WNV.

Key words : mosquito-borne infection, vector mosquitoes, surveillance.

大阪府の食中毒疑い事例で検出されたノロウイルスの遺伝子解析 (2022 年度)

白井達哉, 牛飼裕美, 山崎笑子, 左近直美

2022 年度、当課で検査したノロウイルス陽性の食中毒疑い事例 23 事例について、ORF1 の RdRp コード領域と ORF2 の VP1 コード領域の部分遺伝子解析 (Dual typing) を行い、遺伝子型を決定した。2022 年度には 5 種類が検出され、GII.2[P16] (9 事例、39.1%) が最も多く、次いで GII.4[P16] (6 事例、26.1%) であった。Dual typing により全事例を解析している 2019 年度以降で、GII.4[P16] の検出事例数は本年度が最も多かった。そこで、検出数の多い GII.2[P16] 及び GII.4[P16] における RdRp GII.P16 に注目し、RdRp コード領域 (1530 塩基) の全長を解析した。2016 年以降の GII.P16 は特徴的な 5 アミノ酸置換があるとされるが、当所検出株ではいずれもこの置換が保存されており、系統樹解析においても 2016 年以降の流行株と同じクラスターに分類された。一方で RdRp は複数のアミノ酸置換が存在し、その特徴は GII.2[P16] と GII.4[P16] で異なっていた。今後、これらの変異と流行との関連について調査するとともに、RdRp 領域における変異率について検討が必要である。Dual typing による遺伝子型調査の必要性が改めて確認でき、点変異によるウイルスの変化を見逃さないためのゲノム全体の遺伝子解析の重要性が示唆された。

キーワード：ノロウイルス、食中毒、RdRp、GII.P16

ノロウイルスは冬季を中心に流行し嘔吐や下痢などを引き起こす、すべての年齢層における感染性胃腸炎の起因ウイルスである¹⁾。例年世界中の 5 歳以下の小児の約 7 万人が死亡し、社会経済的損失は 6 兆円に達すると推計される²⁾。日本国内で食中毒の原因として患者数が最も多い病原体の一つであり³⁾、流行状況の把握は食品衛生管理において重要である。

ノロウイルスはカリシウイルス科に分類され、エンベロープはなく、約 7.5kb のプラス一本鎖 RNA ゲノムを持つ。ゲノムは 3 つの Open-Reading-Frame (ORF) で構成されており、ORF1 は RNA-dependent-RNA-polymerase (RdRp) などの非構造タンパク、ORF2 及び ORF3 はそれぞれ構造タンパク Viral protein (VP) 1 及び VP2 をコードする。ノロウイルスは VP1 のアミノ酸配列により大きく 10 種 (GI-GX) の遺伝子群 (Genogroup) に分類され (VP1 typing)、さらに 48 以上の Genotype に分類される⁴⁾。人に感染する主な Genogroup は大阪健康安全基盤研究所微生物部ウイルス課

Genogroup I (GI) と Genogroup II (GII) である。また、ORF1 の 3' 端に位置する RdRp のアミノ酸配列に基づき、P-group に分けられ (RdRp typing)、60 以上の P-type に分類される。ORF1 と ORF2 の間では遺伝子組換えが起こることが知られており、これが大きな流行につながる要因と考えられているため^{5,6)}、Genotype と P-type 両方の解析 (Dual typing) による遺伝子型別が推奨されており⁴⁾、例えば Genotype だけの解析であれば「GII.2」、P-type だけの解析であれば「GII.P16」と表現するが、両方を解析した場合は GII.2[P16] と表現する。

GII.2[P16] は 2009 年に日本で出現し⁷⁾、2016 年に日本を含むアジア諸国で大規模な流行を起こして以降^{8,9)}、GII.4 と共に検出数で上位を占める主要な遺伝子型となった¹⁰⁾。この流行株の VP1 領域については、2016 年前後に流行した GII.2 と比較して特徴的なアミノ酸置換がなく、免疫逃避や組織血液型抗原に対する親和性の変化 (宿主感受性) は流行に関与していないことが示唆されているが^{11,12)}、

RdRp領域には、2016年以降に検出されたGII.2[P16]に特徴的な5つのアミノ酸置換（D173E、S293T、V332I、K357Q、T360A）が存在しており、流行との関連が示唆されている^{11,13}。当所でも2021年度の食中毒疑い及び有症苦情事例について、GII.2[P16]のRdRpコード領域の塩基配列解析を行い、5つのアミノ酸置換を確認した¹⁴。一方GII.4は、日本では2012年から2022年までGII.P31が主流であったが^{14, 15, 16}、世界では2017年以降、GII.P16が北米やオセアニアなどで主要な流行株となっている^{17, 18}。

本研究では2022年度の食中毒疑い事例において検出されたノロウイルスのDual typingによる遺伝子型別結果、及びGII.2[P16]に加えGII.4[P16]のRdRpに注目し、その塩基配列解析結果を報告する。

実験方法

1. 検査材料

2022年度に当課で検査した食中毒疑い事例（他府県依頼分を含む）41事例のうちノロウイルス遺伝子が検出された23事例を対象とした。検体は全てふん便で、PBSにより10%ふん便懸濁液を作製後、その遠心上清を試料とし、magLEAD 12gC（プレジジョン・サイエンス・システム社、試薬：MagDEA Dx SV）により試料200 μ Lから核酸抽出液50 μ Lを得た。遺伝子の検出は、国立感染症研究所の病原体検出マニュアル¹⁹に準拠したリアルタイムPCRにより実施した。また、2019～2021年度にかけて発生した事例について当所で検査し、ノロウイルスが検出された計34事例の遺伝子型を比較対象として使用した¹⁴。

2. ノロウイルスの遺伝子解析

各ノロウイルス陽性事例から数検体を選択し、遺伝子解析を行った。RdRpコード領域及びVP1コード領域に対し、ノロウイルスGIはMon432/G1-SKR、GIIはMon431/G2-SKRのプライマーを用いてDual typing領域を増幅した¹⁹（図1）。目的とするPCR増幅産物は電気泳動で確認した後、ゲルを切り出して遠心しその上清を精製水で希釈して用いた。BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing KitもしくはBigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit（Applied Biosystems）を用いたダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定し、Norovirus Typing

Tool Version 2（<http://www.rivm.nl/mpf/typingtool/norovirus/>）もしくはHUMAN CALICIVIRUS TYPING TOOL（<https://calicivirustypingtool.cdc.gov/>）により遺伝子型を決定した。

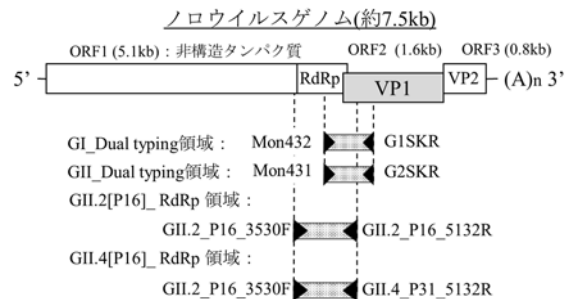


図1 ノロウイルスゲノム構造及び解析領域と増幅に使用したプライマー

3. ノロウイルスGII.2[P16]及びGII.4[P16]のRdRpコード領域の解析

2022年度にノロウイルスGII.2[P16]もしくはGII.4[P16]が検出された検体の一部について、RdRpコード領域はそれぞれGII.2_P16_3530F/GII.2_P16_5132Rのプライマーセット（GII.2_P16_3530F: ATCTGTGCCACACAGGGAAG、GII.2_P16_5132R: GGCTGCACCATCAGTAGATG）、GII.2_P16_3530F/GII.4_P31_5132Rのプライマーセット（GII.4_P31_5132R: GGCTGCAGA19ATCAGATG）を用いてRT-PCRを行い、前述と同様にダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定した（図1）。RdRpコード領域は全長1530塩基を解析対象とした（終止コドンを除く）。解析には事例ごとに代表株1株以上を用いて配列を決定し、検出年度の下2桁を株名の前に付けた。MEGA Xを用い、最尤法（Maximum-Likelihood法）により系統樹解析を実施した²⁰。比較対象とした配列はNCBIのデータベースに登録されている塩基配列にRdRpとVP1のコード領域がすべて含まれているものを抽出し、各塩基配列が完全に一致している場合はそのうちの一つを代表とする計65株を用いた。内訳は、日本で検出されたGII.2[P16]21株（ACN: LC122834、LC122835、LC122836、LC122838、LC122839、LC122840、LC209441、LC209442、LC209443、LC209446、LC209450、LC209451、LC209454、LC209458、LC209467、LC209476、LC213890、LC646333、LC726080、LC726086、LC726087）、海外で検出されたGII.2[P16]13株（Accession Number

(ACN) : KY421121、KY865306、MG745986、MG745987、MG745988、MG745990、MK752949、MK753035、MK762625、MN493873、MW305649、OK012404、OL826943)、日本で検出された GII.4[P16] 1 株 (ACN: LC175468)、海外で検出された GII.4[P16] 28 株 (ACN: KX907727、KY887602、KY887605、KY947549、MG002630、MG892929、MK073885、MK073890、MK073894、MK483909、MK629457、MK754446、MK756035、MK762624、MK762724、MK762746、MK775032、MN525276、MN782359、MT029316、MT238667、MW305548、MW305560、MW305632、MW305634、MW305637、MW661261、OL336385)、P-type 分類に使用されている GII.P16 参照配列 (ACN: AY772730)⁴⁾、外群として使用した GII.2[P30] (ACN: AY134748) であった。2016 年以降に日本で検出された GII.2[P16] の 5 株 (ACN: LC213890、LC646333、LC726080、LC726086、LC726087) と GII.4 の 1 株 (ACN: LC175468) をアミノ酸置換の比較に用いた。

本研究は、地方独立行政法人大阪健康安全基盤研究所倫理審査委員会の承認を得て (承認番号 0710-03-6)、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」を遵守して実施したものである。

結果

1. ノロウイルスの検出状況

解析した 23 事例から検出されたノロウイルスの遺伝子型別月別の状況を表 1 に示す。2022 年度に

確認された遺伝子型は 5 種類あり、GII.2[P16] が 9 事例 (39.1%)、GII.4[P16] が 6 事例 (26.1%)、GII.4[P31] が 4 事例 (17.4%)、GII.17[P17] が 3 事例 (13.0%) で検出され、1 事例 (4.3%) では GI.3[P3] 及び GII (コピー数が少なく、型別不可) が 1 検体から重複して検出された。

2023 年 1 月から 3 月にかけて毎月 4 事例以上が発生し、この 3 か月で 2022 年度の陽性事例の 73.9% を占めた。内訳をみると GII.2[P16] は 2022 年 5 月、6 月、10 月、2023 年 1 月、2 月、3 月に検出されたのに対し、2 番目に多く検出された GII.4[P16] は 2023 年 1 月から 3 月にかけてのみ検出された。

2. ノロウイルス Dual typing の結果 (2019~2022 年度)

2019~2022 年度別のノロウイルス陽性事例数と、検出ウイルスの Dual typing の結果について表 2 に示した¹⁴⁾。対象期間の陽性事例総数は 57 事例で、最も多く検出された遺伝子型は GII.2[P16] で 21 事例 (36.8%)、次いで GII.4[P31] が 14 事例 (24.6%)、GII.4[P16] が 7 事例 (12.3%) であった。Genotype としては GI.2、GI.3、GI.4、GI.7、GII.2、GII.3、GII.4、GII.6、GII.17 の 9 種類、P-type としては GI.P3、GI.P4、GII.P7、GII.P16、GII.P17、GII.P25、GII.P31 の 7 種類が検出された。GII.4[P16] は 2019~2021 年度では 1 事例のみの検出であったが、2022 年度には 6 事例に増加した。対象期間で最も主要な遺伝子型である GII.2[P16] は 2020 年度、2021 年度に引き続き 3 年連続で最も多い遺伝子型となり、GII.4[P16] が次いで多かったため、2022 年度に GII.P16 を持つノロウ

表 1 月別ノロウイルス遺伝子型検出状況 (2022 年度)

	遺伝子型					月別合計
	GI.2[P16]	GI.4[P16]	GI.4[P31]	GI.17[P17]	GI.3[P3] +GII(ND※)	
2022年						
4月						
5月	1		1	1		3
6月	2					2
7月						
8月						
9月						
10月	1					1
11月						
12月						
2023年						
1月	1	2			1	4
2月	2	3	3	1		9
3月	2	1		1		4
遺伝子型別合計	9	6	4	3	1	23

各事例の最も早い検査依頼日で区分した。

※Not Defined: コピー数が少なく、P-type 及び Genotype 不明

表2 ノロウイルス陽性事例数と検出された遺伝子型 (2019~2022 年度)¹⁴⁾

Genotype	GI.2	GI.3	GI.4	GI.7	GII.2	GII.3	GII.4		GII.6	GII.17		GII.ND	合計
	ND	P3	P4	ND	P16	P25	P16	P31	P7	P17	ND		
2019年度	1		2	1	5		1	7	1	2		1	21
2020年度					2						1		3
2021年度					5	1		3		1			10
2022年度		1※			9		6	4		3		1※	23※
合計	1	1	2	1	21	1	7	14	1	6	1	2	57※

■ : 年度で最も多い ■ : 年度で2番目に多い □ : 年度で3番目に多い

ND: Not Defined

※1症例は、GI.3[P3]とGII.NDの重複感染

イルスが検出された事例の割合は 65.2% (23 事例中 15 事例) となった。発生事例数が 2022 年度と同等程度の 21 事例であった 2019 年度の 28.5%(21 事例中 6 事例) と比較して、大きい割合を占めた。

3. ノロウイルス GII.P16 の RdRp 塩基配列及びアミノ酸配列の一致率

2022 年度に GII.P16 が検出された 15 事例 (GII.2 が 9 事例、GII.4 が 6 事例) のうち、RdRp コード領域 (1530 塩基) の遺伝子配列を確定できた 14 事例 14 株について解析した。以降、本文中で P-type を明記しない場合は、GII.P16 RdRp を持つものとする。GII.2 は 8 事例 8 株 (22-025、22-063、22-094、22-133、22-150、22-167、22-202、22-233)、GII.4 は 6 事例 6 株 (22-161、22-164、22-169、22-187、22-195、22-221) を用いた。これらの RdRp 塩基配列 (1530 塩基) 及びアミノ酸配列 (510 アミノ酸残基) の一致率を表 3 に示した。

GII.2 同士の間での一致率は塩基配列で 97.9~99.9%、アミノ酸配列で 98.6~100% となった。GII.4 同士の間での一致率は塩基配列で 96.1~99.5%、アミノ酸配列で 98.8~100% となった。GII.2 と GII.4 との間での一致率は塩基配列で 94.8~95.8%、アミノ酸配列で 97.8~99.0% となり、塩基配列では総じて GII.2 もしくは GII.4 同士と比較して低い傾向にあったが、アミノ酸配列では GII.2 の 22-025、22-094 のように GII.4 との間でも、各遺伝子型内と同程度の高い一致率を持つ株も認められた。

4. ノロウイルス GII.P16 の RdRp 系統樹解析

系統樹解析結果を図 2 に示す。2016 年以降に世界に拡大した GII.2 は 1 つのクラスター (GII.2[P16] 2016-Lineage) を形成し、当課で検出された GII.2 の

8 株は、全てこのクラスターに属し、特に 2020 年から 2022 年にかけて日本で検出された株と近縁であると考えられた。GII.4 も 2016 年以降に世界に拡大したクラスター (GII.4[P16] 2016-Lineage) を形成した。当所検出の GII.4 の 6 株のうち、22-161、164、187、195、221 は非常に近縁であり、22-169 を含めてこちらも GII.4[P16] 2016-Lineage に属していた。

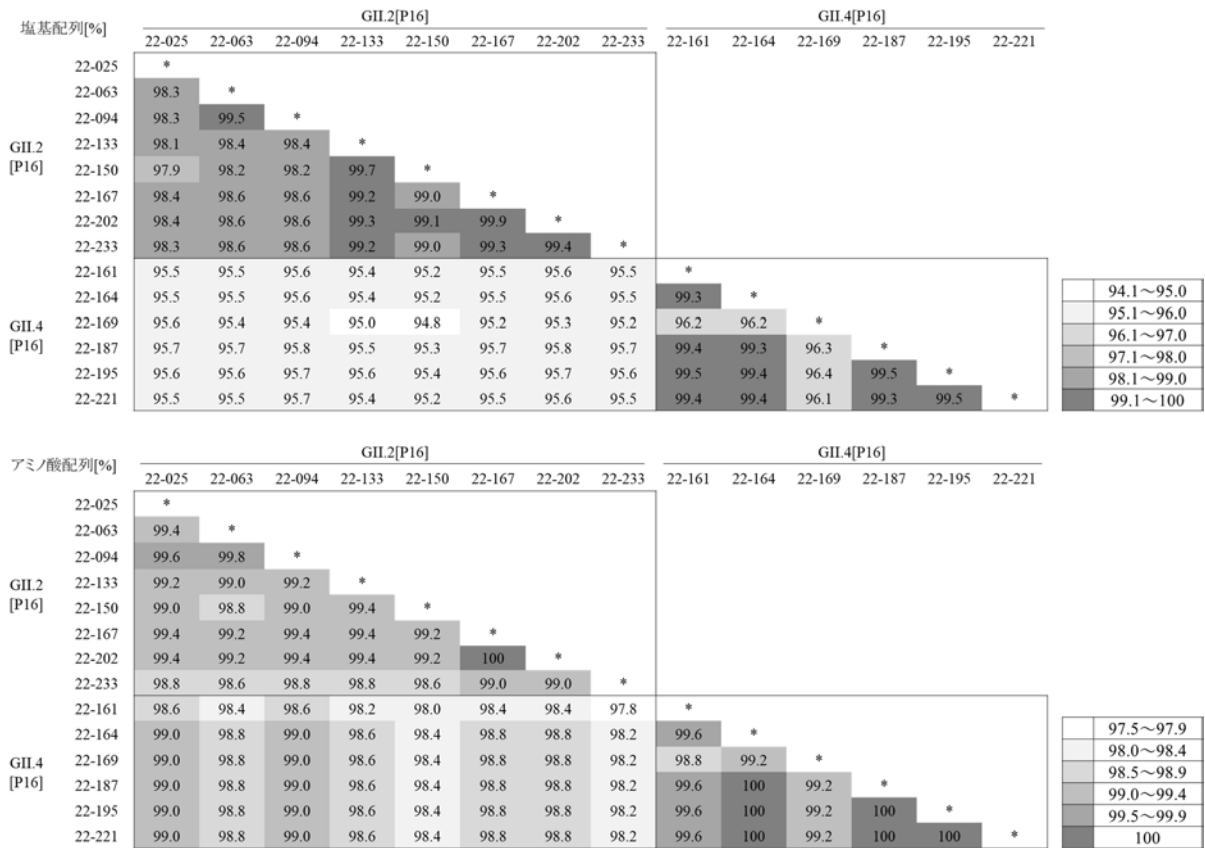
5. ノロウイルス GII.P16 のアミノ酸配列の置換部位

2022 年度に当課で検出された GII.P16 の 14 株の RdRp アミノ酸配列について、参照配列 (図 2 に▲で示す) と比較して置換が認められた部位をまとめた (表 4)。参照配列には、GII.2、GII.4 でそれぞれ同じクラスターに分類されたものの中から日本国内で検出された株を用い、2016 年に検出された株を比較の基準とした。

GII.2 の 8 株について、LC213890 と比較した場合の置換は 2~6 か所となり、最も多かった 22-233 では、本株だけが持つ置換が 4 か所 (D4V、V53I、V125A、S409N) 存在した。解析した 8 株間の比較では 510 個のアミノ酸に対して 13 か所 (2.5%; 第 4、53、85、111、121、123、125、130、257、274、351、405、409 番目) で差異が認められた (表 4)。

GII.4 の 6 株について、LC175468 と比較した場合の置換は 5~8 か所となった。解析した 6 株間の比較では 510 個のアミノ酸に対して 6 か所 (1.2%; 第 132、208、382、386、479、502 番目) で差異が認められた (表 4)。K54R 及び K457R の置換は GII.2 には認められなかったが、GII.4 では今年度検出された全ての株で認められた。22-169 は塩基配列一致率や系統樹解析では他の株と差異が見られたものの、アミノ酸配列解析では差異が少なく、塩基配列で

表3 2022年度に検出されたノロウイルスの RdRp 塩基配列及びアミノ酸配列の一致率



22-169 のみが他の 5 株と差異があった 54 箇所中 50 箇所 (1530 塩基) が同義置換であった。

GII.4、GII.2 いずれも 2016 年度以降の GII.2[P16] の特徴とされる D173E、S293T、V332I、K357Q、T360A の 5 つのアミノ酸置換は保存されていた。

考 察

2022 年度の食中毒疑い事例から検出されたノロウイルスの遺伝子型を解析した。検査した 41 事例中 23 事例からノロウイルスが検出された (表 2)。過去 10 年で、本年度は 2020 年度、2021 年度、2019 年度に次ぐ低い水準であった^{14, 16)}。2022 年度の 10 月以降は大阪府市を合わせた集計となっているため、前年度との単純な比較は難しいが事例数としては増加している。2022 年度以降は新型コロナウイルスに対する社会的な行動制限等の対策が緩和されているため、来年度以降のノロウイルスの流行に注意する必要がある。

2022 年度は、GII.2[P16] が 9 事例で検出され、2020

年度、2021 年度に引き続き検出事例数が最も多い遺伝子型となったが、一方で、過去 3 年間で 1 事例であった GII.4[P16] が 6 事例と急増した (表 2)。GII.4[P16] 検出時期が全て 1~3 月であったことも GII.2[P16] との違いとして見受けられた (表 1)。本研究では、これら 2 つの遺伝子型が共通して持つ GII.P16 の RdRp 全長の塩基配列及びアミノ酸配列について詳細な解析を行った。世界で報告された配列を用いた系統樹解析では 2016 年以降の流行に関わる GII.2 と GII.4 は明確に異なるクラスター (GII.2[P16] 2016-Lineage もしくは GII.4[P16] 2016-Lineage) に分かれており、相互の組換えは起こっていないことが示唆された。当所検出の GII.2、GII.4 もそれぞれのクラスターに属し、GII.2 は 2020 年以降日本で検出されている株と近縁であった。

2022 年度の GII.2 と GII.4 の RdRp アミノ酸配列の置換部位を確認した。GII.4 は 6 株中 4 株のアミノ酸配列が完全に一致しているなど株間の差異が少なかったのに対し、GII.2 は株間で差異のある部位が多かった。この点は塩基配列一致率でも同様の



図2 ノロウイルス GII.P16 の RdRp 塩基配列による分子系統樹 (最尤法、1530 塩基)
 ●は当課で検出された株を、▲は表4で使用した参照配列を示す。外群として、GII.2[P30]の配列を使用した。
 配列名の表記は、「Genotype(スペース)P-type(スペース)ACN/株名/検出年/検出国」とした。

表4 GII.P16 RdRpアミノ酸配列の置換部位.(510アミノ酸)

Type	Strain	Amino acid number (RdRp region)																																																		
		4	53	54	71	85	107	111	121	123	125	130	132	173	175	208	257	272	274	293	332	351	355	357	360	382	386	405	409	427	457	479	502																			
GII.2[P16]	GII.2_P16/LC213890/Ibaraki324/2016/JP	D	V	K	T	A	A	A	H	Y	V	F	N	E	I	A	A	A	I	T	I	I	P	Q	A	S	N	K	S	N	K	E	N																			
	GII.2_P16/LC646333/1047F/Tokyo/2020/JP	D	V	K	I	A	A	A	H	H	V	F	N	E	I	A	A	A	I	T	I	I	P	Q	A	S	N	K	S	N	K	E	N																			
	GII.2_P16/LC726080/166F/Tokyo/2021/JP	D	V	K	T	A	A	V	A	H	V	F	N	E	I	A	A	A	V	T	V	I	P	Q	A	S	N	K	S	N	K	E	N																			
	GII.2_P16/LC726087/172F/Tokyo/2021/JP	D	V	K	T	A	A	A	A	H	V	F	N	E	I	A	A	A	T	I	T	I	P	Q	A	S	N	K	S	S	K	E	N																			
	GII.2_P16/LC726086/1088F/Tokyo/2022/JP	D	V	K	T	A	A	A	A	H	V	F	N	E	I	A	A	A	T	I	I	I	S	Q	A	S	N	K	S	N	K	E	N																			
	22-025	D	V	K	T	A	A	A	A	H	V	F	N	E	I	A	T	A	I	T	I	I	P	Q	A	S	N	K	S	N	K	E	N																			
	22-063	D	V	K	T	A	A	V	A	H	V	F	N	E	I	A	A	A	I	T	I	I	V	Q	A	S	N	K	S	N	K	E	N																			
	22-094	D	V	K	T	A	A	V	A	H	H	V	F	N	E	I	A	A	A	I	T	I	I	P	Q	A	S	N	K	S	N	K	E	N																		
	22-133	D	V	K	T	A	A	A	Y	Y	Y	V	F	N	E	I	A	A	A	T	I	I	I	P	Q	A	S	N	K	S	N	K	E	N																		
	22-150	D	V	K	T	S	A	A	Y	H	V	F	N	E	I	A	A	A	A	T	I	I	I	P	Q	A	S	N	R	S	N	K	E	N																		
22-167 / 202	D	V	K	T	A	A	A	H	H	V	L	N	E	I	A	A	A	A	T	I	I	I	P	Q	A	S	N	K	S	N	K	E	N																			
22-233	V	I	K	T	A	A	A	H	H	A	F	N	E	I	A	A	A	A	T	I	I	I	P	Q	A	S	N	K	N	K	E	N																				
		●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	※	※	※	●	●	●	●	●	●	●	●	※	※	※	●	●	●	●	●	●	●	●	●																	
Type	Strain	Amino acid number (RdRp region)																																																		
		4	53	54	71	85	107	111	121	123	125	130	132	173	175	208	257	272	274	293	332	351	355	357	360	382	386	405	409	427	457	479	502																			
GII.4[P16]	GII.4_P16/LC175468/Kawasaki194/2016/JP	D	V	K	T	A	A	A	H	H	A	F	N	E	V	A	A	A	I	T	I	I	P	Q	A	S	N	K	S	N	K	E	N																			
	22-161	D	V	R	T	A	A	A	H	H	V	F	S	E	I	T	A	A	I	T	I	I	P	Q	A	S	D	K	S	N	R	G	N																			
	22-164 / 187 / 195 / 221	D	V	R	T	A	A	A	H	H	V	F	S	E	I	A	A	A	I	T	I	I	P	Q	A	S	D	K	S	N	R	E	N																			
22-169	D	V	R	T	A	A	A	H	H	V	F	N	E	I	A	A	A	I	T	I	I	P	Q	A	S	G	N	K	S	N	R	E	S																			
		●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆																

● 当該で検出したGII.2[P16]の株間で差異があった部位
 ◆ 当該で検出したGII.4[P16]の株間で差異があった部位
 ※ GII.2[P16]流行株でみられる特徴的なアミノ酸置換部位 (5か所)
 注: 白抜き文字はGII.2[P16]はAccession No.LC213890を、GII.4[P16]はAccession No.LC175468を基準にした場合に置換が見られたアミノ酸を示す。

傾向であり、近年の大阪で感染伝播に伴う変異の機会が多かった GII.2 に対し、GII.4 は検出があまり見られず変異の機会が少なかったからではないかと考えられる^{14, 16)}。GII.2 について、株間で差異のあった部位は 13 か所のうち 8 か所が 130 番目までに存在し、GII.4 と比べて前半に集中している傾向にあった。このことから、同じ GII.P16 の RdRp でも Genotype が異なると変異の起こりやすい部位に違いがあり、性質の異なる RdRp に進化していく可能性が示唆された。

2016 年以降に日本で検出された株と比較したとき、GII.2、GII.4 共に 2016 年以降の流行株に特徴的な 5 つのアミノ酸置換部位 (D173E, S293T, V332I, K357Q, T360A) は保存されていた。一方で、GII.4 では今年度検出された全ての株で K54R 及び K457R の置換があり、これは GII.2 に存在しなかった。1 か所の変異が RdRp の性質に影響することも報告されており²¹⁾、これらの変異が 2022 年度の顕著な GII.4[P16]の増加 (表 2) に関わっているのかどうか、引き続き解析していきたい。アミノ酸配列の比較では Genotype 間を超えて高い相同性を示していたが、RdRp 系統樹解析においては GII.2 と GII.4 に明確に分かれ、GII.4 に特有のアミノ酸変異が認められた。2016 年以降の解析であることを考慮しても、ノロウイルスゲノム複製において RdRp そのものも Genotype と連動して変異していく可能性を示唆するものと考えられた。

GII.2[P16] は便中のウイルスコピー数が GII.4[P31]や GII.17[P17]に比して多く²²⁾、感染の確率が高いことが示唆される。これが GII.P16 RdRp の特徴であれば GII.4[P16]にも同様の可能性があり、更なる流行に注意が必要である。また、2022 年度には中国では初めて GII.12[P16]のアウトブレイクも報告されており²³⁾、GII.2、GII.4 以外との組合せで流行することも考えられる。今後、RdRp の複製効率や変異率の違いが各遺伝子型のノロウイルスに与える影響も明らかにする必要がある。

本研究を通じて Dual typing による遺伝子型調査の必要性が改めて確認でき、点変異によるウイルスの変化を見逃さないようにゲノム全体の遺伝子解析を行うことの重要性が示唆された。

利 益 相 反

開示すべき利益相反はない。

- 1) Ahmed SM, Lopman BA, Levy K. A systematic review and metaanalysis of the global seasonality of norovirus. *PLoS One* 2013; **8**: e75922. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075922>.
- 2) Bartsch SM, Lopman BA, Ozawa S, Hall AJ, Lee BY. Global Economic Burden of Norovirus Gastroenteritis. *PLoS One* 2016; **11**(4): e0151219. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151219>.
- 3) 厚生労働省. 4.食中毒統計資料. http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/shokuhin/syokuchu/04.html
- 4) Chhabra P, de Graaf M, Parra GI, Chan MC, Green K, Martella V, Wang Q, White PA, Katayama K, Vennema H, Koopmans MPG, Vinje J. Updated classification of norovirus genogroups and genotypes. *J Gen Virol* 2019; **100**(10): 1393-1406.
- 5) Bull RA, Hansman GS, Clancy LE, Tanaka MM, Rawlinson WD, White PA. Norovirus recombination in ORF1/ORF2 overlap. *Emerg Infect Dis* 2005; **11**(7): 1079-1085.
- 6) Eden JS, Tanaka MM, Boni MF, Rawlinson WD, White PA. Recombination within the pandemic norovirus GII.4 lineage. *J Virol* 2013; **87**(11): 6270-6282.
- 7) Iritani N, Kaida A, Abe N, Sekiguchi J, Kubo H, Takakura K, Goto K, Ogura H, Seto Y. Increase of GII.2 norovirus infections during the 2009–2010 season in Osaka City, Japan. *J Med Virol* 2012; **84**(3): 517-25.
- 8) Nagasawa K, Matsushima Y, Motoya T, Mizukoshi F, Ueki Y, Sakon N, Murakami K, Shimizu T, Nobuhiko Okabe, Nagata N, Shirabe K, Shinomiya H, Suzuki W, Kuroda M, Sekizuka T, Suzuki Y, Ryo A, Fujita K, Oishi K, Katayama K, Kimura H. Genetic Analysis of Human Norovirus Strains in Japan in 2016-2017. *Front Microbiol* 2018; **9**: 1. doi: 10.3389/fmicb.2018.00001. eCollection 2018.
- 9) Ao Y, Wang J, Ling H, He Y, Dong X, Wang X, Peng J, Zhang H, Jin M, Duan Z. Norovirus GII.P16/GII.2-associated gastroenteritis, China, 2016. *Emerg Infect Dis* 2017; **23**(7):1172–5. doi: 10.1038/s41598-020-64148-4.

- 10) 国立感染症研究所. IASR ノロウイルス等検出速報（自動更新2023年6月21日作成）. <https://www.niid.go.jp/niid/ja/norovirus-m/2082-idsc/iasr-noro/5701-iasr-noro-150529.html>
- 11) Tohma K, Lepore CJ, Ford-Siltz LA, Parra GI. Phylogenetic Analyses Suggest that Factors Other Than the Capsid Protein Play a Role in the Epidemic Potential of GII.2 Norovirus. *mSphere* 2017; **2**(3).
- 12) Zheng GL, Zhu ZX, Cui JL, Yu JM. Evolutionary analyses of emerging GII.2[P16] and GII.4 Sydney [P16] noroviruses. *Virus Evol* 2022; **8**(1): veac030. doi: 10.1093/ve/veac030. eCollection 2022.
- 13) Ao Y, Cong X, Jin M, Sun X, Wei X, Wang J, Zhang Q, Song J, Yu J, Cui J, Qi J, Man M, Duan Z. Genetic Analysis of Reemerging GII.P16-GII.2 Noroviruses in 2016–2017 in China. *J Infect Dis* 2018; **218**: 133–43.
- 14) 白井達哉, 左近直美, 森 治代. 大阪府の食中毒事例で検出されたノロウイルス流行状況と分子疫学的解析（2021年度）. *大阪健康安全基盤研究所研究年報 令和4年度* 2022; **6**: 27-36.
- 15) 矢尾板 優, 長谷川 道弥, 浅倉 弘幸, 永野 美由紀, 林 志直, 根岸 あかね, 河上 麻美代, 林 真輝, 山崎 貴子, 黒木 絢士郎, 磯貝 まや, 北村 有里恵, 加來 英美子, 藤原 卓士, 鈴木 淳, 三宅 啓文, 長島 真美, 貞升 健志. 東京都内で検出されたノロウイルスの遺伝子解析（2021年度）. *東京健康安全研究センター年報 2022年度* 2022; **73** : 123-130.
- 16) 白井達哉, 左近直美, 高田利香, 本村和嗣. 大阪府の食中毒事例で検出されたノロウイルス流行状況と分子疫学的解析（2019・2020年度）. *大阪健康安全基盤研究所研究年報 令和3年度* 2021; **5**: 18-24.
- 17) Lun JH, Hewitt J, Yan GJH, Enosi Tuipulotu D, Rawlinson WD, White PA. Recombinant GII.P16/GII.4 Sydney 2012 Was the Dominant Norovirus Identified in Australia and New Zealand in 2017. *Viruses* 2018; **10**(10):548.
- 18) Hasing ME, Lee BE, Qiu Y, Xia M, Pabbaraju K, Wong A, Tipples G, Jiang X, Pang XL. Changes in norovirus genotype diversity in gastroenteritis outbreaks in Alberta, Canada: 2012-2018. *BMC Infect Dis* 2019; **19**(1):177.
- 19) 国立感染症研究所. 病原体検出マニュアル ノロウイルス（第1版）令和元年6月. <https://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/Norovirus20190611.pdf>.
- 20) Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol Biol Evol* 2018; **35**(6): 1547-1549.
- 21) Bull RA, Eden JS, Rawlinson WD, White PA. Rapid evolution of pandemic noroviruses of the GII.4 lineage. *PLoS Pathog* 2010; **6**: e1000831.
- 22) Cheung SKC, Kwok K, Zhang LY, Mohammad KN, Lui GCY, Lee N, Nelson EAS, Lai RWM, Leung TF, Chan PKS, Chan MC. Higher viral load of emerging norovirus GII.P16-GII.2 than pandemic GII.4 and epidemic GII.17, Hong Kong, China. *Emerg Infect Dis* 2019; **25**(1): 119-122.
- 23) Xiong Q, Jiang H, Liu Z, Peng J, Sun J, Fang L, Li C, Qiu M, Zhang X, Lu J. Untangling an AGS outbreak caused by the recombinant GII.12[P16] norovirus with Nanopore Sequencing. *Front Cell Infect Microbiol* 2022 ; **12**:911563. doi: 10.3389/fcimb.2022.911563. eCollection 2022.

WEBサイトの内容は2023年6月21日に確認した。

Genetic analysis of norovirus outbreaks in case of food poisoning in Osaka Prefecture (Fiscal 2022 report)

Tatsuya SHIRAI, Yumi USHIKAI, Emiko YAMAZAKI and Naomi SAKON

In the 2022/2023 season (April 2022–March 2023), norovirus was detected in 23 suspected foodborne outbreaks in Osaka. A dual-typing (Genotype and P-type) system for GI and GII noroviruses was performed using partial regions of the ORF1 RdRp and ORF2 VP1 encoding regions. Five genotypes were detected in the 2022/2023 season, with GII.2 [P16] (nine cases, 39%) being the most frequently detected, followed by GII.4 [P16] (six cases, 26%). Of the past four seasons, GII.4 [P16] had the highest number of cases in this season. We studied the nucleotide sequences of GII.P16 RdRp (1530 bases) in the top two genotypes. The results of the phylogenetic tree indicated that each of the GII.2 [P16] and GII.4 [P16] strains detected after 2016 formed a single cluster. GII.P16 RdRp was reported to contain five unique amino acid sequences since 2016. We performed an amino acid sequence analysis of RdRp (510aa) and showed that these amino acid substitution sites were conserved in all strains detected during this season. Differences were found in the sites and frequencies of amino acid substitutions between GII.2 [P16] and GII.4 [P16]. Henceforth, we must elucidate the relationship between these mutations and the spread of infection and study the mutation rate in the RdRp region. The necessity of dual typing was reconfirmed, and the whole genome sequence is suggested to be important to not overlook the point mutations of norovirus.

Key words : norovirus, foodborne outbreak, RdRp, GII.P16

大阪健康安全基盤研究所における HTLV-1 確認検査

阪野文哉, 浜みなみ, 川畑拓也, 森 治代

大阪府では平成 22 年に国の HTLV-1 特命チームが策定した「HTLV-1 総合対策」を受け、平成 25 年に特定感染症検査等事業実施要綱に従い、妊婦以外を対象とした HTLV-1 検査及び相談事業を開始した。相談時に、保健師が HTLV-1 に感染している可能性が高いと判断した人に対しては、HTLV-1 抗体のスクリーニング検査の受検を勧奨している。大阪健康安全基盤研究所では、平成 25 年度から令和 3 年度までに、大阪府と、政令指定都市（政令市）、中核市の各保健所からの依頼を受け、合計 20 件の HTLV-1 確認検査を行ってきたが、この間に各保健所が実施した相談件数及びスクリーニング検査数の集計と確認検査の陽性数をもとに、これまでの大阪府内における HTLV-1 相談・検査事業について検討した。各年度の HTLV-1 スクリーニング検査数に対する HTLV-1 確認検査陽性率が 9%~50%、全体として 18%であることから、スクリーニング検査を勧奨する保健師の判断や対象者の設定が適切であることが示唆された。また、HTLV-1 と HTLV-2 の鑑別を試みたところ、確認検査で HTLV 抗体陽性となった 18 検体全てが、HTLV-1 抗体陽性であった。HTLV-1 の水平感染が 16 歳~34 歳の世代で増加しているが、受検機会が妊婦検診など限定的であるため、府民への啓発と受検勧奨が必要である。

キーワード：HTLV-1、ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型、確認検査、スクリーニング検査

ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型 (HTLV-1) の感染者数は約 72 万~82 万人と推定されており¹⁾、成人 T 細胞白血病 (ATL) や HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) といった重篤な疾病をまれに発症するが、これらの疾病の有効な治療法は未だ確立されていない。日本は先進国の中で唯一の HTLV-1 侵淫国である。そこで平成 22 年 9 月に政府の方針によって組織された HTLV-1 特命チームが、政治主導のもと患者や専門家を交え検討を行い、妊婦を対象とした HTLV-1 抗体検査実施体制の確立、保健所における HTLV-1 抗体検査の導入、HTLV-1 キャリアや ATL 患者、HAM 患者への相談体制の構築を決定した「HTLV-1 総合対策」を同年 12 月にとりまとめた。この決定により厚生労働省において行政、専門家、患者等による「HTLV-1 対策推進協議会」が開催され、各都道府県に「HTLV-1 母子感染対策協議会」を設置することとなった。HTLV-1 は感染症法において指定されている病原体ではないため、現時点で国が新規に診断された HTLV-1 キャリア数を把握する方法はない。厚生労働省の研究班が中心となって運営する大阪健康安全基盤研究所微生物部ウイルス課

「キャリねっと」でのアンケート結果から新規で HTLV-1 キャリアであると判明した人のうち 36.5% が妊婦検診、33.6% が献血時の検査で判明していた²⁾。大阪府では特定感染症検査等事業実施要綱に従い、平成 25 年 5 月から妊婦以外を対象とした HTLV-1 相談・検査事業を開始した。同事業では、相談時に保健師が HTLV-1 に感染している可能性が高いと判断した人、すなわち、両親、配偶者、血縁のある祖父母、兄弟姉妹などが HTLV-1 のキャリアである者、1986 年 11 月以前に輸血を受けたことがある者、保健所長が検査の必要を認めた者に対し、HTLV-1 抗体のスクリーニング検査の受検を勧奨している³⁾。大阪健康安全基盤研究所では、平成 25 年度から令和 3 年度までに、大阪府と政令市、中核市の各保健所からの依頼を受け、合計 20 件の HTLV-1 確認検査を行った。

本研究では、この間に各保健所が実施した相談件数及びスクリーニング検査数を集計し、確認検査の陽性数をもとに、これまでの大阪府内における HTLV-1 相談・検査事業について検討した。また保

存血清を用い、過去の確認検査にて実施していたウェスタンブロット法（WB法）では鑑別できなかったHTLV-1とHTLV-2の鑑別を、近年導入したラインブロット法によって試みた。

方法

1. 大阪府内保健所のHTLV-1相談・検査事業におけるスクリーニング検査実施数と陽性率の検討

平成25年から令和3年までの、大阪府と政令市、中核市の各保健所が実施した相談件数及びスクリーニング検査数を各保健所に問い合わせ、集計を行った。また、大阪健康安全基盤研究所で実施した確認検査結果と合わせて、保健所におけるスクリーニング検査実施数に対する陽性率を算出した。

2. ラインブロット法によるHTLV-1/2の鑑別

これまでに実施したHTLV-1確認検査のうち、WB法で陽性を確認したがHTLV-1抗体またはHTLV-2抗体が未鑑別な12件の保存血清を用い、ラインブロット法（イノリアHTLV・富士レビオ）にてその鑑別を行った。

本研究は、地方独立行政法人大阪健康安全基盤研究所倫理審査委員会の承認を得て（申請番号：0810-04-5）「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」を遵守して実施したものである。

結果

平成25年度から令和3年度までの大阪府と政令市、中核市の各保健所で実施したHTLV-1の相談件数を年度ごとに集計したところ、HTLV-1相談件数

は1年あたり平均46.7件実施されており、平成26年度と令和元年度が65件と最も多く、令和2年度が28件と最も少なかった。（図1）

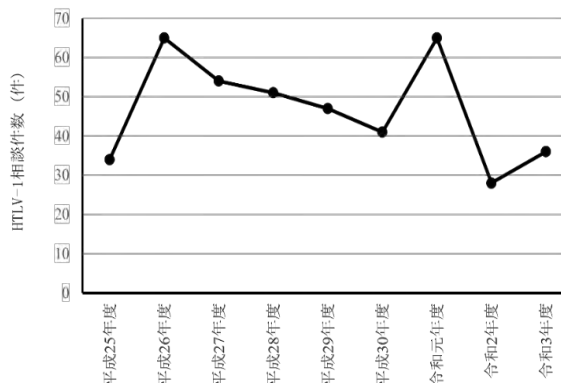


図1 大阪府内の保健所におけるHTLV-1相談件数

平成25年度から令和3年度までの各保健所で実施されたスクリーニング検査数を集計したところ、スクリーニング検査は1年あたり平均11件実施されており、令和3年が17件と最も多く、平成25年が5件と最も少なかった。各年度のスクリーニング検査数に対する確認検査陽性率を算出したところ、平成26年が50%と最も高く、平成30年が9%と最も低く、全体の陽性率は18%であった。（表1）

HTLV-1抗体とHTLV-2抗体が鑑別可能なラインブロット法を導入した令和元年以前に、WB法により確認検査でHTLV陽性となった検体12件についてラインブロット法にてHTLV-1/2の鑑別を行ったところ、12件全ての陽性検体がHTLV-1抗体陽性となり、国内で未確認のHTLV-2抗体陽性例は検出されなかった。なお、ラインブロット法導入後の6件も、すべてHTLV-1抗体陽性であることを確認して

表1 大阪府と政令市・中核市保健所におけるHTLV-1スクリーニング検査数と、大阪健康安全基盤研究所における確認検査陽性数、スクリーニング検査数に対する確認検査陽性率

	平成 25 年度	平成 26 年度	平成 27 年度	平成 28 年度	平成 29 年度	平成 30 年度	令和 元 年度	令和 2 年度	令和 3 年度	合計
スクリーニング検査数	5	10	9	11	11	11	10	15	17	99
スクリーニング検査陽性数	1	5	1	2	2	2	2	2	2	19
確認検査陽性数	1	5	1	2	2	1	2	2	2	18
陽性率	20%	50%	11%	18%	18%	9%	20%	13%	12%	18%

いる。

考 察

平成 25 年 5 月に大阪府で HTLV-1 の相談・検査事業が開始されて以降、令和元年度までは 1 年あたりの相談件数が 40～50 件ほどで推移していたが、令和 2 年度では大きく相談件数が減少しており、新型コロナウイルス感染症の流行による影響と考えられた。

大阪府の HTLV-1 相談・検査事業においては、両親、配偶者、血縁のある祖父母・兄弟姉妹等が HTLV-1 のキャリアである者等を HTLV-1 スクリーニング検査の対象者として受検を勧奨している。調査期間中の各年度における HTLV-1 スクリーニング検査数に対する HTLV-1 確認検査の陽性率が 9%～50%、全体として 18%であることから、保健師の判断や対象者の設定が適切であることが示唆された。

一方で、近年、献血者の情報と採血した血液の検査結果を用いた調査において、HTLV-1 の水平感染が 16 歳～34 歳の若い世代において増加していることが報告された⁴⁾。現時点では、HTLV のキャリアであることを知る手段が妊婦検診など限定的であることから、府民への啓発と受検勧奨も必要であることを示していると考えられた。

謝 辞

本研究を実施するにあたり情報提供いただきました、大阪府、政令市、中核市の担当部署の皆様にご感謝申し上げます。

利 益 相 反

開示すべき利益相反はない。

文 献

- 1) 国立研究開発法人日本医療研究開発機構
AMED 研究開発課題データベース HTLV-1
疫学研究及び検査法の標準化に関する研究
https://amedfind.amed.go.jp/amed/search/task_search_details.html
- 2) 厚生労働省 第 13 回 HTLV-1 対策推進協議会
<https://www.mhlw.go.jp/content/10901000/000509846.pdf>
- 3) 大阪府 HTLV-1 (ヒト T 細胞白血病ウイルス

1 型) 感染症について

<https://www.pref.osaka.lg.jp/attach/23711/00163936/2HTLV1.pdf>

- 4) Sagara Y, Nakamura H, Satake M, Watanabe T, Hamaguchi I. *J Clin Virol* 2022 157 105324
<https://doi.org/10.1016/j.jcv.2022.105324>

WEB サイトの内容は 2023 年 6 月 16 日に確認した。

HTLV-1 confirmation tests at Osaka Institute of Public Health

Fumiya BANNO, Minami HAMA, Takuya KAWAHATA and Haruyo MORI

As “Comprehensive HTLV-1 Countermeasures” was launched by the Japanese government’s Human T-lymphotropic virus 1 (HTLV-1) Special Mission Team in December 2010, Osaka Prefecture began HTLV-1 testing and consultation services for non-pregnant women in 2013 under the Guidelines for the Implementation of Testing Services for Specified Infectious Diseases. At the time of consultation, public health nurses recommended that those judged highly likely to be infected with HTLV-1 undergo a screening test for antibody detection. The Osaka Institute of Public Health conducted 20 HTLV-1 confirmation tests at the request of public health centers in Osaka Prefecture, government ordinance cities, and core cities from FY 2013 to FY 2021. The HTLV-1 positivity rate ranged from 9 to 50% in the total number of HTLV-1 screening tests, suggesting that public health nurses selected these subjects appropriately for screening. In addition, a line blotting assay was performed to differentiate HTLV-1 from HTLV-2 in all 18 positive specimens and all specimens were HTLV-1. Although the number of HTLV-1 carriers with horizontal infection has increased among the younger generation (16–34 years old), opportunities for HTLV-1 testing are limited at prenatal check-ups. Therefore, our study indicates the need to conduct educational campaigns for individuals to undergo HTLV-1 screening tests.

Key words : HTLV-1, human T-cell lymphotropic virus, confirmation test, screening test

スイセン類による食中毒事例について

野村千枝^a, 山口瑞香^b, 新矢将尚^a

スイセンは地中海沿岸を起源とする観賞用植物である。日本では、地上部はニラの葉、地下部は食用の里芋に似ていることから、散発的に誤食され食中毒事例が発生している。2022年8月、大阪府でスイセンの根の誤食による食中毒事例が発生した。形態学的鑑別によりスイセンと同定され、LCMS分析により原因物質のリコリン、ガラタミンが検出された。スイセン属の同定はその後遺伝子鑑別により確認された。

キーワード：スイセン類、リコリン、高速液体クロマトグラフ/質量分析計、遺伝子解析

スイセン類（ニホンスイセンやラップスイセンなど）はヒガンバナ科スイセン属 *Narcissus* に分類される。地中海沿岸からアフリカ北部の原産で、園芸用として色や形の異なる種類がある。多年草で、冬から春にかけて白や黄の花を咲かせるものが多い。スイセン類には、植物性自然毒の一種であるリコリンやガラタミンなどのアルカロイドが含まれている。これらのアルカロイドはスイセン類に多く含まれ、喫食したときの症状は悪心、嘔吐、下痢、流涎、発汗、頭痛などがある。スイセン類は全草が有毒であり、その地上部が食用のニラ、鱗茎が玉ねぎとよく似ている^{1),2)}。厚生労働省の発表では、2013年から2022年にかけて、日本国内で216人のスイセン類による食中毒患者が報告されている¹⁾。

食中毒の原因究明の方法としては、植物の形態観察および遺伝子解析による植物種の鑑別法が報告されている^{3),4)}。また高速液体クロマトグラフ/質量分析法によるアルカロイド類の分析も報告されている⁵⁾⁻⁷⁾。

食中毒が発生した際には、迅速に原因食品の特定と原因物質の確認を行う必要がある。今回、令和4年8月に大阪府内で発生したスイセン類の誤食による食中毒への対応について報告する⁸⁾。

実験方法

1. 事例の概要⁸⁾

令和4年8月16日、大阪府内の消防から保健所に「球根様の物を調理して食べたところ、嘔吐等の症状を呈した家族3人から救急要請があり対応中である」との連絡があった。翌日、保健所が、患者らへの聞き取り調査を実施し、里芋に混じった球根様の物等を回収した。調査の結果、患者の発症状況が類似していること、患者の症状がスイセン類の喫食による中毒症状と一致することおよび球根様の物がスイセン類の鱗茎であったことから、保健所はスイセン類の鱗茎を原因食品とする食中毒と断定した。

2. 発生状況

- (1) 喫食日時：8月16日20時45分～21時00分
- (2) 発症日時：8月16日21時09分～21時30分
- (3) 発生場所：患者の自宅
- (4) 喫食者数：3名
- (5) 患者数：3名（60～80歳代までの男女）
- (6) 主症状：悪心、嘔吐等
- (7) 原因食品：スイセン類の球根
- (8) 病因物質：植物性自然毒（彼岸花毒成分）（推定）

a 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部食品安全課

b 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部食品化学課

3. 試料

里芋に混じった球根様の物は大阪市立自然史博物館に持ち込まれ、形態観察およびニホンスイセンの標本との光学顕微鏡による外皮とデンプン粒の比較により、ニホンスイセンの鱗茎と同定された。その後、当研究所に搬入された中毒検体を図1 (A: 調理残品 (筑前煮)、B: 対照品 (里芋に混じった球根様の物、未調理品)) に示す。アルカロイド類の添加回収試験には市販の里芋を用いた。遺伝子解析の陽性検体 (PC) として市販のニホンスイセンの鱗茎を用いた。

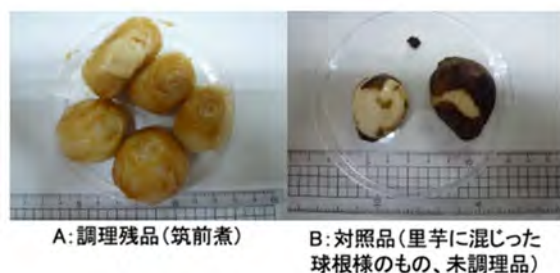


図1 当所に搬入された中毒検体

調査方法

1. アルカロイド類の分析

山口らの方法を元に以下に記載する方法で中毒検体中のアルカロイド類の分析を行った⁹⁾。

(1) 試薬等

① 標準品

リコリンは、メルク社製、ガラタミンは東京化成工業 (株) 製を用いた。

② 標準溶液等

標準品約 5 mg をメタノールおよび 70% でメタノール溶解して全量を 5 mL とし標準原液とした (1,000 µg/mL) とした。標準原液をメタノール等で希釈し、0.005~0.1 µg/mL の標準溶液を作成した。

③ 試薬等

メタノール、アセトニトリルは富士フィルム和光純薬 (株) 製 LC/MS 用、酢酸アンモニウムは富士フィルム和光純薬 (株) 製高速液体クロマトグラフ用を用いた。固相抽出カラムは Agilent 社製 Captiva ND Lipids (以下 NDL)、フィルターは ADVANTEC DISMIC-13HP 0.2 µm を使用した。

(2) 装置

高速ホモジナイザーはポリトロン PT3100

(KINEMATICA 製)、遠心分離機は、himac CF5RE (eppendorf 製)、LC-MS/MS は Acquity UPLC および Xevo TQ-S micro (Waters 製) を使用した。

(3) 測定条件

分析カラム: GL Science Inertsil ODS-4 (2.1x100 mm, 3 µm)、カラム温度: 40°C、流速: 0.2 mL/min、注入量: 5 µL、移動相: A 液; 5 mmol/L 酢酸アンモニウム水溶液 B 液; アセトニトリル、グラジエント条件: B 液 5% (0 min) → 25% (6 min) → 90% (11 min)

イオン化法: ESI (+)、測定モード: MRM

測定 m/z: リコリン; 288 > 147 (RT 6.8 min)、ガラタミン; 288 > 213 (RT 7.5 min)

(4) 試験溶液の調製

① 抽出

細切均一化した試料 2 g を量りとり、メタノール 10 mL を加えてホモジナイズ後、毎分 3,000 回転で 5 分間遠心分離を行い、上清を採取した。残留物にメタノール 9 mL を加えてホモジナイズ後、同様に遠心分離して先の上清と合わせてメタノールで 20 mL で定容し、抽出液とした。

② 精製

抽出液 1 mL を NDL カラムに負荷し、メタノール 1 mL で溶出し、メタノールで 2 mL に定容した。これをさらに水で 2.5 倍希釈して試験溶液とした。この試験溶液をフィルターでろ過後、LC-MS/MS で測定した。試験溶液は必要に応じて希釈した。

(5) 添加回収試験

細切均一化した里芋 2 g に試料中濃度が 1 mg/kg となるように標準溶液を添加し、上記の方法で試験溶液を調製した。

2. 植物種の遺伝子解析

(1) 試薬等

組織溶解液は最終濃度が Tris-HCl (pH8.0) 20 mM、EDTA 5 mM、NaCl 400 mM、SDS 0.3% になるよう調製した。Proteinase K は QIAGEN 社製 20 mg/mL を用いた。精製は QIAGEN 社 DNeasy Plant mini kit を用いた。PCR 酵素は (株) 島津製作所製 Ampdirect Plus 酵素セットを用いた。Ampdirect Plus は PCR 阻害物質の影響を抑える作用をもつ緩衝液である。プライマーは MatK-1RKIM-f/MatK-3KIM-r、rbcLa-F/rbcLa-R、ITS2-S2F/ITS4 を用いた¹⁰⁾。プライマーの合成は ThermoFisher 社に依頼した。

(2) 装置

粉砕器 BioMasher II (nippi 社)、遠心分離機 KUBOTA5922 (KUBOTA 社)、微量分光光度計 NanoPhotometer Pearl (IMPLEN 社)、サーマルサイクラー Veriti 200 (Applied Biosystems 社)、DNA シーケンサー ABI PRISM3130 Genetic Analyzer (ThermoFisher 社)

(3) 試験溶液の調製

① 抽出 (精製なし)

試料 50 mg (約 5 mm 角) を量りとり、組織溶解液 200 μ L および Proteinase K 10 μ L (200 μ g) を加え、BioMasher II で粉砕し、ボルテックスミキサーで攪拌した。55°C で 60 分間加温し、Proteinase K を失活させるため 95°C で 5 分間加温したものを DNA 試料原液とした。

② 抽出・精製 (精製あり)^{11,12)}

試料 50 mg (約 5 mm 角) を量りとり、DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN 社) を用いて DNA 抽出・精製を行った。操作はキット付属の使用方法に従った。調製した DNA 溶液は微量分光光度計で波長 260 nm における吸光度の値 1 を 50 ng/ μ L として DNA 濃度を 10 ng/ μ L に調製して DNA 試料原液とした。

(4) 遺伝子塩基配列の解析による植物種の確認
植物種の確認は既報⁷⁾を参考に、*rbcl* 領域および *matK* 領域の遺伝子を増幅して、ダイレクトシーケンス法による塩基配列の解析を行った。

PCR に供する溶液は、2×Ampdirect Plus 10 μ L、BIOTAQ HS DNA Polymerase (5U/ μ L) 0.1 μ L、8 μ M のフォワードプライマーとリバースプライマー各々プライマー 1 μ L、10 ng/ μ L に調製した DNA 溶液を 1 μ L 加えた後、滅菌水で 20 μ L になるよう調製した。PCR は 95°C 10 分間の後、94°C 30 秒間、55°C 60 秒間、72°C 60 秒間を 1 サイクルとして 30 サイクルで行った。その後、72°C 7 分間を行った。PCR 後の溶液から余剰のプライマーを ExoSAP-IT (Affymetrix 社) を用いて除去後、PCR 産物を BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit (ThermoFisher 社) を用いて蛍光ラベル化した。未反応の試薬を除去するためエタノール沈殿により精製した。その後、脱イオン化ホルムアルデヒド (ThermoFisher 社) を等量加えた後、DNA シーケンサーにより塩基配列の解析を行った。解析した配列は DNA 配列解析ソフトウェア CLC Sequencing Viewer version 7 (CLC 社) によって波形を確認して塩基を決定した。決定した塩基配列は日本 DNA データバンク (DDBJ) のデータベース (Genbank) に

登録されている遺伝子配列との相同性の検索を行った。

結果 および 考察

1. アルカロイド類の分析

(1) 検量線

0.005~0.1 μ g/mL の標準溶液を調製し、絶対検量線を作成した。決定係数 (r^2) = 0.999 以上の良好な直線性が得られた。定量下限は 0.5 mg/kg とした。

(2) 分析結果

A 調理残品 (筑前煮)、B 対照品 (里芋に混じった球根様の物、未調理品) からリコリンが検出された (表 1、図 2)。過去の例²⁾と比較しても同程度の検出結果であった。

表 1 中毒検体の分析結果

	試料中濃度 (mg/kg)	
	リコリン	ガラントミン
A: 調理残品	279	5.7
B: 対照品	282	5.5

(3) 添加回収試験結果

上記の方法にて 5 併行で添加回収試験を実施した。その結果、平均回収率および相対標準偏差はリコリンで 103 %、2.2 %、ガラントミンで 91 %、5.3 % と良好であった。

2. 植物種の遺伝子解析

(1) 操作時間

既報^{11,12)}に従い DNeasy Plant Mini Kit を用いて精製を行った場合、約 3 時間を要するが、精製なしでは約 1.5 時間と、操作時間が半分に短縮可能であった。

(2) 遺伝子解析結果

陽性検体、A 調理残品 (筑前煮) および B 対照品 (里芋に混じった球根様の物、未調理品) の遺伝子解析の結果、すべての試料で、*rbcl*、*matK* の両領域において、99 % 以上の高い一致率でスイセン属 *Narcissus* が検出されたことから、食中毒にも迅速に対応できると考えられる (表 2)。

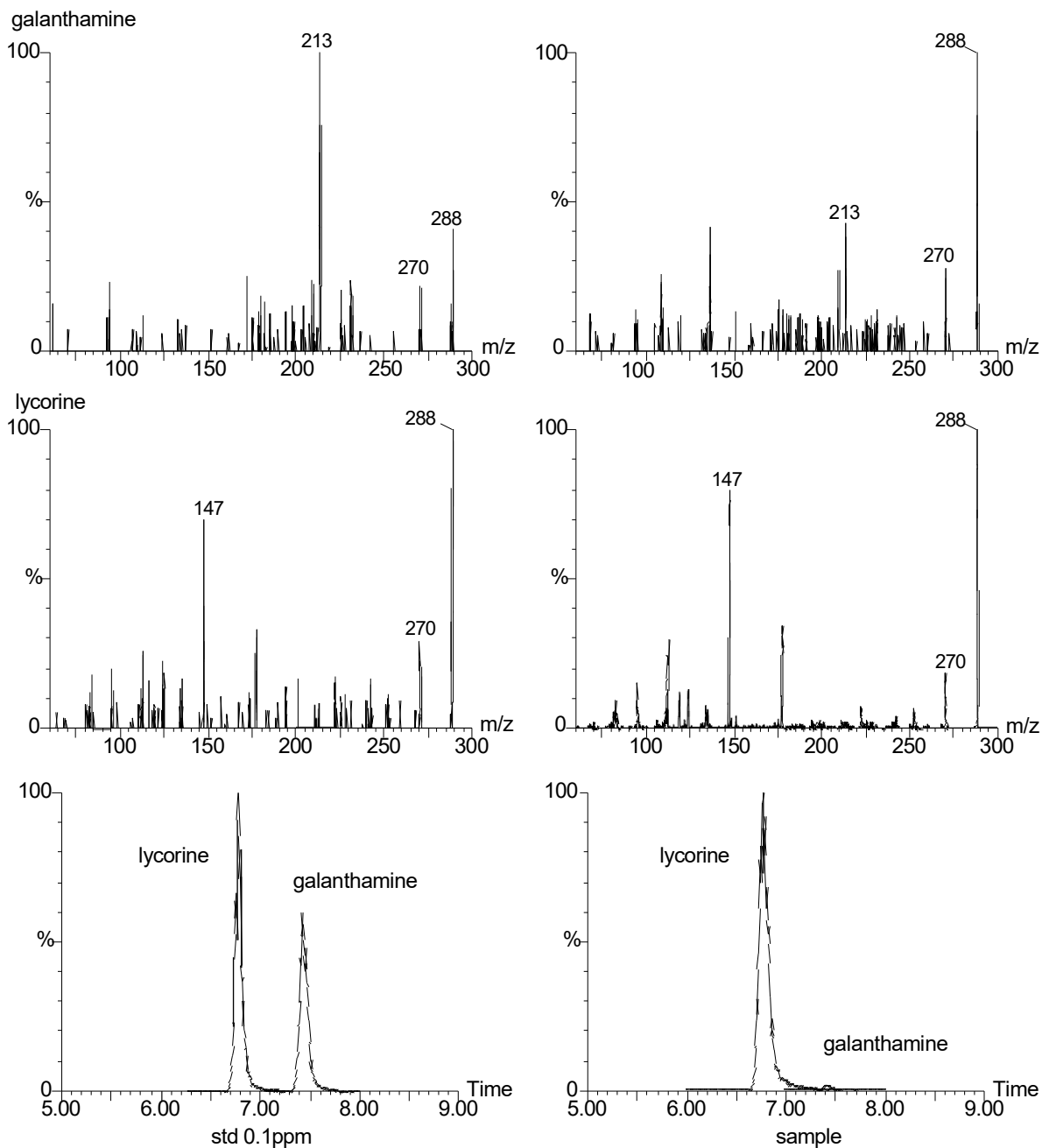


図2 標準と中毒検体のクロマトグラムおよびMS/MS スペクトル

表2 中毒検体の遺伝子解析結果

Sample	Target region	精製あり	精製なし
		Score, Identity, %, Species, Accession number	Score, Identity, %, Species, Accession number
PC	rbcL	1075bits, 598/601, 99.67 %, <i>Narcissus tazetta</i> , MW322827.1	1076bits, 599/601, 99.67 %, <i>Narcissus tazetta</i> , MW322827.1
	matK	1285bits, 714/716, 99.721 %, <i>Narcissus tazetta</i> , KC704516.1	1019bits, 571/574*, 99.48 %, <i>Narcissus tazetta</i> , KC704516.1

A: 調理残品	rbcL	1068bits, 579/580, 99.83 %, <i>Narcissus tazetta</i> , MW322827.1	1076bits, 599/601, 99.67 %, <i>Narcissus tazetta</i> , MW322827.1
	matK	1214bits, 673/673, 100 %, <i>Narcissus tazetta</i> , KC704516.1	1254bits, 697/699, 99.71 %, <i>Narcissus tazetta</i> , KC704516.1
B: 対照品	rbcL	1070bits, 596/598, 99.67 %, <i>Narcissus tazetta</i> , MW322827.1	1076bits, 599/601, 99.67 %, <i>Narcissus tazetta</i> , MW322827.1
	matK	1269bits, 704/705, 99.86 %, <i>Narcissus tazetta</i> , KC704516.1	1223bits, 683/688, 99.27 %, <i>Narcissus tazetta</i> , KC704516.1

利益相反

開示すべき利益相反はない。

文献

- 厚生労働省 HP. 自然毒のリスクプロファイル高等植物スイセン.
<https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000075843.html>
 - 山本敬男, 泉美樹, 小林浩, 山梨県内で採取されたスイセンとその調理品に含まれるリコリン及びガランタミン測定法の検討と含有量の特徴. *山梨県衛生環境研究所年報* 2019; **63**: 31-35.
 - 山元梨律子, 大坂郁恵, 吉田栄充, 石井里枝, 植物性自然毒による食中毒原因究明への DNA 塩基配列解析の応用. *埼玉県衛生研究所所報* 2018; **52**: 61-65.
 - 篠崎淳一, 数馬恒平, 佐竹元吉, 近藤一成, 紺野勝弘. 食中毒事例の多い有毒植物の PCR-RELP 法による鑑別. *食品衛生学雑誌* 2018; **59**(3): 134-140.
 - 上田泰人, 伊藤光男, 田中敏嗣, スイセンの LC/MS/MS 分析について. *神戸市環境保健研究所報* 2008; 60-61.
 - 牛山温子, 赤星千絵, 大澤伸彦, 清水智美, 松島勇紀, 清水英明, 橋口成喜, LC-MS/MS および DNA バーコーディングを用いた食中毒事例におけるチョウセンアサガオ類の鑑別. *食品衛生学雑誌* 2017; **58**(2): 86-95.
 - 赤星千絵, 江原庸, 佐藤英子, 淀谷雄亮, 牛山温子, 栗田史子, 吉田裕一, 浅井威一郎, 橋口成喜. LC-TOF/MS 及び DNA シーケンサーを併用した自然毒食中毒の検査体制の構築. *川崎市健康安全研究所年報* 2020; **56**(8): 82-87.
 - 健康医療部生活衛生室食の安全推進課監視指導グループ. 大阪府報道発表資料 (2022 年 8 月 22 日) 有毒植物による食中毒の発生について. <https://www.pref.osaka.lg.jp/hodo/index.php?site=fumin&pageId=45470>
 - 山口瑞香, 新矢将尚, 植物性自然毒一斉分析法の検討. *第 57 回全国衛生化学技術協議会年会講演集* 2020; 180-181.
 - CCDB. Canadian Centre for DNA Barcoding: Primer Sets for Plants and Fungi.
https://ccdb.ca/site/wp-content/uploads/2016/09/CCDB_PrimerSets-Plants.pdf
 - 村上太郎, 昌山敦, 大島詔, 仲谷正, 山口之彦. 大阪市で発生したクワズイモによる食中毒事例について. *大阪健康安全基盤研究所年報* 2018; **2**: 63-67.
 - 野村千枝, 昌山敦, 村上太郎, 梶村計志, リアルタイム PCR 法によるクワズイモの同定. *大阪健康安全基盤研究所年報* 2018; **2**: 68-73.
- WEB サイトの内容は 2023 年 6 月 9 日に確認した。

Case study on Narcissus-induced foodborne illness

Chie NOMURA, Mizuka YAMAGUCHI and Masanao SHINYA

Narcissus is a non-consumable flora that originated along the Mediterranean coastline. They are mistakenly ingested sporadically, leading to instances of foodborne illness in Japan, as they resemble edible tubers, such as satoimo (*Colocasea esculenta*). In August 2022, a food poisoning incident occurred in Osaka Prefecture due to the consumption of *Narcissus* roots. Using liquid chromatography-mass spectrometry analysis, the culpable compound that caused poisoning, lycorine and galantamine, were detected in the sample. *Narcissus* species identification was subsequently confirmed via DNA sequencing.

Key words : narcissus, lycorine, LC-MS, sequencing

食品中の甘味料分析における荷電化粒子検出器の適用

新矢将尚, 山口之彦

食品中の甘味料 10 成分について、荷電化粒子検出器を接続した HPLC により一斉分析する方法を開発した。本法において、紫外吸収をもたないスクラロースやサイクラミン酸は、誘導体化等の前処理操作を行わなくても他成分と同等の感度で分析できた。さらに、固相抽出を併用することで、全成分について UV 検出器を用いる通知法と同レベルの分析が可能であった。市販の 3 種類の食品へ添加回収試験を行った結果、各成分の平均回収率は 76~119%、変動係数は 0.2~8.6%であった。本法における定量下限は、スクラロースなど 8 成分で 0.005 g/kg、アドバンテームとネオテームが 0.001 g/kg であった。

キーワード：甘味料、HPLC、荷電化粒子検出器、固相抽出

甘味料とは、食品に甘みをつけるために使用される食品添加物である。ほぼノンカロリーで砂糖の数百~数万倍の甘味を呈する高甘味度甘味料は、近年多くの食品に使用されており、また砂糖の甘味に近づけるために複数の甘味料を併用している場合が多い。

厚生労働省通知では、食品中の甘味料分析法はほぼ個別に定められており、甘味料分析の効率化を図るためには簡便な一斉分析法の開発が求められる。著者らは LC-MS/MS を使用した甘味料の一斉分析法¹⁾を開発したが、スクラロースの感度は他の甘味料に比べて低く、一斉分析には濃縮または希釈による多段階の濃度設定が必要となり、その改善が課題となっている。

スクラロースは紫外吸収をもたないため、HPLC 分析ではダイオードアレイ検出器 (DAD) が使用できず、分析種の化学的性質によらずに検出可能な示差屈折率検出器 (RID) が用いられる²⁾。RID は一般に糖類の分析に使用されている³⁾が、他の検出器に比べて感度が低いことや、グラジエント分析を適用できないことが欠点である。その短所が改善された検出器に蒸発光散乱検出器 (ELSD) があり、糖類・甘味料分析に適用される⁴⁾一方で、近年はさらに感度の高い荷電化粒子検出器 (CAD)⁵⁾が開発されている。CAD は、HPLC カラムからの溶出物質を噴霧した後、液相を蒸発さ

せて形成する中性粒子を荷電化し、その電荷量を計測するものである⁶⁾。そのため分析種の化学構造に依存せず、不揮発性・半揮発性の物質をもれなく検出でき、RID よりおおむね 100 倍感度が高いという利点があり、糖類など食品成分分析への適用が期待される。しかし国内での報告例は少なく、食品中の糖類^{7,8)}、17 β エストラジオール試薬中の微量成分⁹⁾や、フタル酸エステル類の分析¹⁰⁾などに限られている。

本稿では、前報¹⁾と同じく指定甘味料のアセシルファムカリウム (AK)、サッカリンおよびその塩類 (SA)、スクラロース (SU)、アスパルテーム (APM)、ネオテーム (NEM)、アドバンテーム (ADM)、指定外甘味料のサイクラミン酸およびその塩類 (CY)、アリテーム (AL)、ズルチン (DU)、およびアスパルテームの分解物であるジケトピペラジン (DKP) の併せて 10 成分を対象とし、CAD を用いた HPLC による食品中甘味料の一斉分析法について検討したので報告する。

実 験 方 法

1. 試料

大阪市内で市販された清涼飲料水、キャンデーおよび漬物 (酢漬) を使用した。

2. 試薬・器材

試薬・器材は前報¹⁾と同じものを用いた。固相抽出カートリッジはジーエルサイエンス(株)製 InertSep HLB FF (500 mg / 6 mL) を使用した。

3. 装置および測定条件

HPLC : Agilent 1290

検出器 : Thermo Fisher Scientific, Corona Veo RS
窒素ガス圧: 60.9 psi (= 420 kPa), エバポレーションチューブ温度: 35°C

カラム : L-Column2 ODS, 4.6×150 mm (3 μm)

移動相 : A: 0.01 mol/L-ギ酸緩衝液(pH 4.0) /

B: アセトニトリル

A/B: 90/10 (0 min) → 80/20 (15 min) →
50/50 (22-28 min) → 90/10 (28-35 min)

カラム温度 : 40°C

流速 : 0.5 mL/min

注入量 : 20 μL (水 30 μL ずつで挟み込む共注入法)

4. 試験操作

操作の概要を図1に示す。すなわち、粉碎して均一化した食品試料 10 g を秤り採り、透析内液 50 mL とともに 30 cm の長さで切った透析膜内へ封入したものを、メスシリンダーに入れ透析外液で全量が 200 mL になるよう定容した。メスシリンダーの上端をシリコン栓等で蓋をし、振り混ぜながら 24 時間透析した。次に、透析終了後の外液 20 mL を、予めメタノール 5 mL と精製水 5 mL でコンディショニングした HLB 固相カートリッジに負荷させ、精製水 5 mL で洗浄ののち、85%メタノール (メタノール : 精製水 = 85 : 15 の比率で混合したもの) 5 mL で溶出した。溶出液を 0.45 μm メンブレンフィルタでろ過したのち、分析に供した。

5. 添加回収試験

清涼飲料水、キャンデーおよび酢漬について、定量下限の 2 倍 (低濃度) および使用基準の半分 (高濃度) になるように添加した。使用基準が定められていない甘味料については、高濃度添加量は低濃度の 10 倍とした。いずれの甘味料も試料ごとに 5 回試験して回収率を求めた。

結果 および 考察

1. 定量下限と検量線

CAD の検出感度は ng オーダーである⁹⁾が、今回検討した測定条件において変動係数が 10%未滿と

試料 10 g

透析 (室温, 24 h)

内液 : 2.5%NaCl in 0.01 mol/L HCl (50 mL)

外液 : 0.01 mol/L HCl で 200 mL に定容

透析外液 20 mL を HLB 固相カラムへ負荷

洗浄 精製水 5 mL

溶出 85% MeOH 5 mL

HPLC-CAD 測定

図1 分析方法の概要

なったのは、ADM と NEM を除いた 8 成分では 1 μg/mL 以上の濃度であった。紫外吸収をもたない SU と CY は、他成分と同等の感度で測定できた。ADM と NEM はグラジエント分析でアセトニトリルの比率が高い状態で溶出し、エアロゾルの表面張力が小さく感度が高くなる⁹⁾ため、0.2 μg/mL 以上の濃度で精度良く測定できた。CAD の検量線は図2に示すように曲線を示すが、CAD の応答曲線は原理的にべき関数で表される⁹⁾ため、両対数で検量線を引くと、ADM と NEM を除いて 1~70 μg/mL、ADM と NEM は 0.2~14 μg/mL の範囲で相関係数 0.999 以上の良好な直線性が得られた。定量下限は、固相抽出による濃縮を含む図1の操作により ADM と NEM を除いて 0.005 g/kg、ADM と NEM は 0.001 g/kg と算出され、HPLC による通知法や文献¹¹⁾の定量下限を満足していた。

2. HPLC 条件の検討

CAD の特性として、化学構造を問わず不揮発性・半揮発性物質をもれなく検出できることが挙げられるが、移動相には揮発性の塩類を用いる必要があり、ギ酸または酢酸とそのアンモニウム塩が推奨されている⁹⁾。本法では分析カラムに汎用的な逆相の ODS カラムを使用し、分離条件を検討して移動相にはギ酸緩衝液とアセトニトリルを選択した。

グラジエント条件を検討するにあたり、加工食品で甘味料と同時に使用されることの多い保存料と保持時間が重ならないよう、DAD を併用して条件設定を行った。実験方法の3. で示した LC 条件で、図3に示すように甘味料と保存料の安息香酸、ソル

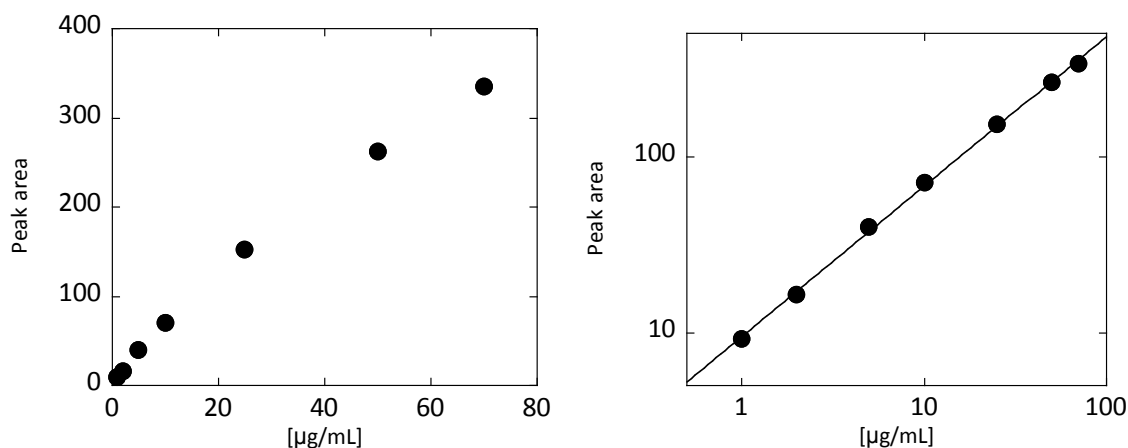


図2 スクラロースの検量線 (左：線形, 右：両対数)

ビン酸、デヒドロ酢酸は良好に分離できていることをDADでは確認されたが、これらの保存料はいずれも揮発性を有するため、CADでは検出されなかった。つまり、CADによる甘味料分析時には保存料の影響は無視できるが、保存料の分析にはCADを適用できないことが分かった。

CADの定性情報は保持時間しかないので、DADを併用して紫外吸収スペクトルも確認することが望ましい。しかし、一般に紫外吸収スペクトルは紫外透過性の高いリン酸緩衝液のものが参照されるが、CADでは不揮発性のリン酸塩を移動相に使用できず、ギ酸緩衝液(酢酸でも同様)では常にカルボン酸の吸収が起こるため、その影響で図4に示すように200~210 nmの吸収スペクトルが著しく変

わることに注意する必要がある。

前処理条件の検討内容については前報1)で詳述しているが、HLBカラムから甘味料を溶出させる際に、85%メタノール溶液を使用している。HLBカラムのメーカーや種類によっては、溶出時にブリードが起こってクロマトグラムの広範囲にわたって妨害する場合があったので、注意が必要である。また、測定液をHPLCへそのまま注入すると、測定液の溶媒比率(85%)は移動相の初期有機溶媒比率(10%)よりはるかに高いことから、注入後に測定液が移動相に拡散して理論段数が低下し、ピークが崩れてブロードになることが確認された。これに対しては、試料を水で挟み込んで共注入することで、ピーク形状は改善された。

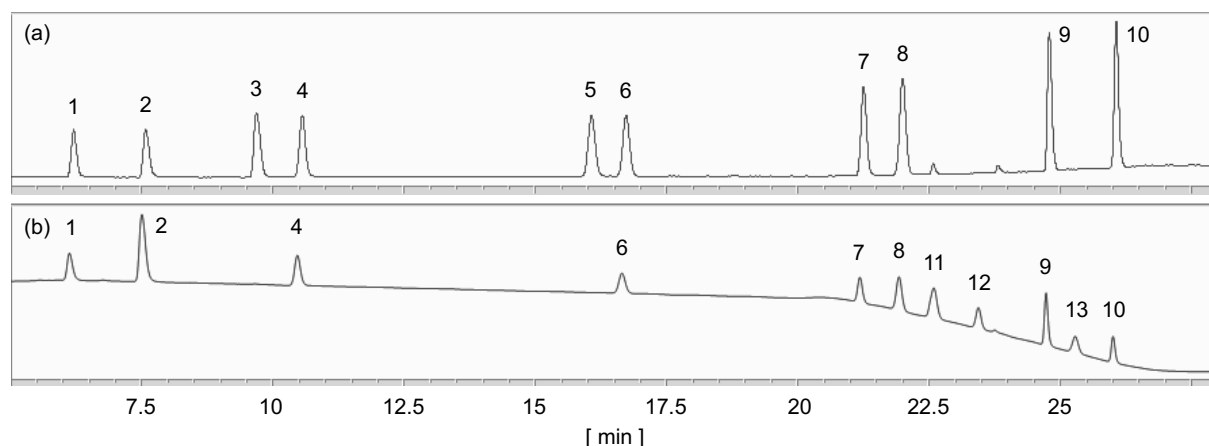


図3 標準溶液のクロマトグラム (検出器：(a) CAD, (b) DAD (210 nm)).

1 : AK, 2 : SA, 3 : CY, 4 : DKP, 5 : SU, 6 : APM, 7 : AL, 8 : DU, 9 : ADM, 10 : NEM,
11 : 安息香酸, 12 : ソルビン酸, 13 : デヒドロ酢酸.

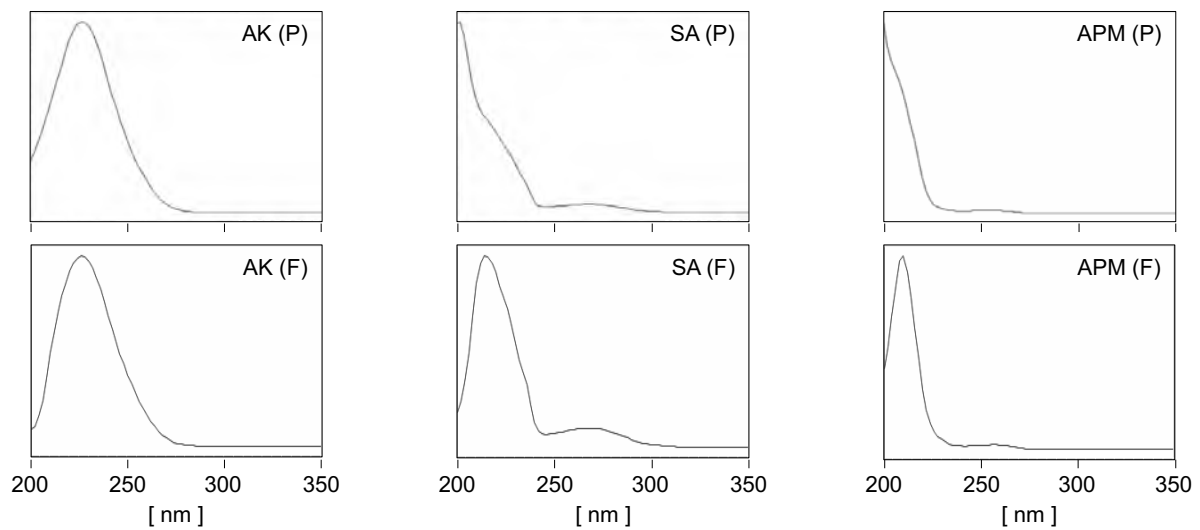


図4 リン酸緩衝液(P)およびギ酸緩衝液(F)を移動相に用いたときのAK, SA, APMの紫外吸収スペクトル

3. 添加回収試験

各甘味料について、低濃度添加条件ではそれぞれの食品に定量下限の2倍となるよう添加した。高濃度添加条件においては、清涼飲料水、キャンデー(菓子)、漬物(酢漬)の使用基準は、AKがそれぞれ0.50、2.5、1.0 g/kg、SAがそれぞれ0.30、0.10、2.0 g/kg、SUがそれぞれ0.40、1.8、0.58 g/kgであり、それらの半分量になるよう添加した。その他の甘味料は低濃度条件の10倍、すなわちADMとNEMを除いた8成分で0.10 g/kg、ADMとNEMは0.02 g/kgになるよう添加した。これら二段階の濃度条件で添加回収試験を行った。

清涼飲料水に甘味料を添加したときのクロマト

グラムを図5に示す。低濃度、高濃度とも分離は良好であり、夾雑成分の影響も確認されなかった。キャンデー試料の場合も同様の結果であった。

漬物(酢漬)に甘味料を添加したときのクロマトグラムを図6に示す。低濃度では随所に夾雑成分のピークが検出され、特にALとDUへの影響は大きく見受けられたが、回収率は許容範囲内にあった。高濃度では夾雑成分の影響は小さく、分析には問題なかったと考えられた。CADにおいては、不揮発性・半揮発性のほかに分析成分による選択性はないため、特に低濃度分析時の夾雑成分の影響を確認しておく必要がある。

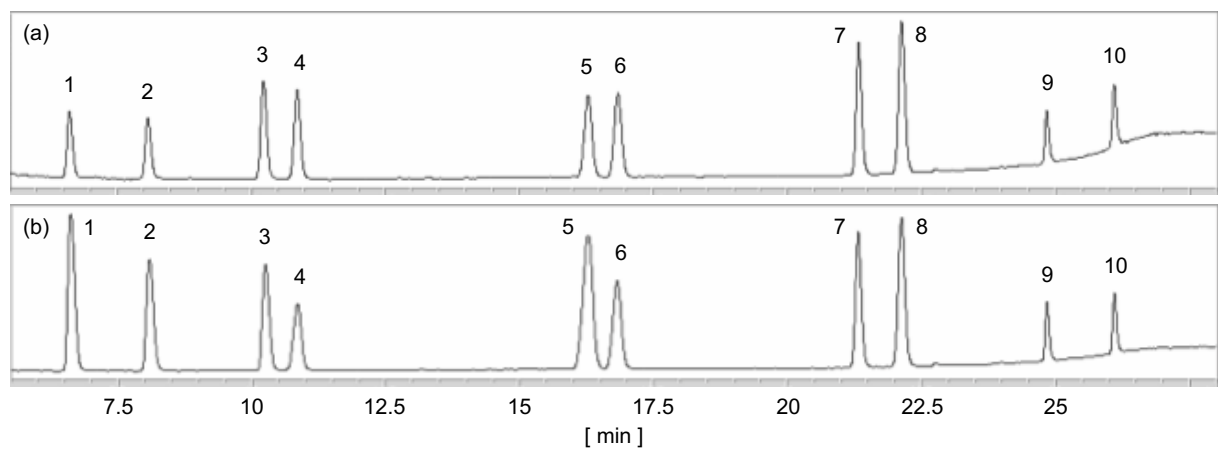


図5 清涼飲料水試料のクロマトグラム ((a) 低濃度添加, (b) 高濃度添加)。

1 : AK, 2 : SA, 3 : CY, 4 : DKP, 5 : SU, 6 : APM, 7 : AL, 8 : DU, 9 : ADM, 10 : NEM.

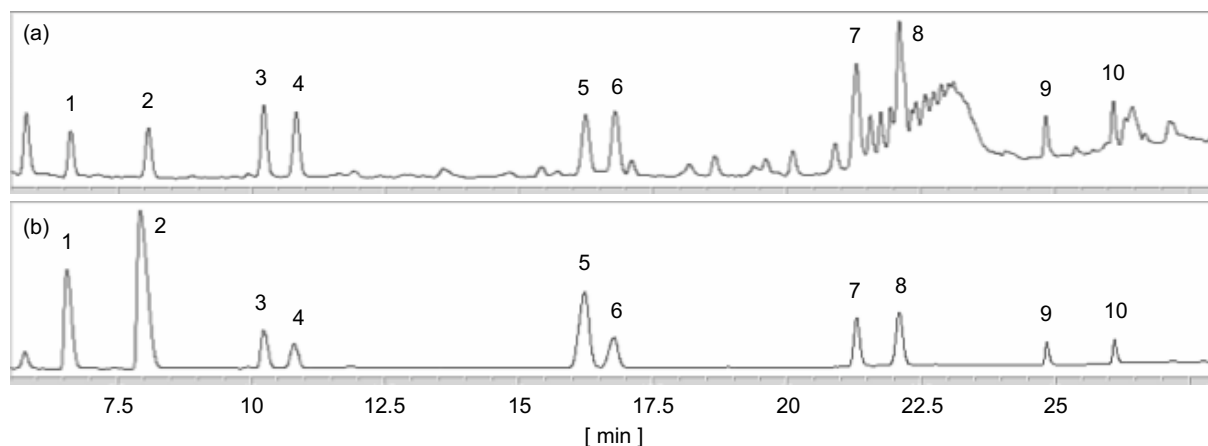


図6 漬物試料のクロマトグラム (a) 低濃度添加, (b) 高濃度添加.

1 : AK, 2 : SA, 3 : CY, 4 : DKP, 5 : SU, 6 : APM, 7 : AL, 8 : DU, 9 : ADM, 10 : NEM.

表1 添加回収試験結果

Sweetener	Softdrink			Candy			Pickles		
	Spiked level (g/kg)	Recovery (%)	CV (%)	Spiked level (g/kg)	Recovery (%)	CV (%)	Spiked level (g/kg)	Recovery (%)	CV (%)
AK	0.01	91 ± 1.6	1.8	0.01	81 ± 1.7	2.1	0.01	82 ± 2.6	3.2
	0.25	97 ± 2.1	2.2	1.25	93 ± 0.7	0.7	0.50	99 ± 1.8	1.8
SA	0.01	79 ± 6.8	8.6	0.01	76 ± 4.9	6.5	0.01	82 ± 2.7	3.4
	0.15	102 ± 1.5	1.5	0.05	84 ± 1.5	1.8	1.0	102 ± 1.7	1.6
SU	0.01	97 ± 1.2	1.2	0.01	97 ± 1.3	1.3	0.01	88 ± 1.2	1.3
	0.20	110 ± 1.8	1.7	0.90	108 ± 1.9	1.8	0.29	118 ± 1.7	1.5
APM	0.01	107 ± 2.6	2.4	0.01	107 ± 1.1	1.0	0.01	97 ± 1.5	1.5
	0.10	111 ± 1.2	1.1	0.10	117 ± 1.7	1.5	0.10	119 ± 2.5	2.1
NEM	0.002	104 ± 2.8	2.7	0.002	100 ± 1.6	1.6	0.002	87 ± 1.5	1.8
	0.02	88 ± 1.8	2.0	0.02	100 ± 4.1	4.1	0.02	98 ± 1.9	1.9
ADM	0.002	97 ± 2.9	3.0	0.002	97 ± 1.6	1.6	0.002	105 ± 2.2	2.1
	0.02	95 ± 2.4	2.5	0.02	104 ± 3.6	3.4	0.02	107 ± 2.7	2.5
CY	0.01	96 ± 1.7	1.8	0.01	92 ± 1.2	1.3	0.01	90 ± 2.3	2.6
	0.10	98 ± 2.2	2.3	0.10	98 ± 1.5	1.5	0.10	100 ± 1.6	1.6
AL	0.01	100 ± 1.1	1.1	0.01	99 ± 2.0	2.0	0.01	118 ± 2.9	2.4
	0.10	101 ± 2.1	2.1	0.10	106 ± 1.8	1.7	0.10	107 ± 2.2	2.1
DU	0.01	102 ± 1.7	1.7	0.01	102 ± 0.7	0.7	0.01	88 ± 0.6	0.7
	0.10	98 ± 0.9	1.0	0.10	101 ± 0.2	0.2	0.10	102 ± 2.5	2.4
DKP	0.01	97 ± 1.5	1.6	0.01	94 ± 1.6	1.7	0.01	98 ± 3.5	3.6
	0.10	79 ± 1.0	1.3	0.10	77 ± 1.2	1.6	0.10	80 ± 1.3	1.6

Recovery: Mean ± S.D. (n=5), CV: Coefficient of Variation

添加回収試験の結果一覧を表1に示す。全ての食品において、いずれの成分も回収率は低濃度で76~118%、高濃度で77~119%の間にあり、変動係数は低濃度で0.7~8.6%、高濃度で0.2~4.1%であった。本結果は精度管理の一般ガイドライン(回収率

70~120%)を満たしており、ばらつきも小さかった(変動係数<10%)ため、本法の有効性が示された。なお、本法では固相抽出による濃縮操作を行っているため、高濃度条件では検量線の範囲に入るよう適宜希釈してHPLC測定を行ったが、固相抽出

を用いずに透析外液を測定しても上記の分析精度を満たしていた。AK、SA、SU、APMの陽性試料では一般に高濃度で含まれるため、その場合は固相抽出による濃縮操作を行わずに測定しても、一斉分析が可能であると考えられる。

ま と め

食品中の甘味料分析において、CADを用いたHPLCにより、紫外吸収をもたないスクラロースやサイクラミン酸を含めた10成分の一斉分析法を開発した。市販の3種類の食品への添加回収試験の結果は、10成分いずれも平均回収率が70~120%の範囲内にあり、変動係数は10%未満であった。本法における定量下限は、AK、SA、SU、APM、CY、AL、DU、DKPが0.005 g/kg、ADMとNEMが0.001 g/kgであった。

利 益 相 反

開示すべき利益相反はない。

文 献

- 1) 新矢将尚, 寺谷清香, 山口之彦. 透析-固相抽出-LC-MS/MS法による食品中の人工甘味料の一斉分析. *大阪健康安全基盤研究所研究年報* 2020; **4**: 61-69.
- 2) 厚生労働省医薬・生活衛生局食品基準審査課長・食品監視安全課長通知. 「食品中の食品添加物分析法」の改正について(別添1). 令和5年5月29日薬生食基発0529第1号・薬生食監発0529第1号.
- 3) 消費者庁ホームページ. 食品表示基準 別添 栄養成分等の分析方法等.
https://www.caa.go.jp/policies/policy/food_labeling/food_labeling_act/assets/food_labeling_cms201_220_830_03.pdf.

- 4) 寺田英敏, 山部恵子, 山口忠行, 三上元重, 三上博久. HPLC 蒸発光散乱検出器の食品分析への応用. *島津評論* 2008; **65**: 83-92.
- 5) 松沼孝行. 荷電化粒子検出器. *ぶんせき* 2018; **2018(8)**: 317-323.
- 6) 福島景子, 橋口九州男, 鈴木隆弘, 大河原正光, 関口陽子. 荷電化粒子検出器 CoronaCAD の技術と応用. *CHROMATOGRAPHY* 2011; **32**: 161-170.
- 7) 田村昌義, 高橋亜友巳, 宇山敦生, 望月直樹. 荷電化粒子検出器を用いた高速液体クロマトグラフィーによる飲料中の糖類一斉分析法の開発. *分析化学* 2010; **59**: 239-245.
- 8) 三好美玖, 藤井玲子, 木村功. 食品に含まれる希少糖類の分析. *香川県産業技術センター研究報告* 2018; **18**: 4-5.
- 9) 山崎太一, 井原俊英, 中村哲枝, 加藤健次. 荷電化粒子検出器を用いた高速液体クロマトグラフィーによる17β-エストラジオール試薬中の微量成分の定量. *分析化学* 2010; **59**: 219-224.
- 10) 松山重倫, 衣笠晋一, 大谷肇. 荷電化粒子検出器を用いるフタル酸エステル類のHPLC分析. *分析化学* 2014; **63**: 817-823.
- 11) 北野文理, 富岡華代, 北田善三. HPLCおよびLC/MSによる食品中のジペプチド型甘味料の同時分析. *日本食品化学学会誌* 2014; **21**: 115-120.
- 12) 中村洋監修. 液クロを上手に使うコツ. 丸善; 2004. 27.
- 13) 島津製作所ホームページ. 試料溶媒がピーク形状に与える影響.
<https://www.an.shimadzu.co.jp/service-support/technical-support/analysis-basics/hplc/faq/tips2/lctalk-39intro/index.html>

WEBサイトの内容は2023年7月19日に確認した。

Simultaneous analysis of sweeteners in foods using HPLC with charged aerosol detector

Masanao SHINYA and Yukihiro YAMAGUCHI

A method for the simultaneous determination of 10 sweeteners (acesulfame K, AK; saccharin Na, SA; sucralose, SU; aspartame, APM; neotame, NEM; advantame, ADM; sodium cyclamate, CY; alitame, AL; dulcin, DU; diketopiperazine, DKP) in various foods by liquid chromatography with a charged aerosol detector (CAD) was developed. In the method using CAD, SU and CY, which have no ultraviolet (UV) absorption, could be analyzed with the same sensitivity as other sweeteners without pretreatment such as derivatization. Furthermore, combined application of the solid-phase extraction enabled analysis of all target components at the same level as the official method using a UV detector in HPLC. The mean recoveries from three types of foods were 76–119%, and their relative standard deviations were 0.2–8.6%. Quantification limits of AK, SA, SU, APM, CY, AL, DU and DKP were 0.005 g/kg, and the limits of NEM and ADM were 0.001 g/kg.

Key words : sweetener, HPLC, charged aerosol detector, solid-phase extraction

水質検査における外部精度管理 (2021 年度)

—六価クロム化合物—

安達史恵, 吉田 仁

水道水質検査精度の向上を図ることを目的に、水質検査を実施している大阪府水道事業者、保健所及び公的研究機関を対象に、六価クロム化合物を添加した精度管理用試料を配付し、各機関が水道水質検査法に従って測定した検査結果を回収した。各機関の検査値を解析した結果、24 検査値中 1 検査値が真値に対する誤差率及び z スコアの許容範囲を超過した。この機関を対象に定量精度に関するフォローアップ調査を行ったところ、分析機器の安定化前に測定を開始したことが定量値に影響を及ぼしたことが示唆された。

キーワード：水道水、六価クロム化合物、水道水質検査、定量精度、外部精度管理

(地独) 大阪健康安全基盤研究所では、大阪府健康医療部生活衛生室環境衛生課と協力して、水道水質検査精度の向上を図ることを目的に、水質検査を実施している大阪府内水道事業者、保健所及び公的研究機関 (以下、水道事業者等) を対象に外部精度管理を実施している¹⁾。

2021 年度の対象項目は、無機項目として「六価クロム化合物」を選定した。クロムは耐食性に富み、耐熱性、耐摩耗性が高く、ニクロムやステンレス等の合金の原料として利用されるほか、クロムめっき、電池、顔料、皮なめし、窯業製品の釉薬、木材の防腐剤等に用いられている²⁾。環境中に存在するクロムは低濃度であり、その原子価はほとんど三価に限られ、六価クロムが存在している場合は人為起源と考えられる³⁾。

ヒトにおいて、クロムは微量必須元素であり、不足するとグルコース、脂質、タンパク質代謝系に障害が生じる⁴⁾。一方、六価クロムは強い酸化力を持つ不安定な物質であり、有機物を容易に酸化し、自身は三価クロムとなる。その強い酸化力により、皮膚に付着した状態で放置すると、皮膚炎や腫瘍の原因となる。また、DNA への損傷作用を持つため、六価クロムの発がん性は IARC (国際がん研究機関) において、グループ 1 (ヒトに対して発がん性を示

す) に分類されている⁵⁾。

水道においてこれまでに大きな事故はないが、過去に地下水水源や家庭用井戸等が六価クロムに汚染された事例が報告されている⁶⁾。

クロムの水質基準は 1950 年に六価クロム化合物として、0.05 mg/L と定められ、水道法施行後は総クロムとして評価されていたが、その後六価クロム化合物となり、基準は 0.05 mg/L であった。しかし、2020 年に食品健康影響評価に基づき、基準値が強化され「0.02 mg/L 以下であること」となった⁷⁾。これに伴い、六価クロム化合物の検査方法として、「フレイム原子吸光光度計による一斉分析法」が廃止された。水質基準が改正されたこと及び前回の大阪府の外部精度管理から 10 年以上経過したため、今回の対象項目とした。

方 法

1. 参加機関

本研究に参加した水道事業者等は 24 機関であった。その内訳は水道事業者 22 機関、保健所 1 機関及び公的研究機関 1 機関であった。

2. 実施方法

(1) 精度管理用試料の調製方法

2021年9月24日に精製水約50Lをポリタンクに採水した。硝酸(1.42)(関東化学、Ultrapur™-100)を濃度が1%となるよう添加後、クロム標準液(富士フイルム和光純薬 1000 mg/L、ロット番号 KCN1033)を1000倍希釈した溶液を400 mL添加し、よく攪拌した。1Lのポリエチレン製容器に分注して冷蔵保存し、9月29日に(地独)大阪健康安全基盤研究所上水試験室において各検査実施機関に配付した。なお、精製水中の六価クロム化合物は0.001 mg/L未満であった。

(2) 検査方法及び報告方法

検査方法は「水質基準に関する省令の規定に基づき厚生労働大臣が定める方法」(以下、告示法)のフレームレス原子吸光光度計による一斉分析法(以下、FLAA法)、誘導結合プラズマ発光分光分析装置による一斉分析法(以下、ICP-AES法)、誘導結合プラズマ質量分析装置による一斉分析法(以下、ICP-MS法)とした⁸⁾。精度管理用試料(以下、試料)については前処理を含めて5回の測定を行い、測定結果を有効数字3桁で「外部精度管理結果報告書」に記入し、5つの測定結果の平均値を検査値とした。また、各検査機関が実施した分析法の分析条件等を「外部精度管理結果報告書」に記入し、検査に使用した機器のデータやチャート等と合わせて提出することとした。各検査実施機関から送付された「外部精度管理結果報告書」を取りまとめた後、検査結果及び検査方法等に関する評価を実施した。そして、「外れ値」に該当した機関に対してフォローアップ調査を実施した。

(3) 評価の検証方法

はじめに、各機関内で測定された試料の5つの測定値の変動係数が10%を超過した機関は評価対象外とした。

検査結果は「真値」に対する誤差率及びzスコアで評価を行い、両方の評価方法において許容範囲を超過した検査値を「外れ値」とした。

「真値」は、各機関からの検査値を用いて、有意水準を5%としてGrubbsの棄却検定⁹⁾を行い、棄却された検査値を除いた検査値から平均を求め、これを「真値」とした。誤差率は、(1)の式から算出し、±10%以内を許容範囲とした。zスコアは四分位数法¹⁰⁾で算出し、zスコアの絶対値3未満を許容範囲とした。

$$\text{誤差率}(\%) = \frac{(\text{各機関の検査値} - \text{「真値」})}{\text{「真値」}} \times 100 \quad (1)$$

変動係数及び誤差率の許容範囲を10%とした根拠は、水質基準項目の測定精度における六価クロム化合物の変動係数の目標が10%であるためである¹¹⁾。またzスコアの評価基準として絶対値3以上が「不満足」であることから¹²⁾、3未満を許容範囲とした。なお、変動係数、誤差率及びzスコアについては、検査値を計算過程で丸めずに算出した。

結果 および 考察

1. 試料の均一性及び安定性

試料の均一性を確認するため、試料を分注順に等間隔で5本抜き取り、試料1本につき2回測定した。得られた測定結果を基に一元配置分散分析を行った。その結果、p値は0.11で試料間の変動は有意とならず、均一性に問題がないことが確認された。また、配付日、配付後1、5、7、15日目に、試料1本につき5回測定した結果を図1に示した。測定日ごとの平均値の変動係数は0.45%となり、試料の安定性に問題はないと判断した。

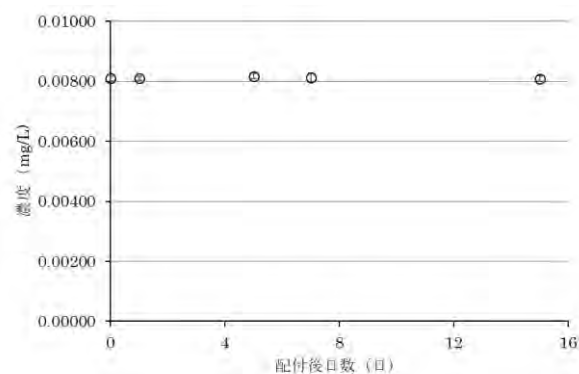


図1 試料の安定性 (n=5、平均±標準偏差)

2. 分析方法

FLAA法、ICP-AES法及びICP-MS法を用いた機関はそれぞれ1機関、1機関及び22機関であった。

3. 検査結果の検証

(1) 誤差率、zスコア及び「外れ値」

水道事業者等24機関から報告された各検査値、変動係数、誤差率及びzスコアを表1に、検査値のヒストグラムを図2に示した。

表1 検査値の概要

機関番号	検査方法	検査値 (平均値) (mg/L)	変動係数 (%)	真値に対する 誤差率 (%)	zスコア
A-1*	ICP-MS	0.00724	3.92	-13.20	-5.53
A-2	ICP-AES	0.00800	0.79	-4.08	-1.57
A-3	ICP-MS	0.00803	1.33	-3.75	-1.43
A-4	ICP-MS	0.00804	0.87	-3.53	-1.33
A-5	ICP-MS	0.00807	1.59	-3.22	-1.20
A-6	ICP-MS	0.00813	0.66	-2.48	-0.88
A-7	ICP-MS	0.00815	1.84	-2.24	-0.77
A-8	ICP-MS	0.00817	1.30	-2.00	-0.67
A-9	ICP-MS	0.00825	0.69	-1.06	-0.26
A-10	FLAA	0.00825	1.33	-1.01	-0.24
A-11	ICP-MS	0.00827	0.30	-0.80	-0.15
A-12	ICP-MS	0.00827	0.36	-0.77	-0.14
A-13	ICP-MS	0.00833	0.18	-0.15	0.14
A-14	ICP-MS	0.00833	1.09	-0.10	0.16
A-15	ICP-MS	0.00833	1.15	-0.10	0.16
A-16	ICP-MS	0.00833	0.37	-0.06	0.18
A-17	ICP-MS	0.00835	1.35	0.11	0.25
A-18	ICP-MS	0.00837	0.65	0.35	0.35
A-19	ICP-MS	0.00852	1.02	2.18	1.15
A-20	ICP-MS	0.00853	1.44	2.34	1.22
A-21	ICP-MS	0.00863	0.66	3.45	1.70
A-22	ICP-MS	0.00876	0.75	5.08	2.41
A-23	ICP-MS	0.00881	0.59	5.68	2.67
A-24	ICP-MS	0.00885	0.96	6.18	2.89
平均値		0.00829			
最大値		0.00885			
最小値		0.00724			
標準偏差		0.00033			
変動係数(%)		4.0			
n		24			

真値：0.00834 mg/L

*：真値に対する誤差率が±10%を超え、zスコアの絶対値が3以上の機関（外れ値）

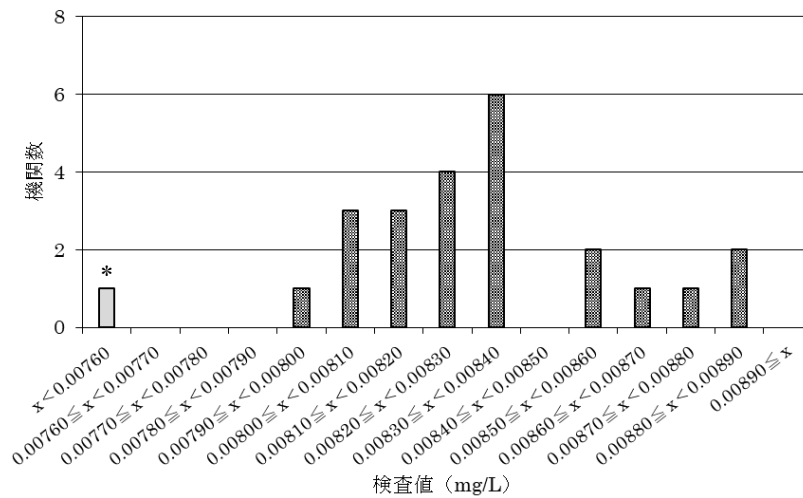


図2 検査値の度数分布図 (*外れ値)

機関内変動係数が 10%を超過した検査値は存在しなかったため(表 1)、すべての検査値を評価対象とした。検査値を有意水準 5%で Grubbs の棄却検定を行った結果、1 機関 (A-1) が棄却されたため、23 検査値を平均した 0.00834 mg/L を「真値」とした。「真値」に対する誤差率の許容範囲を越えたのは 1 機関 (A-1) であった。次に、 z スコアを求めた結果、 z スコアの範囲は-5.53~2.89 となり、許容範囲を超えたのは 1 機関 (A-1) であった。

したがって、誤差率及び z スコアの両方の許容範囲を超えた「外れ値」に該当する機関は 1 機関で、全体の 4.2% (1/24) となった。

(2) フォローアップ調査

「外れ値」となった 1 機関 (A-1) に対して原因究明のフォローアップを行った。機関 A-1 は、検査値は 0.00724 mg/L、「真値」に対する誤差率は-13.20%、 z スコアは-5.53 であった。提出された資料から、内部標準物質であるガリウムのカウント数が検量線用標準溶液の測定順に徐々に大きくなり(最小値 11316、最大値 18070、変動係数 16.9%)、その後、試料測定時には安定していたことが判明した(最小値 20012、最大値 22100、変動係数 4.2%)。当該機関の ICP-MS における測定では、内部標準物質は複数の元素を混合溶液として、ペリスタリックポンプで導入している。前述の現象は、内部標準物質であるインジウムでも見られたが、その他の元素(コバルト、イットリウム、タリウム)は安定していた(変動係数 0.2~2.2%)。したがって、ガリウムのカウント数の変動は内部標準溶液の導入部の異常によるものとは考えにくかった。次に、ICP-MS の測定においては、内部標準物質は分析元素と質量数が近く、プラズマ中で同様の挙動を示す元素を選択する。そこで、測定元素であるクロムのカウント数を確認したが、ガリウムと同様の挙動は示していなかった。また絶対検量線を作成し、再計算したところ、0.00767 mg/L となり、外れ値に該当しなかった。したがって、クロムのカウント数は問題ないと考えられた。検査担当者への聞き取りにおいて、外部精度管理以降のメーカーによるメンテナンス実施後は、上記のような一部の内部標準物質のみ変動する現象は確認されていないとのことであった。

そこで、試料を再測定したところ、検査値は 0.00822 mg/L ($n=5$) で、精度管理実施時の真値 (0.00834 mg/L) に対する誤差率は-1.44%と良好な

値となった。また、ガリウムのカウント数は標準溶液においては平均値 33969、変動係数 2.1%、試料においては、平均値 33763、変動係数 0.5%と安定した値であった。

以上により、機関 A-1 における外れ値の原因として、標準溶液の測定時において、内部標準物質であるガリウムの質量電荷比 71 でのカウント数が何らかの原因により安定しておらず、その値を用いて検量線を作成し、定量したことによるものと考えられた。分析機器については、自らあるいはメーカーによる保守点検等を行い、その性能が維持されていることを定期的に確認することが必要である。また、測定前及び測定時に内部標準物質のカウント数が安定しているかを確認する、試料測定後に任意の標準溶液を測定し、変動していないか確認する等も、今回のような異常を検出するには有用であると考えられた。

(3) 全体的な留意点

① 検量線及び空試験

告示法では別表に記載された濃度範囲内でブランク試料を含めない 4 段階以上の標準液を用いて検量線を作成するように記載されている⁸⁾。今回参加したすべての機関は検量点を 4 点以上用いて検量線を作成していた。告示及び妥当性評価ガイドラインにおいては原則、検量線の点に 0 mg/L を用いないこととなっているが^{8,13)}、機関 A-7 では検量線の点に 0 mg/L を用いていた。また、すべての機関は 1 次式を用いて検量線を算出しており、原点強制通過を行った機関は存在せず、決定係数 (R^2) の範囲は 0.9980~1.0000 であった。

告示法では金属類の一斉分析においては、元素ごとの濃度範囲が提示され、検量線はその範囲を超えてはならないとしている。FLAA 法、ICP-AES 法及び ICP-MS 法の六価クロム化合物の濃度範囲はそれぞれ 0.001~0.1 mg/L、0.001~0.1 mg/L 及び 0.0002~0.1 mg/L で、いずれの方法も上限は 0.1 mg/L であり、この値を超過している機関が 1 機関 (A-1) であった。機関 A-1 においては検量線の濃度範囲が 0.0002~0.2 mg/L で、最低濃度と最高濃度の濃度差が 1000 倍であった。また、公比も 5~10 倍と妥当性評価ガイドライン¹³⁾が推奨する原則 4 倍以内を超過していた。このような場合、重みづけをしなれば、検量線は高濃度側に引き寄せられ、低濃度側の定量精度が悪くなる恐れがある。したがって、検

量線は前述の濃度範囲内で、最低濃度と最高濃度が概ね 100 倍程度までで作成し、広範囲の検量線が必要である場合は、低濃度と高濃度に分けて検量線を作成するのが望ましい。その他の機関では、適切な濃度範囲で検量線の濃度設定が行われていた。また、参加したすべての機関が空試験を実施しており、検量線の下限值以下であることを確認していた。

② 前処理及び標準液

告示法では、FLAA 法、ICP-AES 法、ICP-MS 法のいずれの方法でも酸添加後、加熱をすると規定されているが、加熱を実施していない機関が 1 機関 (A-7、ICP-MS 法) あった。A-7 においては、SOP が未整備の状態であり、加熱に関する記載もなかった。金属類の分析においては、対象とする金属によって、酸による加熱分解を行わないと正確に測定できないため、告示法通りに酸添加後の加熱が必要である。A-7 においては SOP を早急に整備する必要がある。

告示法では、標準原液、標準液または混合標準液は原体から自己調製したもの、もしくは計量法(平成 4 年法律第 51 号) 第 136 条若しくは第 144 条の規定に基づく証明書又はこれらに相当する証明書が添付され、かつ、告示法の標準原液と同濃度のもの又は告示法の標準液若しくは混合標準液と同濃度のものの使用が認められている。なお、告示法の標準液若しくは混合標準液と同濃度のものは開封後速やかに使用することとし、開封後保存したものを使用してはならないとされている⁸⁾。ただし、ICP-AES 法及び ICP-MS 法においては、標準溶液等は冷暗所に保存可能である。今回、すべての機関で認証付きの市販標準原液もしくは混合標準液を使用しており、その開封時期については、すべての機関が 1 年未満であり、検量線作成用標準液は 1 機関を除き、用時調製していた。

③ 妥当性評価

水道水質検査における妥当性評価ガイドラインは、2017 年 10 月に改正され、検量線及び添加試料の評価を行うことが求められている¹³⁾。本調査では機関 A-1 を除くすべての機関で妥当性評価を実施していた。妥当性評価は、検査精度を客観的に評価できる方法であり、検査結果の信頼性に繋がるものであるため、未実施の機関は早急に実施すべきである。

添加試料の評価方法として、4 機関において精製水を用いて評価を行っていた。ガイドラインにおい

ては、添加を行う水の種類として、原則として検査を行う水道水等とし、検査対象物質を含まない水道水等を得ることが困難な場合は精製水等を用いてよいとされている。今回の対象物質は、水道水中の常在成分には該当しないため、可能な限り水道水で行うことが望ましい。

ま と め

2021 年度大阪府水道水質検査外部精度管理として、六価クロム化合物の検査結果を「真値」に対する誤差率 $\pm 10\%$ 以内と Σ スコア ± 3 未満を許容範囲とする 2 つの方法で評価を行った。報告された 24 機関の検査値のうち、変動係数が 10%を超えた機関は存在しなかった。「真値」に対する誤差率 $\pm 10\%$ を超えたのは 1 機関であった。また、 Σ スコア ± 3 以上となったのは 1 機関であった。両方法で許容範囲を超えた検査値を「外れ値」と評価したが、この「外れ値」に該当したのは 1 機関であった。「外れ値」の存在率は、4.2% (1/24) であった。

検証の結果、検査精度を向上するためには、以下の留意点が考えられた。

- (1) 測定時に、データの確認をすること。
- (2) 告示法に基づいた SOP を作成すること。
- (3) 妥当性評価を実施し、SOP の検査精度を確認しておくこと。
- (4) 分析機器については、保守点検等を行いその性能を維持すること。
- (5) 内部精度管理等を定期的に行い、精度の確認を行うこと。

謝 辞

本研究は「令和 3 年度大阪府水道水質検査外部精度管理事業」により実施された。研究実施にあたり協力していただいた大阪府健康医療部生活衛生室環境衛生課の各位に感謝いたします。

利 益 相 反

開示すべき利益相反はない。

文 献

- 1) 小泉義彦. 水質検査における外部精度管理

- (2018年度)ーテトラクロロエチレンおよびトリクロロエチレンー. 大阪健康安全基盤研究所研究年報 2020; 4: 82-92.
- 2) 吉田仁, 中島孝江. 水質検査における外部精度管理 (2018年度)ー鉄及びその化合物ー. 大阪健康安全基盤研究所研究年報 2020; 4: 93-99.
- 3) 吉田仁, 安達史恵. 水質検査における外部精度管理 (2019年度)ーナトリウム及びその化合物ー. 大阪健康安全基盤研究所研究年報 2021; 5: 59-65.
- 4) 安達史恵, 中島孝江. 水質検査における外部精度管理 (2020年度)ーセレン及びその化合物ー. 大阪健康安全基盤研究所研究年報 2022; 6: 112-118.
- 5) 安達史恵, 中島孝江. 水質検査における外部精度管理 (2020年度)ー陰イオン界面活性剤ー. 大阪健康安全基盤研究所研究年報 2022; 6: 119-128.
- 6) 上水試験方法 解説編 2001年版. 日本水道協会; 2001. 381-385.
- 7) 厚生労働省. 「厚生労働省大臣官房生活衛生・食品安全審議官通知、水質基準に関する省令の一部改正等について」(令和2年3月30日付け生食発 0330 第1号)
<https://www.mhlw.go.jp/content/10900000/000615688.pdf>
- 8) 厚生労働省. 「水質基準に関する省令の規定に基づき厚生労働大臣が定める方法」(平成15年7月22日付け厚生労働省告示第261号〔最終改正 令和5年3月24日厚生労働省告示85号〕).
<https://www.mhlw.go.jp/content/10900000/001077084.pdf>
- 9) JIS Z8402-2. 測定方法及び測定結果の精確さ (真度及び精度) -第2部: 標準測定方法の併行精度及び再現精度を求めるための基本的方法. 日本規格協会; 1999. 7-27.
- 10) 藤井賢三. 試験所認定制度における技能試験 (1). 環境と測定技術 2000; 27(2): 51-56.
- 11) 厚生労働省. 「水質基準に関する省令の制定及び水道法施行規則の一部改正等並びに水道水質管理における留意事項について」 水質基準項目の測定精度 (平成15年10月10日健水発第1010001号〔最終改正 令和5年3月31日〕) 厚生労働省健康局水道課長通知 別添5.
<https://www.mhlw.go.jp/content/10900000/001077035.pdf>
- 12) JIS Q 17043:2011 (ISO/IEC 17043:2010) 適合性評価-技能試験に対する一般要求事項. 日本規格協会; 2011. 28-33
- 13) 厚生労働省. 「水道水質検査方法の妥当性評価ガイドラインについて」(平成24年9月6日付け健水発 0906 第1~4号〔最終改正 平成29年10月18日付け薬生水発 1018 第1~4号〕).
https://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-10900000-Kenkoukyoku/0000181618_2.pdf
WEB サイトの内容は2023年6月12日に確認した。

**External quality control for the analytical method for the measurement of chromium (VI) in tap water,
performed in 2021 in Osaka Prefecture**

Fumie ADACHI and Jin YOSHIDA

To improve the accuracy of water quality measurements, we implemented an external quality control for analytical methods for the measurement of chromium (VI) in tap water with water supply utilities, public health centers, and public research institutes in Osaka Prefecture. As a result, one out of 24 examination values was evaluated as an outlier. Therefore, we executed follow-up surveys for this utility. The results showed that the measured values were affected because the measurements were started before the equipment was stabilized.

Key words : tap water, chromium(VI), tap water quality test, quantitative accuracy, external quality control

大阪府における環境および食品中放射能調査（令和4年度報告）

小池真生子, 小泉義彦, 肥塚利江, 大山正幸, 山口進康

令和4年度の原子力規制庁委託により実施した、大阪府における環境および各種食品中放射能調査結果を報告する。調査は、降水中の全ベータ放射能測定、環境試料（降下物、大気浮遊じん、上水、海水、土壌、海底土）および食品試料（タマネギ、キャベツ）中のガンマ線核種分析および空間放射線量率（モニタリングポスト）について実施した。その結果、令和4年度の環境および各種食品中の放射能および放射線のレベルは、過去の値と同様であり、人工放射性物質の環境への新たな放出はなかったことが確認された。

キーワード：環境放射能、全ベータ放射能、ガンマ線核種分析、空間放射線量率

大阪健康安全基盤研究所（当所）では、昭和35年（1960年）度より大阪府における環境および食品中の放射能測定調査を実施している。この調査は、人工放射性降下物および原子力施設等からの放射性物質の漏洩による環境汚染の有無およびそのレベルを明らかにする目的で行っており、原子力規制庁の委託によるものである。

降水については全ベータ放射能測定、その他の環境試料および食品試料についてはガンマ線核種分析〔セシウム134 (^{134}Cs)、セシウム137 (^{137}Cs)、ヨウ素131 (^{131}I)、カリウム40 (^{40}K) 等] を行い、モニタリングポストによる空間放射線量率の調査を行った。

ガンマ線核種分析に関しては、測定値の信頼性確保のため、(公財)日本分析センターとの間で、既知量の放射性核種を添加した試料5検体について、精度管理（標準試料法による分析比較）を行った。

本報告では、令和4年度に実施した上記の放射能調査結果を、過去の測定結果との比較も含め報告する。なお、当所は令和4年12月に北隣に移転した

（以下、移転前を旧研究所、移転後を新研究所と表記）。移転により、定時降水（11/25までは旧研究所、12/9以降は新研究所、2回欠測）、大気浮遊じん（11月までは旧研究所、12月以降は新研究所）、降下物

（11月分は11/25までは旧研究所で採取、12月分は12/9より新研究所で採取）の採取用具および大阪市モニタリングポストの設備は、表1の場所に移大阪健康安全基盤研究所衛生化学部生活環境課

設された。モニタリングポストの移設（地上1mから地上39mの場所）に伴い、原子力規制庁の指示により毎月第2週の水曜日にサーベイメータによる地上1mの高さにおける空間放射線量率調査を開始した。

実 験 方 法

試料の採取、処理および測定は、「環境放射能水準調査委託実施計画書（令和4年度）」¹⁾に基づいて行った。表1に調査項目および試料等を示す。

1. 全ベータ放射能測定

(1) 降水試料

旧研究所本館南側屋上（地上約15m）（移転後：新研究所南館屋上（地上約39m））に設置したデポジットゲージ（表面積1000cm²）で降水を集めた。毎朝9時30分に採取し、100mL（1mm）以上の降水があった場合には100mLを測定試料とした。

(2) 測定方法

蒸発皿に試料100mLとヨウ素担体（1mg I/mL）1mL、0.1mol/L硝酸銀1mLおよび10%硝酸1mLを加えて加熱濃縮させた。濃縮物を直径25mmのステンレス製試料皿に移して蒸発乾固させ、測定用試料とした。測定は低バックグラウンド放射能自動測定装置（日立製作所製LBC450）で行った。比較試料は、酸化ウラン（ U_3O_8 ：日本アイソトープ協会

表 1 放射能調査項目および試料等

調査項目	試料名	種別	採取場所	採取回数等	件数
全ベータ放射能	定時降水	降水	大阪市東成区 旧研究所本館南側屋上 (移転後：新研究所南館屋上)	降水毎	81*
ガンマ線核種分析	大気浮遊じん		大阪市東成区 旧研究所本館北側駐車場 (移転後：新研究所南館屋上)	3ヶ月毎	4
	降下物	雨水・ちり	大阪市東成区 旧研究所本館南側屋上 (移転後：新研究所南館屋上)	毎月	12
	上水	原水	守口市大庭町 大阪府庭窪浄水場	年1回(令和4年6月)	1
		蛇口水	大阪市東成区 旧研究所本館1F	年1回(令和4年6月)	1
	海水	表面水	大阪港入口	年1回(令和4年7月)	1
	海底土	表層	大阪港入口	年1回(令和4年7月)	1
	土壌	0～5cm	大阪市中央区 大阪城公園内	年1回(令和4年7月)	1
		5～20cm	大阪市中央区 大阪城公園内	年1回(令和4年7月)	1
	野菜	タマネギ(生産地)	大阪府泉南郡熊取町	年1回(令和4年6月)	1
		キャベツ(生産地)	大阪府泉南郡熊取町	年1回(令和4年12月)	1
分析比較試料 (標準試料法)	模擬牛乳	(公財) 日本分析センターで調製		年1回(令和4年7月)	1
	模擬土壌	(公財) 日本分析センターで調製		年1回(令和4年8月)	2
	粉末試料	(公財) 日本分析センターで調製		年1回(令和4年8月)	2
空間線量率	モニタリングポスト		大阪市東成区 旧研究所本館北側駐車場 (移転後：新研究所南館屋上)	毎日/年間	365
			茨木市大住町 茨木保健所	毎日/年間	365
			寝屋川市八坂町 寝屋川保健所	毎日/年間	365
			東大阪市西岩田 東大阪市環境衛生検査センター	毎日/年間	365
			富田林市寿町 富田林保健所	毎日/年間	365
			泉佐野市羽倉崎 市立佐野中学校	毎日/年間	365
	モニタリング強化 (福島第1原発事故)	サーベイメータ	大阪市東成区 新研究所南館東北側 アスファルト	毎月(令和5年1月～)	3

* 移転により、2回欠測

製、35.3 dps) を用いた。測定は試料採取から 6 時間後に行った。測定時間は、比較試料 5 分、降水試料 30 分とした。

2. ガンマ線核種分析

(1) 測定試料

① 大気浮遊じん：旧研究所本館北側駐車場（11 月まで）（移転後：新研究所南館屋上（12 月以降））に設置したハイボリウム・エアサンプラー（柴田科学株式会社製、HV-1000R）を用いて、ろ紙（東洋濾紙、HE-40T）上に大気浮遊じんを捕集した。毎月 3 回、午前 10 時から翌日の午前 10 時までの 24 時間捕集を行った。3 ヶ月分のろ紙試料（測定に供した吸引量：約 10000 m³）をカッターで円形（直径 50 mm）に切り取り、ポリプロピレン製容器（U-8 容器）に詰め、測定用試料とした。

② 降下物（雨水・ちり）：旧研究所本館南側屋上（地上約 15 m）（移転後：新研究所南館屋上（地上約 39 m））に設置した水盤（表面積 5000 cm²）に降下した雨水およびちりを 1 ヶ月間採取し、採取した試料を、ポンプを用いてステンレスビーカー（EBM 製モリブデンジ II）に入れ、電磁調理器（Panasonic 社製 KZ-PH5P）で加熱しながら全量を蒸発濃縮させた。濃縮物を蒸発皿に移して蒸発乾固させた後、残留物を U-8 容器に移し、測定用試料とした。

③ 上水：原水（淀川河川水）は大阪広域水道企業団 庭窪浄水場（守口市）原水取水口から、蛇口水は旧研究所本館 1 階の実験室内蛇口から採取した。採取試料各 100 L を、ステンレスビーカーと電磁調理器を用いて蒸発濃縮させた。濃縮物を蒸発皿に移して蒸発乾固させた後、残留物をそれぞれ U-8 容器に移し、測定用試料とした（時期および測定数は表 1 を参照）。

④ 食品：野菜類（タマネギおよびキャベツ）の食用部約 4 kg を 65℃の乾燥器（Panasonic 社製、MOV-212-PJ）で乾燥させた後に、石英製容器に移して電気マッフル炉（ADVANTEC 社製、FUW263PA）で 450℃、24 時間灰化した。それぞれの灰試料を 0.35 mm メッシュのふるいに通し、U-8 容器に移して測定用試料とした（試料採取場所、時期および測定数は表 1 を参照）。

⑤ 海水、土壌、海底土：海水は 2 L をマリネリ容器（2 L 容）に入れ、測定用試料とした。土壌および海底土は、採取後に 105℃の乾燥器で乾燥させた後、2 mm メッシュのふるいに通して得られた乾燥細土約 100 g を U-8 容器に入れ、測定用試料とした（試料採取場所、時期および測定数は表 1 を参照）。

⑥ 精度管理用分析比較試料：（公財）日本分析センターが調製した分析比較試料である「模擬牛乳」（¹³¹I、¹³⁷Cs および ⁴⁰K を添加したイオン交換水）、

「模擬土壌」(ガンマ線放出核種を添加したアルミナ)および「粉末試料」(環境試料をもとに調製した固体試料)について、「模擬牛乳」(1試料)はマリネリ容器(2L容)に容器の標線まで入れ、模擬土壌(U-8容器:2試料)はU-8容器のまま、「粉末試料」(2試料)はU-8容器に入れ測定を行った。

測定結果については、(公財)日本分析センターにおいて付与値と比較し評価を行った。評価は、当所(分析機関)の分析値と付与値およびそれらの拡張不確かさ(U)からEn数を算出し、 $|En| \leq 1$ を満足とした。なお、En数は下記の式により求められる。

$$En \text{ 数} = \frac{(\text{分析値}_{\text{分析機関}} - \text{付与値})}{\sqrt{U^2_{\text{分析機関}} + U^2_{\text{付与値}}}}$$

(2) 測定方法

あらかじめエネルギーの異なる核種を含んだ標準線源を用いてエネルギー校正および検出効率校正を行ったゲルマニウム半導体検出器(キャンベラ製、GC2018)を用い、試料中の核種より放出されるガンマ線量を測定した。測定時間は80000秒とした。得られた計測結果をバックグラウンド補正した後、エネルギー補正および検出効率補正を行い、測定試料中の核種(^{134}Cs 、 ^{137}Cs 、 ^{131}I および ^{40}K 等)の定性定量分析を行った。

3. 空間放射線量率測定

モニタリングポスト(NaIシンチレーション式、エネルギー補償型、アロカ製MAR-22型)による空間放射線量率の測定は、大阪市(当所)、茨木市、寝屋川市、東大阪市、富田林市、泉佐野市に設置した6基(地上1m、但し、大阪市(当所)は2022/12/13～地上39m)で連続測定を行った(設置場所は表1を参照)。結果は1時間平均値による1日の変動をメモリーカードから読み取った。

モニタリングポスト6基の測定結果は、自動測定・配信システムにより10分間の平均値が原子力規制委員会のホームページにリアルタイムで公表されている²⁾。

4. 福島第1原子力発電所の事故によるモニタリング強化

平成23年3月の福島第1原子力発電所の事故を受け、モニタリングポストが地上1m以内の場合、サーベイメータによる地上1mの空間放射線量測

定が原子力規制庁の指示により開始された。旧研究所は当時地上20mの場所にモニタリングポストが設置されていたが、平成31年に地上1mの場所に移設したことにより、サーベイメータによる測定値の原子力規制庁への報告義務がなくなったため、平成31年2月をもって終了していた(平成23年6月13日～12月17日:毎日、平成24年1月～平成31年2月:毎月第2週の水曜日)。しかし、この度の移転により、モニタリングポストが新研究所の屋上(地上39m)に移設されたため、原子力規制庁の指示によりサーベイメータによる1m高さでの測定を今年の1月より再開した。毎月第2週の水曜日の午前10時に新研究所南館東北側地上1mの高さにおいてサーベイメータ(NaIシンチレーション式、アロカ製TCS-171B型)で空間放射線量率を測定した。測定は、「環境放射能水準調査委託実施計画書(平成20年7月)」³⁾に準じて行った。測定器の待定数を30秒とし、地表1mの高さにおけるサーベイメータの指示値を30秒間隔で5回以上読み取り、平均値を算出した。但し、原子力規制庁の指示により上記計画書で加えることとなっている宇宙線による線量率30nGy/hは、加えていない。

結果および考察

1. 全ベータ放射能

表2に降水中の全ベータ放射能測定結果を示す。降水中の全ベータ放射能は、81試料中24例から検出されたが、異常値は検出されなかった。

表2 降水中全ベータ放射能測定結果

年 月	降水量 mm	件数 (検出数)	濃度 Bq/L	月間降下量 MBq/km ²
令和4年 4月	85	6(1)	ND~0.35	2.4
令和4年 5月	117	7(2)	ND~1.54	11.51
令和4年 6月	100	7(0)	ND	ND
令和4年 7月	141	11(2)	ND~0.32	9.2
令和4年 8月	90	10(3)	ND~0.62	4.2
令和4年 9月	191	9(2)	ND~0.44	6.0
令和4年 10月	103	7(5)	ND~0.55	11.8
令和4年 11月	81	5(0)	ND	ND
令和4年 12月*	20	3(0)	ND	ND
令和5年 1月	41	4(2)	ND~0.95	3.23
令和5年 2月	31	5(3)	ND~0.72	6.94
令和5年 3月	68	7(4)	ND~1.22	9.3
令和4年度	1068	81(24)	ND~1.54	64.6
過去3年間の値				
平成31年度	1270	78(18)	ND~0.91	69.3
令和2年度	1581	76(17)	ND~1.26	76.6
令和3年度	1872	84(15)	ND~1.01	63.1

ND: 計数値がその計数誤差の3倍を下回るもの

* 移転により、2回欠測

表3 環境および食品試料中の¹³⁴Cs、¹³⁷Cs、¹³¹Iおよび⁴⁰K濃度

試料	採取年月日	単位	¹³⁴ Cs	¹³⁷ Cs	¹³¹ I	⁴⁰ K	
大気浮遊じん							
令和4年	4月～6月	R4.4.4 ～R4.6.21	mBq/m ³	ND	ND	ND	ND
	7月～9月	R4.7.6 ～R4.9.21	〃	ND	ND	ND	ND
	10月～12月	R4.10.3 ～R4.12.24	〃	ND	ND	ND	ND
令和5年	1月～3月	R5.1.5 ～R5.3.16	〃	ND	ND	ND	0.14±0.033
令和4年度			mBq/m ³	ND	ND	ND	ND～0.14
過去3年間の値			mBq/m ³	ND	ND	ND	ND～0.13
降下物							
令和4年	4月	R4.3.31 ～R4.4.28	MBq/km ²	ND	ND	ND	0.57±0.19
	5月	R4.4.28 ～R4.6.1	〃	ND	ND	ND	0.99±0.20
	6月	R4.6.1 ～R4.7.1	〃	ND	ND	ND	ND
	7月	R4.7.1 ～R4.8.1	〃	ND	ND	ND	0.60±0.19
	8月	R4.8.1 ～R4.8.31	〃	ND	ND	ND	ND
	9月	R4.8.31 ～R4.9.30	〃	ND	ND	ND	0.94±0.19
	10月	R4.9.30 ～R4.10.28	〃	ND	ND	ND	1.5±0.22
	11月	R4.10.28 ～R4.11.25	〃	ND	ND	ND	0.72±0.17
	12月	R4.12.9 ～R5.1.4	〃	ND	ND	ND	0.79±0.17
令和5年	1月	R5.1.4 ～R5.1.31	〃	ND	ND	ND	ND
	2月	R5.1.31 ～R5.3.1	〃	ND	ND	ND	0.60±0.17
	3月	R5.3.1 ～R5.3.31	〃	ND	ND	ND	0.57±0.16
令和4年度			MBq/km ²	ND	ND	ND	ND～1.5
過去3年間の値			MBq/km ²	ND	ND	ND	ND～1.4
上水・原水		R4.6.6	mBq/L	ND	ND	4.0±0.17	79±2.5
過去3年間の値			mBq/L	ND	ND	0.77～2.2	63～79
上水・蛇口水		R4.6.15	mBq/L	ND	ND	0.76±0.17	86±2.6
過去3年間の値			mBq/L	ND	ND	ND～0.68	82～94
海水		R4.7.6	Bq/L	ND	ND	ND	6.0±0.40
過去3年間の値			Bq/L	ND	ND	ND	4.1～6.0
海底土		R4.7.6	Bq/kg dry	ND	1.4±0.21	ND	610±11
過去3年間の値			Bq/kg dry	ND	1.5～2.5	ND	610～650
土壌		R4.7.13	Bq/kg dry	ND	1.2±0.22	ND	670±11
0～5cm層			(MBq/km ²)	(ND)	(59±11)	(ND)	(32000±510)
過去3年間の値			Bq/kg dry	ND	ND～1.1	ND	610～680
			(MBq/km ²)	(ND)	(ND～58)	(ND)	(27000～35000)
土壌		R4.7.13	Bq/kg dry	ND	0.64±0.15	ND	720±11
5～20cm層			(MBq/km ²)	(ND)	(100±24)	(ND)	(120000±1700)
過去3年間の値			Bq/kg dry	ND	ND～0.9	ND	660～703
			(MBq/km ²)	(ND)	(ND～150)	(ND)	(96000～120000)
農産物 タマネギ		R4.6.8	Bq/kg生	ND	ND	ND	54±0.38
過去3年間の値			Bq/kg生	ND	ND	ND	42～53
農産物 キャベツ		R4.12.9	Bq/kg生	ND	ND	ND	68±0.45
過去3年間の値			Bq/kg生	ND	ND	ND	63～68

ND：計数値がその計数誤差の3倍を下回るもの

表4 モニタリングポストによる空間放射線量率

表4-1 大阪市 大阪健康安全基盤研究所：地上1m（～12/12）
地上39m（12/13～）

測定年月	測定回数	モニタリングポスト(nGy/h) (所在地：大阪市)		
		最高値	最低値	平均値
令和4年 4月	30	76	62	64
5月	31	83	62	64
6月	30	79	62	64
7月	31	81	62	64
8月	31	85	63	65
9月	30	87	63	65
10月	31	92	63	66
11月	30	80	62	66
12月(移設前)	12	72	61	65
12月(移設後)	19	70	61	62
令和5年 1月	31	70	61	62
2月	28	79	61	62
3月	31	74	61	62
令和4年度 移設前(地上1m)	256	92	61	65
移設後(地上39m)	109	79	61	62
過去3年間の値				
平成31年度	366	104	62	71
令和2年度	355*	105	61	66
令和3年度	365	100	61	64

*：令和3年1月機器更新のため欠測

表4-2 茨木市 茨木保健所：地上1m

測定年月	測定回数	モニタリングポスト(nGy/h) (所在地：茨木市)		
		最高値	最低値	平均値
令和4年 4月	30	70	53	56
5月	31	67	53	56
6月	30	68	53	56
7月	31	76	53	55
8月	31	78	53	56
9月	30	71	54	56
10月	31	73	54	57
11月	30	72	54	57
12月	31	64	53	55
令和5年 1月	31	65	54	55
2月	28	72	53	55
3月	31	71	53	55
令和4年度	365	78	53	56
過去3年間の値				
平成31年度	366	77	52	57
令和2年度	363*	84	52	56
令和3年度	365	82	52	55

*：令和3年1月機器更新のため欠測

表4-3 寝屋川市 寝屋川市保健所：地上1m

測定年月	測定回数	モニタリングポスト(nGy/h) (所在地：寝屋川市)		
		最高値	最低値	平均値
令和4年 4月	30	79	63	65
5月	31	85	64	65
6月	30	78	63	65
7月	31	91	63	65
8月	31	76	63	65
9月	30	95	63	65
10月	31	90	64	66
11月	30	83	63	66
12月	31	77	64	65
令和5年 1月	31	74	64	65
2月	28	84	64	65
3月	31	80	63	65
令和4年度	365	95	63	65
過去3年間の値				
平成31年度	366	90	62	67
令和2年度	361*	102	63	66
令和3年度	365	94	63	65

*：令和3年1月機器更新のため欠測

表4-4 東大阪市 東大阪市環境衛生検査センター：地上1m

測定年月	測定回数	モニタリングポスト(nGy/h) (所在地：東大阪市)		
		最高値	最低値	平均値
令和4年 4月	30	87	74	77
5月	31	95	74	77
6月	30	90	74	77
7月	31	94	74	76
8月	31	108	75	77
9月	30	109	75	77
10月	31	105	75	77
11月	30	93	75	77
12月	31	91	75	77
令和5年 1月	31	85	75	77
2月	28	94	74	77
3月	31	93	75	77
令和4年度	365	109	74	77
過去3年間の値				
平成31年度	366	105	73	77
令和2年度	356*	115	73	77
令和3年度	365	112	73	77

*：令和3年1月機器更新のため欠測

表4-5 富田林市 富田林保健所：地上1m

測定年月	測定回数	モニタリングポスト(nGy/h) (所在地：富田林市)		
		最高値	最低値	平均値
令和4年 4月	30	67	58	60
5月	31	70	58	60
6月	30	66	58	60
7月	31	65	58	60
8月	31	71	58	60
9月	30	79	58	59
10月	31	77	58	60
11月	30	70	58	60
12月	31	73	58	60
令和5年 1月	31	68	59	60
2月	28	74	59	60
3月	31	71	58	60
令和4年度	365	79	58	60
過去3年間の値				
平成31年度	366	85	60	62
令和2年度	359*	91	59	62
令和3年度	365	83	58	60

*：令和3年1月機器更新のため欠測

表4-6 泉佐野市 佐野中学校：地上1m

測定年月	測定回数	モニタリングポスト(nGy/h) (所在地：泉佐野市)		
		最高値	最低値	平均値
令和4年 4月	30	64	48	50
5月	31	74	48	50
6月	30	68	47	49
7月	31	65	48	50
8月	31	75	49	51
9月	30	89	48	50
10月	31	78	48	50
11月	30	71	48	51
12月	31	71	48	50
令和5年 1月	31	80	48	50
2月	28	71	48	50
3月	31	73	48	50
令和4年度	365	89	47	50
過去3年間の値				
平成31年度	366	77	48	51
令和2年度	362*	98	48	51
令和3年度	365	96	47	50

*：令和3年1月機器更新のため欠測

2. 核種分析

環境試料および食品試料中の¹³⁴Cs、¹³⁷Cs、¹³¹Iおよび⁴⁰Kの分析結果を表3に示す。

(1) ¹³⁴Cs および ¹³⁷Cs：今年度も例年同様、¹³⁷Cs が土壌および海底土の各試料から検出されたが、そのレベルは過去の値と同程度であった。その他の試料では例年同様 ¹³⁷Cs の検出はなかった。¹³⁴Cs は、例年同様どの試料からも検出されなかった。

(2) ¹³¹I：¹³¹I は、上水原水および蛇口水試料から微量（4.0 および 0.76 mBq/L）検出された。他の環境試料および食品試料からは検出されなかった。上水中の¹³¹Iについては、原水が平成元年度から、蛇口水が平成2年度から検出されており、そのレベルも過去の値（原水：ND～4.9、蛇口水：ND～1.4 mBq/L）⁴⁾と同程度であることや他の環境試料等から検出されていないこと、半減期が8日と短いことなどから、既報⁵⁾に述べたように、その起源は医学利用によるものであろうと推定される。

上水中に存在する¹³¹Iによる府民への健康影響については、既報⁵⁾でも論じたように、そのレベルは飲食物摂取制限の基準⁶⁾（飲料水中の放射性ヨウ素：300 Bq/kg）の10万分の1程度の低値であり、問題はないと考えられる。

(3) ⁴⁰K：天然放射性核種である⁴⁰Kは多くの試料で検出されたが、そのレベルは過去の値と同程度であり、特に異常値は認められなかった。

(4) 環境試料の放射能測定における精度管理：（公財）日本分析センターの報告書⁷⁾によると、当所の分析結果は付与値とよく一致しており、かつ、En数の絶対値も「1」以下であることから、ガンマ線核種分析の精度は確保されていることが認められた。

3. 空間放射線量率

モニタリングポストによる空間放射線量率調査結果（1時間平均値に基づく変動範囲を1月毎にまとめたもの）を表4-1から表4-6に示す。

令和4年度の大阪市の空間放射線量率値（表4-1）の1時間平均値は、移転前が61～92 nGy/h、移転後が61～79 nGy/hの範囲であった。移転によりモニタリングポストの設置場所が当所敷地内の地上1mの場所から地上39mの場所に変更になり、月平均値が64～66 nGy/hから62 nGy/hとなった。

また、表4-2から表4-6に示したその他の地上1mに設置されている5ヶ所の空間放射線量率値は、茨木市（表4-2）が53～78 nGy/h、寝屋川市（表4-

3）が63～95 nGy/h、東大阪市（表4-4）が74～109 nGy/h、富田林市（表4-5）が58～79 nGy/h、泉佐野市（表4-6）が47～89 nGy/hの範囲であった。すべての地点で、最高値および平均値は、過去3年間に観測した値の範囲内もしくは範囲に近い値であった。

4. 福島第1原子力発電所の事故によるモニタリング強化

新研究所南館東北側地上1mの高さで行ったサーベイメータによる空間放射線量率の測定結果を表5に示す。新研究所南館東北側アスファルトでの値は、測定期間中68～77 nGy/hの範囲であり、今年の地上1mにおけるモニタリングポストの値である61～92 nGy/hの範囲内であった。

表5 サーベイメータによる空間放射線量率

測定年月	サーベイメータ (nGy/h)	
	測定回数	測定値
令和5年	1月	74
	2月	77
	3月	68
令和4年度	3	68～77(平均:73)

（地上1m、新研究所南館東北側アスファルト）

ま と め

ガンマ線核種分析により人工放射性核種である¹³¹Iおよび¹³⁷Csが検出された。医学利用等に由来すると考えられる¹³¹Iは上水（原水および蛇口水）に極低レベルで検出された。¹³⁷Csは土壌や海底土から例年同様検出されたが、そのレベルは低値であった。また、他の人工放射性核種はいずれの試料からも検出されなかった。空間放射線量率は、大阪市のモニタリングポストにおいて、移設に伴い、僅かに測定値の低下が継続して認められた。また、すべてのモニタリングポストで、観測値は過去3年間に観測した値の範囲内であった。福島第1原子力発電所事故によるモニタリング強化で実施されたサーベイメータによる空間放射線量率調査結果は、地上1mにおけるモニタリングポストの値と同様であった。

謝 辞

本調査の遂行にあたり、調査試料の採取にご協力いただきました大阪城パークセンター、熊取町役場、大阪広域水道企業団庭窪浄水場の各機関に感謝致します。また調査実施にあたり、ご指導をいただきました原子力規制庁監視情報課放射線環境対策室、日本分析センターの皆様に謝意を表します。

利 益 相 反

開示すべき利益相反はない。

文 献

- 1) 原子力規制庁. 監視情報課放射線環境対策室. 環境放射能水準調査委託実施計画書. 令和4年度.
- 2) 原子力規制委員会. 放射線モニタリング情報共有・公表システム.
<https://www.erms.nsr.go.jp/nra-ramis-webg/>
- 3) 文部科学省科学技術・学術政策局原子力安全課 防災環境対策室. 環境放射能水準調査委託実施計画書. 平成20年7月
- 4) 肥塚利江, 東恵美子, 足立伸一. 大阪府における環境および食品中放射能調査 (平成25年度報告). *大阪府立公衛研所報* 2014; **52**: 67-74.
- 5) 田村幸子, 渡辺功, 布浦雅子. 大阪府における環境および食品中放射能調査 —平成元年4月～平成2年3月—. *大阪府立公衛研所報 公衆衛生編* 1990; **28**: 165-170.
- 6) 原子力規制委員会. 原子力災害対策指針 (平成24年10月31日制定, 令和4年7月6日一部改正)
- 7) 公益財団法人日本分析センター. 令和4年度原子力施設等防災対策等委託費 (環境放射能水準調査 (放射能分析)) 環境試料の放射能測定における精度管理評価結果

WEBサイトの内容は2023年5月12日に確認した。

Survey of environmental and food radioactivity in Osaka Prefecture (Fiscal 2022 Report)

Maoko KOIKE, Yoshihiko KOIZUMI, Toshie HIZUKA, Masayuki OHYAMA and Nobuyasu YAMAGUCHI

We investigated the radioactivity of environmental and food samples in Osaka Prefecture with a commission from the Nuclear Regulatory Agency in the 2022 program year. The gross beta radioactivity in precipitation, air radiation, and gamma ray radiation nuclides in food and environmental samples (e.g., fallout, airborne dust, tap water, sea water, soil, and sea sediment) were measured. The obtained results suggest that radioactivity levels of the environment and foods in the 2022 program year were similar to those in the past and no new artificial radionuclides were radiated.

Key words : environmental radioactivity, gross beta activity, radionuclide analysis, environmental gamma activity

大阪府内中核市における公衆浴場等浴槽水のレジオネラ属菌 および水質状況調査

枝川亜希子^a, 安達史恵^a, 小池真生子^a, 肥塚利江^a, 松島加代^b, 土屋 誠^c

大阪府内中核市の公衆浴場等の浴槽水（採暖槽水を含む）102 試料を対象に、レジオネラと宿主アメーバ等の微生物生息実態と水質状況について調査を行った。また、公衆浴場浴槽水の有機物の指標が令和元年に「KMnO₄消費量」から「TOC または KMnO₄ 消費量」に変更されたことを受け、KMnO₄ 消費量と TOC の関係性について検討した。

レジオネラは全試料の 24.5%から検出され、検出菌種は *L.pneumophila* が優占種であった。アメーバは 6.9%から検出され、アメーバ陽性試料からは高率（85.7%）でレジオネラが検出された。KMnO₄ 消費量と TOC の結果を比較したところ、遊離塩素濃度 2.0 mg/L 以上は除外した試料で強い相関が見られた。しかし、現在の公衆浴場における浴槽水の KMnO₄ 消費量の基準値である 25 mg/L に相当する TOC を本研究で得られた回帰式から算出すると 16 mg/L となり、基準値である 8 mg/L と大きく乖離していた。そのため、有機物の基準として TOC を用いると、基準値を超過する試料が増加することが予想された。

キーワード：レジオネラ属菌、自由生活性アメーバ、浴槽水、過マンガン酸カリウム消費量、TOC

日本国内におけるレジオネラ症の患者報告数が年々増加し、2019 年には過去最多の 2316 例が報告された¹⁾。レジオネラ症は感染症法の 4 類に分類される呼吸器疾患で、原因菌であるレジオネラ属菌（以下、レジオネラ）をエアロゾル（水の微粒子）と共に肺に取り込むことにより感染する。レジオネラ症の主な感染源は、浴槽、冷却塔、加湿器などの人工的に造られた水環境であるが、日本国内では感染源が特定された事例の大部分を浴槽水が占めている。近年は大規模な集団感染は起きていないものの、全国的に浴槽水からのレジオネラ検出報告が続いている²⁾。

公衆浴場の浴槽水における有機物濃度の指標は、長らく過マンガン酸カリウム消費量（以下、KMnO₄ 消費量）が用いられてきた。しかし、水中に存在する還元性のある無機物質の影響や、有機物質の形態により消費量が異なること、また、分析者の手技により誤差が生じやすい分析法であることなどが指

摘されていた。そのため、令和元年 9 月 19 日生食発 0919 第 8 号生労働省通知により、「公衆浴場における水質基準等に関する指針」が改正され、有機物の指標は「有機物（全有機炭素（TOC）の量）（以下、TOC）または KMnO₄ 消費量」に変更された³⁾。大阪府においては、公衆浴場における水質基準に TOC が導入されたことを受け、大阪府公衆浴場法施行細則を一部改正し、有機物の指標として KMnO₄ 消費量を TOC に変更し、令和 2 年 4 月 1 日から施行されている⁴⁾。また大阪府内中核市においても、同様の対応がされている⁵⁾。

本研究では、大阪府内中核市の公衆浴場等の浴槽水等（採暖槽含む）を対象に、レジオネラと宿主アメーバ等の微生物生息実態と水質状況について調査を行った。また、有機物の指標が「KMnO₄ 消費量」から「TOC または KMnO₄ 消費量」に変更されたことを受け、新たに基準が導入された TOC のデータを蓄積すると共に、KMnO₄ 消費量と TOC の

a 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部生活環境課

b 元寝屋川市保健所保健衛生課（現大阪府富田林保健所衛生課）

c 元枚方市保健所保健衛生課（現大阪府泉佐野保健所生活衛生室）

関係性について検討したので報告する。

結果および考察

調査方法

1. 対象施設および試料

大阪府内の5中核市（豊中市、枚方市、八尾市、寝屋川市、東大阪市）の公衆浴場等から浴槽水（採暖槽水を含む）102試料を採取した。調査期間は、令和元年10月～令和2年12月であった。

2. 検査項目

検査項目は、レジオネラ（培養法）、自由生活性アメーバ（以下、アメーバ）、一般細菌、従属栄養細菌、大腸菌群、大腸菌、KMnO₄消費量、TOC、外観、pH、色度、濁度、水温、遊離残留塩素濃度、ATPとした。

3. 検査方法

レジオネラは、レジオネラ症防止指針に記載されているろ過濃縮法を用いた培養法により行った⁵⁾。レジオネラと判定した分離株は、ラテックス凝集反応（OXID, Legionella Latex Test Kit）、免疫血清反応（デンカ生研, レジオネラ免疫血清「生研」）により菌種と血清群を決定した。アメーバは、レジオネラ症防止指針に記載されている培養法により行った⁶⁾。試料50 mLを遠心法により1 mLに濃縮後、アメーバ用寒天培地2枚に塗抹し、培養温度はそれぞれ30℃、42℃で5～7日程度培養した。培養後、プラーク形成を確認したものを陽性と判定し、プラークから分離したアメーバについて顕微鏡観察により形態学的同定を行った。アメーバ種名は、*Acanthamoeba*、*Naegleria*、*Vannella*、*Hartmannella*についてはそれぞれの種名を、これら以外はUnidentifiedとした。KMnO₄消費量の測定は水道水の水質管理目標設定項目の検査方法、目標22の滴定法により行った⁷⁾。TOCの測定は告示法の別表第30の全有機炭素計測定法により行った⁷⁾。一般細菌、従属栄養細菌、大腸菌、大腸菌群、外観、pH、色度、濁度の検査は、告示法および上水試験方法に記載されている方法により行った⁷⁻⁹⁾。水温、遊離残留塩素濃度、ATPは、採水時に測定した。ATPは、ルシパック Pen-AQUA（Kikkoman Biochemifa）を用い、ルミテスター PD-30（Kikkoman Biochemifa）により測定した。

1. レジオネラとアメーバの検出

浴槽水（採暖槽水を含む）102試料のうち、25試料（24.5%）からレジオネラを検出した。菌数は10～520 CFU/100mLであった。菌種は、22試料が*L.pneumophila*で、血清群は、SG1、SG6、SG5の順で多く、2試料は複数の血清群（SG1、3およびSG1、5、6）を検出した。3試料は*Legionella* spp.であった。アメーバは、7試料（6.9%）から検出し、1試料から*Acanthamoeba* spp.を検出した（写真1）。アメーバ陽性7試料のうち、6試料（85.7%）からレジオネラを検出した。レジオネラとアメーバを検出した試料の概要について、表1に示す。これまでの浴槽水調査報告では、行政検査では26.5%、温泉浴槽を対象とした調査では28.7%からレジオネラを検出しており^{10,11)}、本調査結果は同等の検出率であった。菌種は、*L. pneumophila*が優占種として検出された。レジオネラ属菌は60菌種以上が正式に命名されているが¹²⁾、レジオネラ症患者の90%以上は*L. pneumophila*によるものである¹³⁾。また、*L. pneumophila*の血清群（SG）1～15のうち、日本における臨床株の多く（80%）はSG1に属している¹⁴⁾。本調査でも*L. pneumophila* SG1を多数検出しており、十分な衛生管理や塩素消毒を行わなければ、調査対象施設が感染源となる可能性があると考えられた。浴槽水から検出された*Acanthamoeba* spp.は、環境中に広く生息し、レジオネラの主な宿主アメーバとして知られる。しかし、培養至適温度が30℃のため、水温が40℃前後の浴槽水からの検出事例は少ない。本調査で*Acanthamoeba* spp.が検出された試料の水温は39℃であり、培養至適温度より高温域でも生息していることが示された。その他のアメーバは、顕微鏡観察では形態学的な種の特定制には至らなかったが、浴槽水から主に検出されるアメーバ種である*Naegleria* sp.、*Vannella* sp.、*Hartmannella* sp.ではないことを確認した。

2. KMnO₄消費量とTOC

浴槽水（採暖槽水を含む）102試料のうち、KMnO₄消費量が測定不能となった試料が8試料あった。KMnO₄消費量の測定において、硫酸酸性下で過マンガン酸カリウム溶液を加え5分煮沸後、当量のシュウ酸ナトリウムを加えた後も脱色しなかった試料を測定不能とした。KMnO₄消費量およびTOC

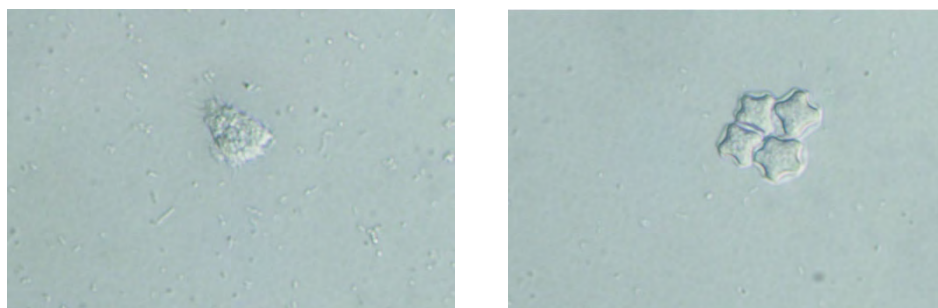


写真1 検出された *Acanthamoeba* spp. (微分干渉顕微鏡像)
左：栄養体、右：シスト

表1 レジオネラおよびアメーバを検出した試料

試料 No.	試料種別	レジオネラ菌数 (CFU/100mL)	レジオネラ菌種	アメーバ	アメーバ種*
23	浴槽水	520	<i>L. pneumophila</i> SG3	+	Unidentified
60	浴槽水	250	<i>L. pneumophila</i> SG6	-	
90	浴槽水	240	<i>L. pneumophila</i> SG5	-	
85	浴槽水	90	<i>L. pneumophila</i> SG1, 3	-	
57	採暖槽水	80	<i>L. pneumophila</i> SG5	-	
95	浴槽水	50	<i>L. pneumophila</i> SG1, 5, 6	+	Unidentified
22	浴槽水・薬湯	30	<i>L. pneumophila</i> SG5	-	
63	浴槽水	30	<i>L. pneumophila</i> SG2-14	+	Unidentified
72	浴槽水	30	<i>Legionella</i> spp.	-	
2	採暖槽水	20	<i>L. pneumophila</i> SG6	-	
5	採暖槽水	20	<i>L. pneumophila</i> SG5	-	
15	浴槽水	20	<i>L. pneumophila</i> SG1	-	
19	浴槽水	20	<i>L. pneumophila</i> SG1	+	<i>Acanthamoeba</i> spp.
31	浴槽水	20	<i>L. pneumophila</i> SG3	-	
40	浴槽水	20	<i>L. pneumophila</i> SG6	-	
88	採暖槽水	20	<i>L. pneumophila</i> SG6	-	
94	浴槽水	20	<i>L. pneumophila</i> SG1	+	Unidentified
27	採暖槽水	10	<i>L. pneumophila</i> SG1	-	
28	浴槽水	10	<i>L. pneumophila</i> SG1	-	
34	浴槽水	10	<i>L. pneumophila</i> SG6	-	
41	採暖槽水	10	<i>L. pneumophila</i> SG5	-	
59	浴槽水	10	<i>L. pneumophila</i> SG1	+	Unidentified
86	浴槽水	10	<i>L. pneumophila</i> SG6	-	
96	浴槽水	10	<i>Legionella</i> spp.	-	
97	浴槽水	10	<i>Legionella</i> spp.	-	
20	浴槽水・薬湯	<10		+	Unidentified

*Unidentified : *Acanthamoeba* sp.、*Naegleria* sp.、*Vannella* sp.、*Hartmannella* sp.以外のアメーバ種

の測定に影響を与える物質を含んでいた 13 試料 (消毒剤としてイソシアヌル酸等を使用、薬湯など)、さらにいずれかの値が定量下限値未満あるい

は測定不能であったデータを除いた 78 試料について、 KMnO_4 消費量と TOC の関係を図 1 a に示す。また、先行研究において KMnO_4 消費量に及ぼす物

質について検討した結果、高濃度の遊離残留塩素が影響を与えている知見を得た¹⁵⁾。そのため、さらに遊離塩素濃度 2.0 mg/L 以上は除外した 59 試料 (図 1b) について、KMnO₄ 消費量と TOC の関係について示す。これらの相関係数は、図 1 a は 0.59、図 1 b は 0.83 となり、遊離塩素濃度 2.0 mg/L 以上は除外した試料で KMnO₄ 消費量および TOC に強い相関がみられた。本調査で対象とした浴槽水試料 (消毒剤がイソシアヌル酸、葉湯の試料を除く) のうち KMnO₄ 消費量の基準である 25 mg/L を超過したものは 1 試料であったのに対し、TOC の基準である 8 mg/L を超過したものは 11 試料であった。本調査で得られた回帰式 (図 1b) を用いて、KMnO₄ 消費

量の基準である 25 mg/L に対し TOC を算出したところ 16 mg/L となり、現在の基準である 8 mg/L と大きな差が見られた。また、TOC の値が 16 mg/L を超過したものは、3 試料であった。公衆浴場の浴槽水等の TOC および KMnO₄ 消費量の基準超過件数の比較がこれまでに行われ、KMnO₄ 消費量と比較し、TOC の超過件数が多くなっていることが報告されている^{16,17)}。本調査でも同様の結果が得られており、現在の TOC の基準である 8 mg/L は、KMnO₄ 消費量の基準値と比較し、やや厳しい基準であると考えられた。そのため、TOC の基準に関しては KMnO₄ 消費量における基準と乖離を小さくするよう再考の余地があると考えられた。

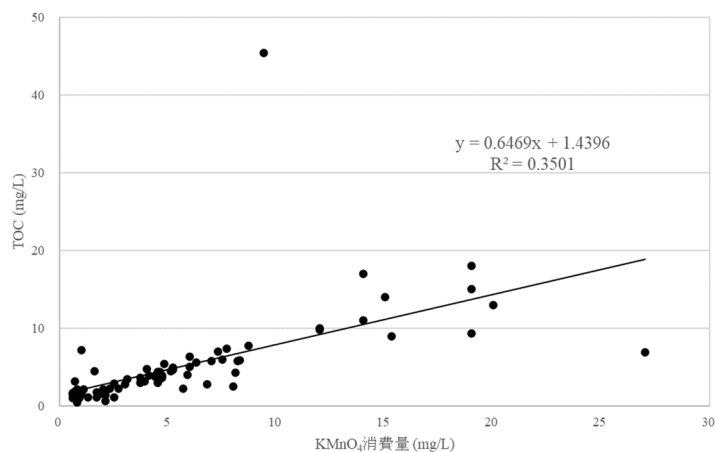


図 1a KMnO₄ 消費量および TOC の関係 (n=78)

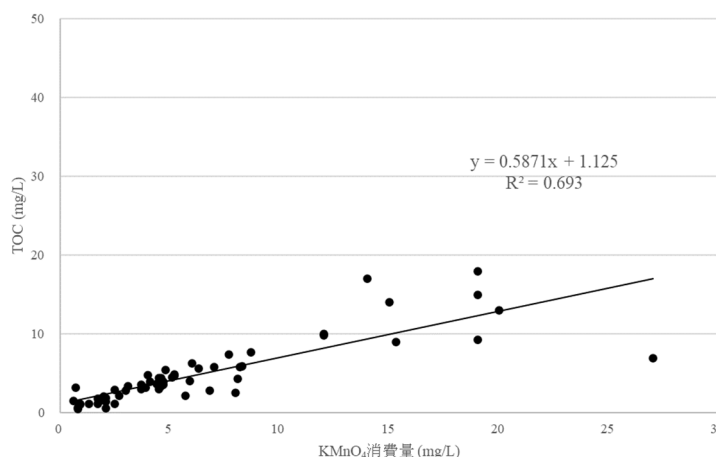


図 1b KMnO₄ 消費量および TOC の関係 (遊離塩素濃度 2.0 mg/L 以上は除外) (n=59)

3. 水質検査結果

採水時の水温は16~42.5℃(平均37.8℃)、pH値は5.2~10.1(平均7.7)、濁度は0.1未満~7.2(平均1.0)、色度は0.5未満~39.4(平均2.5)であった。浴槽水または採暖槽水で水質基準が定められている項目については、概ね基準値範囲内であった(薬湯は除く)。ATPは0~7039RLU(平均258RLU)で、25RLU未満は65試料、25-80RLUは18試料、80RLU以上は19試料であった。ATP値の管理指標として25RLU未満を管理目標値、25-80RLUを要注意、80RLU以上を要改善と区分している¹⁸⁾。これまでの報告^{18, 19)}では、ATP値が25RLU未満の検体からのレジオネラ属菌の検出はほとんどなく、ATP値がこの範囲内であれば施設の管理が良好と判断することを可能としていたが、本調査でのそれぞれの区分でのレジオネラ陽性率は、25RLU未満は16.9%(11/65試料)、25-80RLUは33.3%(6/18試料)、80RLU以上は42.1%(8/19試料)であった。ATPは現場で簡便に測定できるため衛生管理での活用を考えていたが、本調査では管理良好と判断されるRLU区分の施設からもレジオネラが検出されたことから、ATPの値からレジオネラ汚染を予測することは難しいと考えられた。

4. 遊離残留塩素濃度と微生物の関係

レジオネラ、アメーバ、一般細菌、従属栄養細菌、大腸菌、大腸菌群の検出状況について、遊離残留塩素濃度別に表2に示す。浴槽水の消毒にあたっては、「塩素系薬剤を使用し、浴槽水中の遊離残留塩素濃度を頻繁に測定して、通常0.4mg/L程度を保ち、かつ、遊離残留塩素濃度は最大1mg/Lを超えないよう努めること」と定められている。本調査では、遊離残留塩素濃度が0.4mg/L以上確保された試料で、大腸菌、大腸菌群は検出されなかった。また、浴槽水および採暖槽水に従属栄養細菌の水質基

準はないが、水道水の水質管理目標設定項目で定められた「2,000CFU/mL以下」を参考にしたところ、遊離残留塩素濃度が0.4mg/L以上確保された試料でこの値を超過した試料はなかった。一方、レジオネラは遊離残留塩素濃度が0.4mg/L以上のからも検出された。レジオネラは、実験的には遊離塩素濃度0.4mg/Lを確保できれば15分以内に死滅する²⁰⁾。しかし、実際の浴槽や採暖槽では生物膜やアメーバの影響により、十分な消毒効果が得られないことが多い。また、塩素との接触時間が十分でない場合も消毒効果が得られない。本調査において、遊離残留塩素濃度が0.4mg/L以上の試料で一般細菌200CFU/mlを超過した試料があったことから、塩素濃度は確保されているものの、塩素が投入されてからの接触時間が十分ではなく、塩素消毒効果が得られていなかった可能性が考えられた。浴槽や採暖槽では、ヒトが入浴することにより塩素濃度が低下する。遊離残留塩素濃度を頻繁に測定して常に0.4mg/L程度を保ち、レジオネラやその他の微生物類を抑制することが重要である。

ま と め

大阪府内中核市の浴槽水および採暖槽水を対象にレジオネラ調査を行った結果、24.5%の試料から検出し、検出菌種は*L. pneumophila*が優占種であった。また、アメーバは6.9%の試料から検出し、*Acanthamoeba* spp.等を検出した。アメーバ陽性試料からは高率(85.7%)でレジオネラが検出された。

KMnO₄消費量とTOCの結果を比較したところ、強い相関が見られた。しかし、現在の公衆浴場における浴槽水のKMnO₄消費量の基準値である25mg/Lに相当するTOCを回帰式から算出すると16となり、基準である8mg/Lと大きく乖離していた。現在の有機物の基準値であるTOC8mg/Lは、

表2 遊離残留塩素濃度と微生物の検出状況

遊離残留塩素濃度 (mg/L)	試料数	陽性試料数					
		レジオネラ	アメーバ	一般細菌 ¹⁾	従属栄養細菌 ²⁾	大腸菌群	大腸菌
~ <0.4	10	6	4	7	1	2	1
0.4 ~ 1.0	28	13	1	1	0	0	0
1.0 < ~ 2.0	37	5	2	3	0	0	0
2.0 < ~	27	1	0	0	0	0	0
計	102	25	7	11	1	2	1

¹⁾ 200 CFU/mL以上、²⁾ 2000 CFU/mL以上

KMnO₄ 消費量の基準値と比較してやや厳しい基準であったと考えられたことから、TOC の基準に関しては KMnO₄ 消費量における基準と乖離を小さくするよう再考の余地があると考えられた。

遊離残留塩素濃度が 0.4 mg/L 以上確保された試料で、大腸菌、大腸菌群は検出されなかったが、レジオネラは検出された。これらの試料では、一般細菌が 200 CFU/ml を超過した試料があったことから、遊離残留塩素濃度は確保されているものの、塩素が投入されてからの接触時間が十分ではなく、塩素消毒効果が得られていなかった可能性が考えられた。

謝 辞

本調査は「大阪府内中核市における公衆浴場浴槽水、遊泳場採暖槽水レジオネラ属菌調査」において実施されたものである。調査にご協力いただいた豊中市、枚方市、八尾市、寝屋川市、東大阪市の各保健所ならびに関係各位に感謝いたします。

利 益 相 反

開示すべき利益相反はない。

文 献

- 1) 国立感染症研究所感染症情報センター. レジオネラ症の届出状況 2011 年第 1 週～2021 年第 35 週. <https://www.niid.go.jp/niid/ja/legionella-m/legionella-idwrs/10791-legionella-20211201.html>
- 2) 枝川亜希子. レジオネラ症の発生事例. *空気調和・衛生工学誌* 2023; **97**(9), 625-630.
- 3) 厚生労働省. 令和元年 9 月 19 日付け生食発 0919 第 8 号公衆浴場における衛生等管理要領等の改正について. <https://www.mhlw.go.jp/content/11130500/000555445.pdf>
- 4) 大阪府. 大阪府公衆浴場法施行細則及び大阪府旅館業法施行細則の一部を改正する規則. <https://www.pref.osaka.lg.jp/attach/1611/00355259/yokusousui-kensa.pdf>
- 5) 枚方市. 枚方市公衆浴場法施行細則及び枚方市旅館業法施行細則の一部を改正する規則. <https://www.city.hirakata.osaka.jp/cmsfiles/contents/0000029/29230/022020.pdf>
- 6) 館田一博. 第 4 版レジオネラ症防止指針. 公益財団法人日本建築物衛生管理教育センター; 2017. 32-134.
- 7) 厚生労働省. 平成 15 年 10 月 10 日健水発第 1010001 号 (最終改正令和 5 年 3 月 24 日薬生水発 0324 第 1 号) 水質基準に関する省令の制定及び水道法施行規則の一部改正等並びに水道水質管理における留意事項について別添 4 水質管理目標設定項目の検査方法. <https://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-10900000-Kenkoukyoku/0000055189.pdf>
- 8) 厚生労働省. 平成 15 年告示第 261 号 (最終改正令和 5 年 3 月 24 日厚生労働省告示第 85 号) 水質基準に関する省令の規定に基づき厚生労働大臣が定める方法. <https://www.mhlw.go.jp/content/10900000/001077084.pdf>
- 9) 日本水道協会. 上水試験方法, 2020.
- 10) 厚生労働省. 入浴施設におけるレジオネラ症防止対策の調査結果. <https://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/kenkou/legionella/030331-1.html>
- 11) 古畑勝則, 原元宣, 吉田真一, 福山正文. 温泉水からのレジオネラ属菌の分離状況. *感染症学雑誌* 2004; **78**(8): 710-716.
- 12) Euzéby JP. List of prokaryotic names with standing in nomenclature—genus *Legionella*. <https://lpsn.dsmz.de/genus/legionella>
- 13) Yu VL, Plouffe JF, Pastoris MC, Stout JE, Schousboe M, Widmer A, Summersgill J, File T, Heath CM, Paterson DL, Chereschsky A. Distribution of *Legionella* species and serogroups isolated by culture in patients with sporadic community-acquired legionellosis: an international collaborative survey. *J Infect Dis* 2002; **186**(1): 127-128.
- 14) Amemura-Maekawa J, Kura F, Helbig JH, Chang B, Kaneko A, Watanabe Y, Isobe J, Nukina M, Nakajima H, Kawano K, Tada Y, Watanabe H, the Working Group for *Legionella* in Japan. Characterization of *Legionella pneumophila* isolates from patients in Japan according to serogroups, monoclonal antibody subgroups and sequence types. *J Med Microbiol* 2010; **59**(6): 653-

659.

- 15) 安達史恵, 小池真生子, 枝川亜希子, 足立伸一. 公衆浴場の浴槽水等における過マンガン酸カリウム消費量および TOC の関係. *大阪健康安全基盤研究所研究年報* 2022; **6**: 104-111.
- 16) 福田彩香, 八木正博, 向井健悟. 公衆浴場水における基準項目の変更及びその影響. *神戸市環境保健研究所報* 2020; **48**: 69-70.
- 17) 大島詔. 公衆浴場等の浴槽水における過マンガン酸カリウム消費量と全有機炭素量の関係について. *水環境学会誌* 2021; **44**(6): 175-178.
- 18) キッコーマンバイオケミファ. レジオネラ対策でのルミテスターを用いた報告事例.
https://biochemifa.kikkoman.co.jp/kit/atp/article/article_detail_224/
- 19) 富田隆弘, 岸田一則. ジオネラ対策における浴槽水の簡易迅速な検査法 (ATP 測定法) の有用性に関する検討. *千葉県衛生研究所年報* 2011; **60**: 69-74.
- 20) 藪内英子, 王笠, 矢野郁也, 山吉孝雄, 荒川迪生. *Legionella* 属菌に対する塩素の殺菌効果. *感染症学雑誌* 1995; **69**(2): 151-157.

WEB サイトの内容は 2023 年 6 月 12 日に確認した。

**Survey of *Legionella* bacteria and water quality of bath water from public bathhouses in core cities,
Osaka Prefecture, Japan**

Akiko EDAGAWA^a, Fumie ADACHI^a, Maoko KOIKE^a, Toshie HIZUKA^a, Kayo MATSUSHIMA^b
and Makoto TSUCHIYA^c

We investigated *Legionella* and the relation between microbial contamination and water quality in 102 bath water samples (including warming tank water) from public bathhouses and other facilities in a core city in Osaka Prefecture. In addition, in the water quality standards for public bathhouses, the “Guidelines for Water Quality Standards in Public Bathhouses” were revised by the Ministry of Health, Labor and Welfare; the indicator of organic substances was changed to “total organic carbons (TOC) or potassium permanganate consumption (KMnO₄ consumption).” Therefore, we measured both the KMnO₄ consumption and TOC in bath water from public bathhouses in Osaka and analyzed their relationship.

Legionella was detected in 24.5% of the bath water samples, with *L. pneumophila* being the predominant species. Free amoebae were detected in 6.9% of the bath water samples and a high percentage of amoeba-positive samples was found to be *Legionella*. The relationship between KMnO₄ consumption and TOC in bath water was analyzed and compared, showing a high correlation. From the equation obtained, the TOC corresponding to 25 mg/L, the current standard value for KMnO₄ consumption in public bathhouses, and the experimental value that was found to be 16 mg/L, was calculated and found to deviate significantly from the standard value of 8 mg/L. Thus, when TOC is applied as a standard for organic substances, more facilities are expected to exceed this standard. *Legionella* was detected in samples with free residual chlorine concentrations of 0.4 mg/L or higher. These samples may not have had sufficient contact time after chlorine was added because of which the chlorine disinfection effect was not achieved.

Key words : *Legionella*, Free-living amoebae, bath water samples, KMnO₄ consumption, total organic carbons

a Osaka Institute of Public Health

b Osaka Tondabayashi Public Health Center (Formerly of Neyagawa City Public Health Center)

c Osaka Izumisano Public Health Center (Formerly of Hirakata City Public Health Center)

Resurgence of syphilis in 2022 among heterosexual men and women in Osaka, Japan

T. UKAI^a, K. KAKIMOTO^a, T. KAWAHATA^b, T. MIYAMA^c, N. IRITANI^a, and K. MOTOMURA^a

Clinical Microbiology and Infection, 29(3), 396–397(2023)

日本では、新型コロナウイルスの発生した2020年以降、同じ性感染症であるクラミジア感染症や淋菌感染症報告数は増加した一方、梅毒報告数は減少がみられた。大阪府においては、梅毒は2020年の減少の後、2021年後半から報告数の増加が認められており、2022年の大阪府の梅毒発生状況と、その詳細を記述し、詳細を解析した。2018年1月から2022年6月までの大阪府の感染症サーベイランスシステム(NESID)から情報を抽出した。

大阪府での梅毒報告数は、2019年1101件、2020年902件、2021年865件であったが、2022年は前半だけで730件と著しく増加した。男性(56%)は25歳から60歳まで幅広く分布し、女性(44%)は大多数が20代であった。性的接触歴については、男性同性間性的接触歴のある者の報告数は2022年も含めこの3年間変化がなかったが、男性の異性間性的接触者、および女性異性間性的接触者では、2021年の第二四半期から2022年にかけて著しく梅毒報告数が増加していた。

この現象から、COVID-19に対する対策が、異性間性的接触者の性行動には影響を与えたが、同性間性的接触者の性行動には影響がなかった可能性があると考えられた。2021年からの異性間性的接触者における急な梅毒症例数の増加の原因ははっきりしないが、その前の減少期間に検査をうけていなかった患者のリバウンドや、また、性風俗従事者がコロナ禍で店舗にて働くことができなくなり、その結果ソーシャルメディア等を利用して、管理されない危険な性交渉を行った、といったことが考えられた。

a 大阪健康安全基盤研究所公衆衛生部健康危機管理課

b 大阪健康安全基盤研究所微生物部ウイルス課

c 大阪健康安全基盤研究所公衆衛生部疫学解析研究課

2022年大阪府での異性間性的接触男性及び女性の梅毒報告数増加について

The impact of spousal behavior changes on smoking, drinking and physical activity: The longitudinal survey of middle-aged and elderly persons in Japan

T. UKAI^a, T. TABUCHI^b and H. ISO^cPreventive Medicine.164 (2022)
<https://doi.org/10.1016/j.ypmed.2022.107293>

目的：配偶者の喫煙・飲酒習慣の変化がその後の本人の健康行動に与える影響を明らかにする。

研究デザイン：コホート研究（厚生労働省中高年者縦断調査の第1から第10回調査データを用いた）

対象：50-59歳の同居する夫婦9714組

主たる要因：喫煙・飲酒について、前年からの配偶者の健康行動の変化、すなわち不健康習慣の維持(A)、健康習慣維持(B)、健康習慣獲得(C)、不健康習慣獲得(D)アウトカム指標は1年後の本人の健康行動の獲得（禁煙の達成、適量飲酒習慣の獲得）

統計解析方法：ロジスティック回帰分析を用いて配偶者の健康行動の変化を暴露要因として本人が健康行動を獲得する多変量調整オッズ比を算出した。結果：配偶者が喫煙者のままであった場合(A)を基準として、配偶者が非喫煙者のままであった場合(B)、配偶者が禁煙した場合(C)、配偶者が喫煙を開始した場合(D)の、その後に喫煙者が禁煙を達成するオッズ比(95%信頼区間)は、それぞれ男性で1.5(1.2-1.9)、2.1(1.3-3.4)、1.4(0.7-2.6)、女性で1.5(1.2-1.9)、2.9(1.7-4.9)、0.8(0.3-2.0)であった。また配偶者が過剰飲酒を継続した場合(A)を基準として、配偶者が適量飲酒を継続した場合(B)、適量飲酒を獲得した場合(C)、過剰飲酒を開始した場合(D)の、その後に過剰飲酒者が適量飲酒習慣を獲得するオッズ比は、それぞれ男性で1.6(1.3-1.9)、1.5(1.1-2.0)、1.3(1.0-1.8)、女性で1.5(1.2-1.8)、1.5(1.2-1.9)、1.2(1.0-1.6)であった。

結論：生活を共にする夫婦の健康行動は互いに影響する。配偶者が健康的な生活習慣を維持する、もしくは健康的な生活習慣に変えると、配偶者が不健康な生活習慣をもつ場合と比較して、男女とも健康的な生活習慣を獲得する傾向がみられた。

a 大阪健康安全基盤研究所健康危機管理課

b 大阪国際がんセンター

c 大阪大学大学院公衆衛生学教室

配偶者の健康行動が他方に与える影響

Factors associated with time lag between symptom onset and reporting in the first epidemic wave of COVID-19 in Osaka, Japan

T. MIYAMA^a, K. KAKIMOTO^b, N. IRITANI^b,
and K. MOTOMURA^{a,b}

IJID regions, 4, 53–58 (2022)

新型コロナウイルス感染症の発症から届出までの時間（発症-届出時間）の短縮は、感染拡大抑制に寄与すると考えられている。本解析は、積極的疫学調査により収集された情報を用いて、発症-届出時間に影響する因子を定量的に評価することを目的に実施した。30歳代の報告例の発症-届出時間は、80歳以上に比べ1.13 (95%信頼区間1.02, 1.25) 倍長く、感染経路判明症例の発症-届出時間は経路不明症例に比べ有意に0.84倍 (0.81, 0.90) 短く、重度発生率地域に居住する報告例は低発生率地域例に比べ発症-届出時間が1.12倍 (1.01, 1.24) 長く、歓楽街滞在歴のある報告例は滞在歴のない報告例に比べ発症-届出時間が1.18倍 (1.09, 1.29) 長かった。医療従事者、免疫不全疾患を有する者は、他と比べ発症-届出時間がそれぞれ0.79倍 (0.73, 0.85)、0.70倍 (0.55, 0.90) 短かった。以上より、発症-届出時間の短縮には、積極的疫学調査により新たな感染者をできる限り早期に把握すること（感染経路：時・場所・人の把握）、30歳代の人や歓楽街滞在歴のある人の検査機会を充実させること、発生率の高い地域における濃厚接触者調査等の疫学調査や検査機会を拡充させ、感染者の早期発見に努めることが重要であることが疫学的に示された。また、医療従事者や死亡リスクの高い基礎疾患保有者は早期に新型コロナウイルスの検査を受けられていたことが示唆された。

Decrease in overdispersed secondary transmission of COVID-19 over time in Japan

T. MIYAMA^{a,b}, SM. JUNG^{b,c}, and H. NISHIURA^b

Epidemiology and Infection, 150, e197 (2022)

<https://doi.org/10.1017/S0950268822001789>

新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) 症例は多くの二次感染者を生み出すスーパースプレッダーがいる一方で、誰にも感染させない症例も存在する（つまり、COVID-19の2次感染者数分布のばらつきは大きい）。この性質により、第1・2波において、感染伝播ハイリスク群への集中的な対策と接触者調査は、COVID-19を効率的に制御できた。しかし、感染伝播性の高い変異株の出現により、これらの対策によるCOVID-19の制御が困難となった。二次感染者数分布のばらつきは、感染対策の効果に影響するため、これを経時的にモニターすることは重要である。本研究では、日本においてSARS-CoV-2の野生株が流行していた第2波（2020年夏）とAlpha変異株が流行した第4波（2021年春）における二次感染者数分布のばらつきを解析した。長野県の接触者調査情報を用いて、二次感染者数分布を負の二項分布に適合させ、ばらつきパラメータ k を推定した。第4波 ($k=0.55$; 95%CI:0.40–0.79)は、第2波 ($k=0.36$; 95%CI:0.22–0.65)に比べ二次感染者数分布のばらつきが小さかった。6人以上の二次感染者を生んだ症例の割合は、両期間で変わらなかったが、第4波では、家族内感染の割合が高かった。二次感染者数分布のばらつきが小さくなると、ハイリスク群に集中した対策の効果が減弱するため、より幅広い対象への対策が必要であることを示唆した。

a 大阪健康安全基盤研究所公衆衛生部疫学解析研究課

b 大阪健康安全基盤研究所公衆衛生部健康危機管理課
大阪府における新型コロナウイルス感染症の発症から届出までの時間に関連する因子

a 大阪健康安全基盤研究所公衆衛生部疫学解析研究課

b 京都大学大学院医学研究科

c 北海道大学大学院医学研究院

日本において新型コロナウイルス感染症の二次感染の過分散は時間経過とともに低下した

Exploring the threshold for the start of respiratory syncytial virus infection epidemic season using sentinel surveillance data in Japan

T. MIYAMA^a, K. KAKIMOTO^b, N. IRITANI^b, T. NISHIO^b, T. UKAI^{a,b}, Y. SATSUKI^b, Y. YAMANAKA^b, Y. NISHIDA^b, A. SHINTANI^c, and K. MOTOMURA^{a,b}

Frontiers in public health, 3 (11), 1062726 (2023)
<https://doi.org/10.3389/fpubh.2023.1062726>

RSウイルス感染症流行の季節性には変動が認められ、流行への計画的な備えが困難となっている。これまでRSウイルス感染症は秋から冬に流行していたが、2017-2019年には夏から秋に流行し、2020年は流行が見られず、また2021年は例年に比べ早期に大規模な流行が認められた。流行を早期に探知するため、定点あたり報告数を用いた流行開始の基準値をROC解析により探索した。東京、神奈川、大阪、愛知における基準値は0.41、0.39、0.42、0.24であった。RSウイルス感染症流行開始の基準値は、RSウイルス感染症の治療薬であるモノクローナル抗体の適切な投与計画に貢献するものであるため、重要な指標であると考えられた。

逐次抽出法による畜水産物の筋肉および牛乳中の残留動物用医薬品の LC-MS/MS 一斉分析法

上村聖子^a，先山孝則^b，浅川大地^b，山野哲夫^c

日本食品化学学会誌, 29(3), 146-155 (2022)

畜水産物の生育・飼育現場では、疾病の予防や治療、生産効率の向上を目的として、各種の動物用医薬品（動薬）が用いられている。また、輸入食品の残留動薬にかかる違反事例では、抗生物質や合成抗菌剤の検出頻度が高い。食品衛生法に基づく行政検査においては、使用量や違反事例の多い動薬の重点的な監視と併せて、ポジティブリスト制度への対応として、より多くの動薬を測定可能な一斉分析法が求められている。

本研究では、効率的な検査体制の構築を目的として、逆相カラムを用いた LC-MS/MS で分析可能な動薬（テトラサイクリン系、ペニシリン系、マクロライド系等の抗生物質およびニューキノロン系、サルファ剤等の合成抗菌剤等）65 物質を対象とし、既存分析法の利点を統合した、有機溶媒系抽出液と水系抽出液を用いた逐次抽出による残留動薬一斉分析法を開発し、妥当性確認を行った。

サケ、エビ、牛の筋肉および牛乳の 4 種類の畜水産物試料を対象とし、有機溶媒系抽出液（アセトニトリル-メタノール（1:1））および水系抽出液（0.01 M-EDTA/0.1 M-クエン酸 /0.2 M-リン酸水素二ナトリウム水溶液、pH4.0）を用いて逐次抽出し、得られた抽出液を SPE カラムおよびアセトニトリル/ヘキサン分配を用いて精製し、LC-MS/MS で測定した。

その結果、分析対象とした 65 物質のうち、サケでは 58 物質、エビでは 51 物質、牛の筋肉では 63 物質、牛乳では 63 物質について本分析法の妥当性が確認された。本分析法により、テトラサイクリン系、ペニシリン系およびマクロライド系抗生物質を含む幅広い動薬の効率的な一斉分析が可能となった。

a 大阪健康安全基盤研究所公衆衛生部疫学解析研究課

b 大阪健康安全基盤研究所公衆衛生部健康危機管理課

c 大阪公立大学大学院医学研究科

日本における RSV 感染症の流行期開始基準値の探索

a 大阪健康安全基盤研究所企画部信頼性保証室

b 大阪市立環境科学研究センター

c 大阪健康安全基盤研究所総務部

LC-MS/MS method for simultaneous determination of veterinary drugs in muscle of animal and fishery products and milk using sequential extraction

Rapid detection and discrimination of potentially toxigenic *Corynebacterium ulcerans* and *Corynebacterium pseudotuberculosis* by multiplex real-time PCR and amplicon melting curve analysis

J. KAWASE^a, T. SAKAI^b, M. IWAKI^c, K. UMEDA^d,
A. FUKUMA^a, N. FUJISAWA^a, Y. KAWAKAMI^a,
H. HAYASHI^a and M. WADA^a

Journal of Microbiological Methods, 195, 106454 (2022)
<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2022.106454>

ジフテリア毒素を産生する *Corynebacterium ulcerans* による感染症は、主に犬や猫との接触によって感染し、重篤な呼吸器症状や皮膚病変を引き起こす。過去には国内でも死亡症例が報告され、近年注目されている動物由来感染症である。また、一部の *Corynebacterium pseudotuberculosis* もジフテリア毒素を産生し、類似した症状を引き起こす。

C. ulcerans 感染患者の治療や原因究明を行うため、菌種同定と毒素遺伝子の検出は重要である。本研究では、DT 遺伝子の検出と、*C. ulcerans* と *C. pseudotuberculosis* の識別が可能な Multiplex リアルタイム PCR 法を開発した。多種類の菌株を用いた検証の結果、本法は目的としている菌種、遺伝子のみを正確に検出できることが明らかになった。

本法は、電気泳動をする必要がなく、2~2.5 時間程度で培養菌体から正確に菌種同定と DT 遺伝子の検出が可能である。*C. ulcerans* 感染患者の治療や感染源の究明、効率的な検査の実施に繋がる有用な方法であると考えられた。

a 島根県保健環境科学研究所

b 島根県浜田保健所

c 国立感染症研究所

d 大阪健康安全基盤研究所微生物部微生物課

マルチプレックス・リアルタイム PCR を用いたジフテリア毒素産生性コリネバクテリウム・ウルセランスおよびコリネバクテリウム・シュードツベルクロシスの検出法

Comparative whole-genome sequence analysis of a BoNT/B5-producing *Clostridium botulinum* isolate from an infant botulism case of unknown source in Osaka, Japan

K. UMEDA^a, Y. HIRAI^a, H. NAKAMURA^a
and K. AMO^b

FEMS Microbiology Letters, 369(1), fnac069 (2022)
<https://doi.org/10.1093/femsle/fnac069>

乳児ボツリヌス症は1歳未満の乳児がボツリヌス芽胞を経口的に摂取後、腸管内で発芽増殖し、産生された神経毒素を吸収することにより発症する麻痺性疾患である。大阪市で発生した、ハチミツの摂取歴がなく、感染源が特定されなかった B 型乳児ボツリヌス症例分離菌の全ゲノム解析結果について報告する。

全ゲノム配列から、MLST 型は新規の ST (ST133) であり、毒素サブタイプは B5 であった。毒素遺伝子は約 274 kbp のプラスミド上にコードされ、水平伝播によりプラスミドを獲得したと考えられた。

全ゲノム SNP 解析を用いて、GenBank に登録されている国内外の B 型ボツリヌス菌の配列と相互比較した結果、分離菌は 2011 年に愛媛県で発生した感染源不明の B 型乳児ボツリヌス症分離株と最も近縁であることが分かった。

両事例は発生年も地理的にも離れており、疫学的な関連性は不明であるが、環境物等の共通する感染源が介在した可能性も考えられた。

a 大阪健康安全基盤研究所微生物部微生物課

b 大阪市立総合医療センター小児救急科

大阪市で発生した原因不明の B 型乳児ボツリヌス症分離株の全ゲノム比較解析

工場で作られた炊飯による食中毒リスクの調査

梅田 薫^a, 松林雄一^b, 中村寛海^a, 松浦義治^c,
吉岡馨子^d, 奥原 潤^c

日本食品微生物学会雑誌, 39(2), 70-76 (2022)

中食、外食産業では、調理作業効率化のため米飯製造施設から米飯を仕入れて提供するスタイルが増加している。これらの米飯は提供されるまでに再加熱等の殺菌工程がない場合が多く、喫食までに微生物汚染を受け、不適切な温度管理等の増殖要因があれば食中毒に発展する可能性がある。過去には大阪市内で米飯を原因とする大規模なブドウ球菌食中毒事例が発生した。

本調査では米飯製造施設における細菌汚染実態、米飯中の菌数挙動および、米飯に接種した黄色ブドウ球菌の挙動とエンテロトキシン産生について検討した。

調査の結果、製造中の汚染は少なかったが、35°Cでの保存試験に伴って生菌数が著しく増加した。黄色ブドウ球菌の接種試験より、経時的な菌の増殖と米飯中のエンテロトキシン産生が見られ、食中毒の発生につながる可能性が示唆された。今回の保存試験の条件下では、米飯に添加された pH 調整剤の明確な静菌作用は認められなかった。

米飯による食中毒予防には、製造から出荷先までの各段階における二次汚染防止や温度管理、時間管理の徹底等の一般衛生管理に係る部分の重要性が再認識された。

大阪府における侵襲性肺炎球菌感染症由来菌株の血清型分布；2018～2021年

河原隆二^a, 山口貴弘^a, 安楽正輝^a, 河合高生^a,
山地良彦^b, 西森彩音^b, 池条裕希絵^b, 上野菜美^b

病原微生物検出情報 (IASR), 44, 7-8 (2023)

2018～2021年に大阪府内で発生した侵襲性肺炎球菌感染症 (IPD) 由来株の血清型別について解析した。大阪府内の IPD 届出件数は 2014 年より増加傾向にあったが、2020 年以降著しく減少し、2021 年の届出件数は最も多かった 2018 年の 33% となった。菌株を収集して解析できたのは 395 件 (51%) であった。全世代を通じて多かった血清型は、12F、10A、15A、35B、15B 型の順で、高齢者では 3 型と 12F 型、児童～成人では 12F 型、小児では 24F 型が最も多かった。上位 5 種類の血清型の年次推移では、2017 年に引き続き 12F 型が 2018 年も最多となったが、その後減少に転じて 2020 年以降ほとんど検出されなかった。新型コロナウイルス感染症のパンデミックがさまざまな感染症の発生状況に影響しており、世界的な IPD の減少、大阪における A 群溶血性レンサ球菌感染症を含む小児感染症の減少が報告されており、大阪府内の IPD も同様の影響が認められた。パンデミックの影響によって手洗いやマスク着用などの生活様式に変化が生じたため、発生が抑制されたと推測された。2017 年から確認されてきた 12F 型の増加は終息し、今後もこのようなワクチン非対応血清型による IPD 増加に注意が必要であることが示唆された。

a 大阪健康安全基盤研究所微生物部微生物課

b 大阪市健康局健康推進部生活衛生課

c 大阪市保健所北部生活衛生監視事務所

d 大阪市保健所食品衛生監視課

The risk of food poisoning associated with cooked rice produced in rice cooking factory

a 大阪健康安全基盤研究所微生物部微生物課

b 大阪府健康医療部保健医療室感染症対策企画課

Serotype distribution of isolates from Invasive Pneumococcal infections in Osaka: 2018-2021

Real-time PCR assays to detect 10 Shiga toxin subtype (Stx1a, Stx1c, Stx1d, Stx2a, Stx2b, Stx2c, Stx2d, Stx2e, Stx2f, and Stx2g) genes

T. HARADA^a, Y. WAKABAYASHI^a, K. SETO^b, K. LEE^b, S. IYODA^b and K. KAWATSU^c

Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 105(3), 115874 (2023)

<https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2022.115874>

3つの志賀毒素1サブタイプ (Stx1a, Stx1c, Stx1d) 遺伝子と7つの志賀毒素2サブタイプ (Stx2a, Stx2b, Stx2c, Stx2d, Stx2e, Stx2f, Stx2g) 遺伝子を検出するため、284のStx遺伝子配列を参照してリアルタイムPCR法を構築した。さらに、3組のMultiplexリアルタイムPCR法 (Multiplex-Stx1; Stx1a, Stx1c および Stx1d 遺伝子, Multiplex-Stx2abe; Stx2a, Stx2b および Stx2e 遺伝子, Multiplex-Stx2dfg; Stx2d, Stx2f および Stx2g 遺伝子) も構築した。

志賀毒素産生性大腸菌 (STEC) 保存株および STEC 以外の菌株を用いて特異度を評価したところ、いくつかの例外はあったものの、従来法とほぼ同程度の特異度であった。また、組換えプラスミドにより、高い定量性と感度が認められた。これらの結果から、今回確立した方法は STEC による食中毒や感染症の疫学調査に有用であると考えられた。

a 大阪健康安全基盤研究所微生物部細菌課

b 国立感染症研究所

c 大阪健康安全基盤研究所微生物部

Stx1a, Stx1c, Stx1d, Stx2a, Stx2b, Stx2c, Stx2d, Stx2e, Stx2f および Stx2g 遺伝子を検出するためのリアルタイムPCR法

Ready-to-eat 食品製造環境のリステリア汚染状況と食品の特性に応じた汚染制御についての考察

中村寛海

月刊 HACCP, 10, 20-25 (2022)

Listeria monocytogenes (LM)は、食品を介してヒトにリステリア症を引き起こす。食品媒介リステリア症の原因食品として最もリスクの高い Ready-To-Eat (RTE)食品 (生食用の食品の他、リステリア属菌の殺菌処理を行うことなく飲食可能な形へと調理された全ての食品) において、Codex (国際食品規格) の基準では、LMの増殖がおきる RTE食品には「25gあたり0」とし、増殖がおきない食品は「100 cfu/g」としている。近年、野菜や果物、アイスクリームや大豆加工品など多岐にわたる食品が原因として報告されるようになった。本稿では、RTE食品としてアイスクリーム類、冷凍果実および大豆製品に着目し、これらを原因として比較的近年に発生したリステリア症事例の紹介と、これらの製造施設における LMの汚染状況および食品の特性や食品中での LMの動態を調べた。製造施設で取り扱う食品の pH や水分活性等は当該食品中での細菌の挙動を知るために不可欠である。同じ種類の食品であっても、原材料の質や製造工程によって違った製品となっている可能性もあるため、最終的には食品に添加し、培養によって LMが増殖するのかどうか、冷凍された食品であれば、冷凍保管中に LMが減少するのかどうかを調べる必要がある。また、今回調査を実施した豆腐製造施設と冷凍ブルーベリー小分け施設は、成分規格のあるアイスクリームを製造する施設に比べて、施設内に生菌数や大腸菌群の高い箇所があったり、LMが検出された。成分規格がなく、また、冷凍などによって長期に流通することが予想される RTE食品を製造する施設は、食品への添加試験を実施するとともに、製造ラインおよび製品を LMに汚染させないよう細心の注意を払う必要がある。

大阪健康安全基盤研究所微生物部微生物課

Prevalence of *Listeria monocytogenes* in Ready-To-Eat food processing environments and consideration of contamination control according to food characteristics

Visitation of African pineapple lily flowers (*Eucomis autumnalis* (Mill.) Chitt. and *Eucomis comosa* Hoult. ex. Wehrh.) by Japanese cockroaches

K. YAMAZAKI

Entomological Communications, 4, ec04027 (2022)
<https://doi.org/10.37486/2675-1305.ec04027>

パイナップルリリー (*Eucomis* 属) は花序の頂にパイナップルのような葉の束をもつユニークな南アフリカ固有の草本植物である。パイナップルリリーの一種である *Eucomis autumnalis* と *Eucomis comosa* は、世界中で鑑賞用の球根植物として栽培されている。原産地では主にクモバチの仲間が花粉を運ぶことが知られている。今回、大阪市内の緑地に植栽されたこれら2種のパイナップルリリーについて、訪花する昆虫類を3シーズン観察した。モリチャバネゴキブリの成虫、若虫が花を訪れ、花蜜を摂食し、背中などに花粉を付着させていた。また、花序の頂にある葉束を隠れ場所として利用していた。アリ、ハエ、コウチュウ類も訪花したが花粉の付着は見られなかった。観察していた株は正常に種子を生産したので、モリチャバネゴキブリが送粉した可能性がある。パイナップルリリーは草丈が数十 cm と比較的長く、特殊な花の構造をもたないため、地表性のゴキブリが送粉者として働いたものと考えられる。

室内塵中の皮膚糸状菌や好ケラチンカビと水虫症状

浜田信夫^a, 御厨真幸^b, 永目知広^b, 馬場 孝^c,
阿部仁一郎^c

日本防菌防黴学会誌, 51(1), 3-12 (2023)

一般住宅の室内塵中のカビ汚染について、夏と冬に好乾性カビや一般カビが検出できる DG18 培地と、皮膚糸状菌を含む好ケラチンカビが検出できるマイコセル (MYC) 培地を用いて調査した。MYC 培地で検出されたカビ数は、DG18 培地でのカビ数の約 1/10 で、皮膚糸状菌以外に 6 属の好ケラチンカビが検出され、とりわけ、*Chrysosporium* と *Scopulariopsis* が多かった。好ケラチンカビは日和見皮膚感染症の原因菌と考えられる。室内塵のカビの季節変化を見ると、一般カビとは反対に、皮膚糸状菌や好ケラチンカビは、冬に増加する傾向があった。水虫の患者宅では、非患者宅に比較して、皮膚糸状菌が有意に多く検出されたが、患者宅の室内塵の約 22% で検出されただけだった。理由として、床に脱落した皮膚糸状菌の優占種の 1 つの *Trichophyton rubrum* は乾燥で死滅しやすいためと思われる。水虫患者が通院することは少ないが、治療すると、室内塵からの皮膚糸状菌の検出率が、未治療の場合の約 1/4 に減少することもわかった。

大阪健康安全基盤研究所微生物部ウイルス課
日本のゴキブリによるパイナップルリリーへの訪花

a 大阪市立自然史博物館
b ダスキン・開発研究所
c 大阪健康安全基盤研究所微生物部ウイルス課
Dermatophytes and other keratinophilic fungi in house dust and human ringworm patients

Increasing seroprevalence but waning herd immunity against measles after elimination: Longitudinal seroepidemiology of measles in Osaka Prefecture, Japan, 2003-2020

T. KURATA^a, T. MIYAMA^b, D. KANBAYASHI^a,
Y. KAIDA^a, I. AOYAMA^a, R. IKEMORI^a, F. BANNO^a,
T. KAWAHATA^a, H. MORI^a,
and K. MOTOMURA^b

Vaccine, 40(46), 6581 - 6588 (2022)

本研究では、厚生労働省感染症流行予測調査事業の一環で、大阪府が2003年以降参加している麻疹抗体価調査のデータから抗体保有率および抗体価、実行再生産数 (Re) を算出し、大阪府内の健常人集団における麻疹抗体の推移を検討した。

調査では2003年-2020年まで毎年、0歳-40歳以上まで、年齢層別にグループ化した健常人ボランティア約250名の血清を採取し、ゼラチン粒子凝集法 (PA法) を用いて麻疹PA抗体価を測定した。解析は対象期間を、2003-2006年 (第1期)、2007-2010年 (第2期)、2011-2014年 (第3期)、2015-2020年 (第4期) の4つの期間に区切って行い、抗体陽性率とPA抗体価を比較した。 Re は、各期の年齢区分毎の抗体保有率と接触マトリックスを用いて算出した。調査参加者は、第1期886人、第2期1,217人、第3期1,069人、第4期は1,544人であった。PA抗体価16以上を陽性と判定した場合、麻疹抗体保有率は第1期 (88.3% CI 86.0-90.3) から第4期 (95.7% CI 94.6-96.7) で増加し、第1期の抗体保有率は他の期に比べ有意に低かった。一方PA抗体価は第1期 (中央値1,024) から第4期 (中央値256) にかけて有意に低下した。麻疹ウイルスの基本再生産数を10とし、感染防御に必要とされるレベル (PA抗体価128以上、256以上) を麻疹抗体陽性とした場合、 Re は第1期 (1.8, 2.3) から第4期 (2.5, 4.8) へと徐々に増加した。これらの知見から、大阪府内の健常人では、2003年以降、麻疹抗体保有率は上昇、維持されているが、ワクチンで獲得した免疫自体は減衰し始めている可能性が示唆された。

a 大阪健康安全基盤研究所微生物部ウイルス課

b 大阪健康安全基盤研究所公衆衛生部疫学解析研究課

麻疹排除後の集団免疫の減衰：大阪府における長期血清疫学調査 (2003-2020年)

Shedding of rubella virus in postsymptomatic individuals; viral RNA load is a potential indicator to estimate candidate patients excreting infectious rubella virus

D. KANBAYASHI^a, T. KURATA^a, A. KAIDA^b,
H. KUBO^b, SP. YAMAMOTO^b, K. EGAWA^b,
Y. HIRAI^b, K. OKADA^b, Y. KAIDA^a, R. IKEMORI^a,
T. YUMISASHI^a, A. ITO^c, T. SAITO^c, Y. YAMAJI^d,
Y. NISHINO^d, R. OMORI^e, H. MORI^a,
K. MOTOMURA^a, and K. IKUTA^{a,f}

Journal of Clinical Virology, 160, 105377 (2023)

背景：1962年に風しんウイルス (RuV) が初めて分離されて以来、風しん患者からのRuVの排出を定量的に評価した包括的なデータは無い。本研究では、風しん患者におけるウイルスRNAおよび感染性ウイルスの排出を評価した。

方法：251名の風しん患者から得られた767検体の血清/血漿、末梢血単核細胞 (PBMC)、咽頭拭い液、尿の分析を行った。ウイルスRNA量および感染性RuVの有無は、逆転写定量ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-qPCR) およびウイルス分離により評価した。結果：咽頭拭い液中のウイルスRNA量、ウイルスRNAと感染性ウイルスの検出割合は、他の検体より有意に高かった。発しん出現後、血清/血漿では2日目、PBMCでは0日目、咽頭拭い液では8~9日目、尿では3日目にウイルスRNA量の中央値が検出下限値を下回った。ウイルスRNA量が多くなると、感染性ウイルスが存在する可能性が高かった。解釈：今回の結果は、風しんの診断、サーベイランスに重要な情報を提供するものである。RT-qPCRの結果から、感染性ウイルスを排出している患者を推定することで、より効率的な風しん対策が可能となり、早期の感染伝播防止に役立つと思われる。

a 大阪健康安全基盤研究所微生物部ウイルス課

b 大阪健康安全基盤研究所微生物部微生物課

c 大阪市健康局大阪市保健所感染症対策課

d 大阪府健康医療部保健医療室感染症対策企画課

e 北海道大学人獣共通感染症国際共同研究所

f 大阪大学微生物病研究所

風しん患者におけるウイルスRNAと感染性ウイルスの排出について

Contribution of parvovirus B19 in suspected cases of measles/rubella in Osaka, Japan, between 2011 and 2021

Y. KAIDA^a, D. KANBAYASHI^a, T. KURATA^a,
and H. MORI^a

Journal of Medical Virology, 95(3), e28593 (2023)
<https://doi.org/10.1002/jmv.28593>

ヒトパルボウイルス B19 (B19V) による伝染性紅斑は、臨床症状による診断が難しく、麻しんや風しんと誤診されることが多い。臨床検査によって麻しん・風しんまたは他のウイルス性疾患を適時に鑑別することは、適切な感染対策を可能にする。本研究の目的は、2011 年から 2021 年までに大阪府内で報告された麻しんと風しん疑い症例における B19V の寄与を明らかにすることである。2011 年から 2021 年までに大阪府内の医療機関で風しん又は麻しんが疑われた 1356 症例のウイルス核酸検査を実施した。その中で、風しんウイルス、麻しんウイルスが検出されたのは、それぞれ 166 症例 (12.2%)、167 症例 (12.3%) で、残りの 1023 症例 (75.4%) の病原因子は不明だった。1023 症例の中で、血液検体が得られた 970 症例についてリアルタイム PCR 法による B19V のスクリーニング検査を行ったところ、136 例 (14%) で B19V が検出された。B19V が検出された症例の 21% は幼児 (9 歳以下) であり、64% は成人 (20 歳以上) であった。系統樹解析の結果、93 株が遺伝子型 1a に属していた。本研究により、発熱発しん性疾患における B19V の重要性が明らかになった。麻しん排除の現状維持と風しん排除のために検査診断の重要性が再確認された。

a 大阪健康安全基盤研究所微生物部ウイルス課
2011 年から 2021 年に大阪で麻しん又は風しんが疑われた症例におけるパルボウイルス B19 の寄与

マルチプレックス PCR 検査が有用であった、皮疹を伴わない水痘帯状疱疹ウイルス髄膜炎の 1 例

西本風里^a, 酒井亮太^a, 大梅成崇^a, 植山浩一^a,
柿下優衣^a, 濱 浩隆^a, 若原良平^a, 西村 章^a,
上林大起^b, 中田恵子^b, 今村卓司^a

感染症学雑誌, 97(2), 47-51 (2023)

患者は 15 歳の女兒。頭痛、発熱、嘔吐後の意識障害で当院に入院した。嘔吐と意識障害は特に治療することなく速やかに改善した。髄膜刺激徴候は認められなかったが、頭痛と発熱が持続したため入院 4 日目に髄液検査を行ったところ、リンパ球増多がみられ、Multiplex PCR 法により水痘・帯状疱疹ウイルス (VZV) DNA が検出された。患者は 4 歳時に水痘に罹患した既往があった。アシクロビルの静脈内投与を 14 日間受けた後、バラシクロビルの経口投与に切り替え、さらに 3 日間投与した。後遺症なく治癒した。小児における VZV 髄膜炎の頻度は低く、皮しんを伴わない症例も数例報告されている。無菌性髄膜炎と診断された症例の中に、皮しんがなくても VZV 髄膜炎症例が存在する可能性があることが明らかになった。マルチプレックス PCR 検査は、早期診断と適切な治療のための重要な手段であると考えられた。

a 医療法人宝生会 PL 病院小児科
b 大阪健康安全基盤研究所微生物部ウイルス課
A case of varicella-zoster virus meningitis without rash diagnosed by multiplex PCR

感染症流行予測調査事業・B型肝炎感受性調査結果 (2018～2021年) -大阪府

阪野文哉^a, 川畑拓也^a, 浜みなみ^a, 青山幾子^a,
倉田貴子^a, 上林大起^a, 池森 亮^a, 改田祐子^{ab},
森 治代^a

病原微生物検出情報 (IASR) , 44(3), 6-7(2023)

流行予測調査事業は、予防接種法に基づき定期予防接種の対象疾病について集団免疫の現状把握(感受性調査)および病原体検索(感染源調査)を行っている。これらの調査結果と疫学情報をあわせて検討することで、予防接種が効果的に行われていることを確認し、長期的な視野で予防接種の対象である感染症の流行を予測することを目的としており、日本の予防接種の基礎資料として活用されている。2016年10月1日よりB型肝炎の定期予防接種が開始され、大阪府は2018年より本事業のB型肝炎感受性調査に参加しており、2018年から2021年まで合わせて983人のB型肝炎の抗体価に関する結果を得た。

B型肝炎のHBs抗体の測定には、2018～2020年はエンザイグノスト”Anti-HBsII”(シーメンズ)を、2021年はHEPATITIS B-anti HBs Quantitative (ExpressBio)を、試薬の添付文書に従い使用した。

B型肝炎ワクチンの定期接種の一般的なスケジュールは、生後2か月、3か月、7～8か月での三回接種となるため、0歳で3回接種を終えていない者、特に5か月齢以下のグループでは調査年によっては抗体化が検出限界以下のグループが多く認められた。定期接種開始以降に生まれた年齢階級2～5歳までの抗体保有率は他の年齢階級と比較して高い傾向がみられる一方で、3回接種済みでも検出限界以下の抗体価であった者も8.7%みられた。

B型肝炎の感受性調査に今後も参加することで、大阪府内におけるB型肝炎ワクチンの定期接種の効果を評価できると考える。

Impact of COVID-19 countermeasures on pediatric infections

N. SAKON^a, T. TAKAHASHI^b, T. YOSHIDA^c,
T. SHIRAI^a, and J KOMANO^d

Microorganisms (2022)

<https://doi.org/10.3390/microorganisms10101947>

ワクチンが導入される以前、COVID-19 に対しては手指衛生、ユニバーサルマスクング、社会的距離の取り方といった一般的な感染対策が社会レベルで実施された。一般的な感染対策の社会的実施が小児感染症に及ぼす抑制効果については体系的に評価することを目的とした。大阪府と岩手県における感染症発生動向調査に基づく小児感染症のうち7疾患を対象とした。週報の2015年から2019年の5年平均と、2020年から2021年の週報と比較した。両地域のCOVID-19の流行の大小にかかわらず、6感染症の割合は2020-2021年に有意に減少した。しかし、6つの感染症の1つであるRSV感染症のみが2021年に流行した。感染症対策の社会的実施は、対策遵守率が高くないはずの低年齢層における特定の感染症の抑制に有効であった。

a 大阪健康安全基盤研究所微生物部ウイルス課

b 大阪府藤井寺保健所生活衛生室検査課 (現所属)

The results of hepatitis B susceptibility surveillance (2018-2021) in Osaka Prefecture in the national epidemiological surveillance of vaccine-preventable disease

a 大阪健康安全基盤研究所微生物部

b 岩手県環境保健研究センター

c 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部

d 大阪医科薬科大学薬学部

COVID-19 対策が小児感染症に与えた影響

Lactobacilli as a vector for delivery of nanobodies
against norovirus infection

Y. YUKI^{a,b,c}, F ZUO^d, S. KUROKAWA^{a,c}, Y.
UCHIDA^{a,c}, S. SATO^{e,f}, N SAKONG^g,
L HAMMARSTRÖM^d, H KIYONO^{a,b,h,i},
and H. MARCOTTE^d.

Pharmaceutics (2023)

<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15010063>

消化管感染症を制御するための経口投与中和抗体は消化管の過酷な環境下で十分な量安定化させる必要がある。そこで消化管感染症であるノロウイルスに対する単一ドメインの Ab (VHH、ナノ抗体) を、有益な腸内常在菌である乳酸菌の細胞表面に発現させた。ヒト人工多能性幹細胞から作製した腸管上皮細胞を用いて、VHH 1E4 が GIL17 ノロウイルスに対して中和活性を示すことを確認した。次に、VHH 1E4 をラクトバチルス・パラカゼイ BL23 で細胞壁固定型として発現させた。VHH 1E4 を発現した乳酸菌は *in vitro* で GIL17 ノロウイルスの複製を阻害した。さらに無菌 BALB/c マウスに経口投与したところ、投与後少なくとも 10 日間、中和活性を有する乳酸菌が腸内に存在することが確認された。このように、細胞壁アンカー型 VHH 発現乳酸菌は、ノロウイルスに対する受動免疫のための魅力的な経口ナノ抗体デリバリーベクターである。

-
- a 東京大学医科学研究所粘膜免疫学部門
b 株式会社 Hana Vax
c 千葉大学医学部病院ヒト粘膜ワクチン学部門
d カロリンスカ大学・スエーデン
e 和歌山県立医科大学薬学部
f 大阪大学微生物病研究所
g 大阪健康安全基盤研究所微生物部
h 千葉大学大学院医学研究院粘膜免疫・アレルギー治療学
i 千葉大学—カリフォルニア大学粘膜免疫・アレルギー・ワクチン サンディエゴセンター・USA
ノロウイルス感染に対するナノ抗体の乳酸菌デリバリーベクター

合成樹脂製の器具・容器包装における溶出試験の
精度の検証

尾崎麻子^a, 六鹿元雄^b, 岸 映里^a,
佐藤恭子^b (他 22 名)

食品衛生学雑誌, 63 (2), 51-61 (2022)

溶出試験は器具・容器包装の規格適合性や安全性を確認するうえで重要な試験法であるが、溶出操作から定量までを含めた溶出試験全体の試験室間共同試験はほとんど実施されていない。そこで、22 機関が参加し、広範なオクタノール/水分配係数を有する 10 物質を添加した 8 種類の合成樹脂製モデル試料を用いて試験室間共同試験を行い溶出試験全体の精度を検証した。その結果、HorRat (r) は大部分が基準を満たしたが、HorRat (R) は基準を超過したものが多かった。そのため、単一試験室で行うには精度は概ね確保されるが、試験室間の精度には問題があった。この主な原因としては、試験機関間における溶出操作時の温度や時間管理等の試験溶液の調製操作の差異によるものと考えられた。

-
- a 大阪健康安全基盤研究所
b 国立医薬品食品衛生研究所
Validation study on migration test for plastic food utensils, containers, and packaging

台所用洗淨剤中のメタノール改良分析法の
室間共同実験

阿部 裕^a, 尾崎麻子^b, 六鹿元雄^a,
佐藤恭子^a (他 12 名)

食品衛生学雑誌, 63 (2), 97-103 (2022)

台所用洗淨剤中のメタノール (MeOH) 分析法について、汎用性の高いキャピラリーカラムを用いた改良分析法を考案し、10 試験所が参加する室間共同実験を行った。濃度非明示で2濃度の試料を配付し、プロトコールに従い試料中の MeOH を定量した。得られた試験所の分析結果を基に、国際的なハーモナイズドガイドラインに沿って統計的に解析した。共同実験の結果として推定された室間再現相対標準偏差 (RSD_R) と Horwitz/Thompson 式を用いて計算した予測室間相対標準偏差 (PRSD_R) から HorRat 値を算出した。その結果、2 試料の HorRat 値は 0.8 および 1.8 となり、Codex 委員会が分析法承認のために設定している性能規準の指標である 2 未満を満たした。したがって、本分析法は規格の判定を行う分析法として期待できる性能を有していると判断した。

市販魚介加工品の総水銀調査

油谷藍子, 仲谷 正, 尾崎麻子,
山口之彦, 山野哲夫

食品衛生学雑誌, 63(2), 85-91 (2022)

2013 年から 2018 年に大阪市内で購入した魚介加工品 112 検体について、加熱気化水銀計を用いて総水銀を測定した。その結果、マグロ加工品の総水銀濃度は平均 0.115 µg/g (中央値 0.070 µg/g) であった。中でもビンナガマグロを原材料とした加工品の総水銀濃度は高く、平均 0.301 µg/g (中央値 0.296 µg/g) であった。今回調査した魚介加工品の総水銀濃度はマグロ類を原材料とした加工品および混合削り節 (サバ、イワシおよびアジの削り節) を除いて概ね低く、0.1 µg/g 未満であった。

今回の調査結果と日本人の平均的な食生活での魚介加工品摂取量から推定した体重 50 kg の人の総水銀摂取量は 0.13 µg/kg 体重/週であり、FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議が評価した総水銀の暫定的耐容週間摂取量 4.0 µg/kg 体重/週の 3.3% に相当する量であった。

以上より魚介加工品の摂取は通常の摂食では問題ないが、妊婦が総水銀濃度の比較的高いビンナガマグロを原材料としたツナ缶を日常的に摂食した場合には食品安全委員会が評価した妊婦に対するメチル水銀の耐容週間摂取量 (2 µg/kg 体重/週) を超過する可能性が示唆された。

a 国立医薬品食品衛生研究所

b 大阪健康安全基盤研究所

Inter-laboratory study on the modified method assessment for the determining methanol content in kitchen detergents

大阪健康安全基盤研究所衛生化学部食品化学 2 課

Survey of total mercury content in fishery products

物理的再生法により製造された PET ボトルを液状調味料および食用油の容器に適用した場合の安全性評価

近藤康一^a, 小塚莉加^b, 桑垣傳美^c, 高橋章仁^d, 長野 学^e, 平野尚美^f, 廣澤 憲^b, 杉山健一^a, 尾崎麻子^g

日本食品化学学会誌, 29 (1), 19-27 (2022)

物理的再生 (MR) 法により製造された PET ボトルを、液状調味料および食用油容器へ適用した場合の安全性を評価した。溶出試験に使用した MR-PET ボトルは、8 種類の代理汚染物質により意図的に汚染させた PET フレークを、実際の MR 工程を通過させて汚染物質残量を低減させた MR-PET ペレットから作製した。溶出条件は、調味料等の最長の賞味期限である 25°C -2 年に相当する 40°C -5 ヶ月とし、調味料や食用油の特性を考慮して食品擬似溶媒を選択した。その結果、ボトルから食品擬似溶媒へ溶出した代理汚染物質の濃度は、いずれも厚生労働省が食品用器具及び容器包装における再生プラスチック材料の使用に関する指針にて提示している推奨溶出限度値である 10 ng/mL を下回っていた。シミュレーションソフトを用いて、食品擬似溶媒への代理汚染物質の溶出量を推定した結果、25°C -2 年および 40°C -5 ヶ月の溶出条件において、限度値 10 ng/mL に対して十分に低い濃度であることが示唆された。また、アンチモンの水系食品擬似溶媒への溶出量も食品衛生法の規格値 (50 ng/mL) を下回っていた。以上の結果から、MR-PET ボトルは、厚生労働省の指針を十分に満足しており、液状調味料および食用油の容器として問題なく使用できることを確認した。

a 株式会社 Mizkan Partners

b 株式会社 Mizkan

c キッコーマンビジネスサービス株式会社

d キッコーマン食品株式会社

e キューピー株式会社

f 日清オイリオグループ株式会社

g 大阪健康安全基盤研究所

Safety evaluation of PET bottles regenerated through mechanical recycling for use as liquid-seasoning and edible-oil containers

Development of a solid phase extraction-based method for the quantitative analysis of methylmercury in soil and sediment

S. KAKIMOTO^a, M. YOSHIMITSU^b and K. KIYOTA^a

Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 109 (2), 332-337 (2022)

水銀は、環境汚染の拡大が懸念されており、海洋や土壌中の微生物により毒性の強いメチル水銀となる。その含有量を把握するためには、高い信頼性と汎用性を備えた分析法が必要である。環境省により定められている分析法では、有害な試薬、管理が特殊な分析機器を使用するという問題点がある。そこで、汎用な固相カラムを使用し、有害な試薬を使用しない、GC/MS で分析する簡便・迅速な土壌・堆積物中のメチル水銀分析法を構築した。3 種類の試料を用いて分析法の妥当性を確認したところ、真度は 96.2~102.6%、室内精度および併行精度は 3.4~7.1%、定量下限は 7.5 ng/mL であり、土壌・堆積物中のメチル水銀分析法として信頼性の高い分析法であることが示された。今後、手順を最適化し、定量下限をより低濃度にするにより、土壌・堆積物に含まれる低濃度メチル水銀の実態調査に用いることができると考えられた。

a 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部食品安全課

b 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部食品化学課
固相カラムを用いた土壌・堆積物中メチル水銀の簡便・迅速な分析法の開発

Determination of degradation degree of ovalbumin in hen's egg enzymatic hydrolysates using liquid chromatography–tandem mass spectrometry

K. KIYOTA^a, M. YOSHIMITSU^b, and H. MATSUI^b

Journal of Food Measurement and Characterization,
17(1), 46–53 (2023)

鶏卵タンパクは、酵素加水分解により、保湿性等の優れた機能が引き出され、一方でそのアレルギー性は減弱される。鶏卵酵素加水分解物の品質とアレルギー摂取リスクを管理するためには、加水分解の進行を制御することが必要である。

そこで本研究では、液体クロマトグラフ質量分析計を利用した分析法（MS法）を適用して、鶏卵卵白の主要なタンパク質かつアレルギーであるオボアルブミン（OVA）を指標に、鶏卵酵素加水分解物の分解度を測定することを目的とした。汎用的なタンパク分解酵素の反応により得られたOVA加水分解物において、MS法とサイズ排除クロマトグラフィー法で分解度をそれぞれ測定したところ、両法の分解度には高い相関性があった（ $r > 0.96$, $p < 0.001$ ）。また、鶏卵卵白の酵素加水分解物において、OVAの添加回収率は81.1–114.8%で良好であった。

以上より、MS法を適用することで、従来の免疫学的手法では分析困難とされていた鶏卵酵素加水分解物中の正確なOVA定量が可能となり、その定量値を利用して分解度の測定が可能であることが示唆された。今後、MS法は、鶏卵酵素加水分解物を使用した食品、栄養補助食品、医薬品、化粧品等の製品の品質向上に役立つことが期待される。

a 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部食品安全課

b 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部食品化学課

LC-MS/MSを利用した鶏卵酵素加水分解物に含まれるオボアルブミン分解度の測定

Determination of potential volatile compounds in polyethylene terephthalate (PET) bottles and their short- and long-term migration into food simulants and soft drink

A. OZAKI^a, E. KISHI^a, T. OOSHIMA^a,
N. KAKUTANI^a, Y. ABE^b, M. MUTSUGA^b,
Y. YAMAGUCHI^a and T. YAMANO^a

Food Chemistry (2022)

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133758>

清涼飲料用ポリエチレンテレフタレート（PET）ボトルから溶出する可能性のある揮発性化合物についてヘッドスペース（HS）-GC-MSを用いて分析し、6化合物を同定した。次に、ページ&トラップ（PT）-GC-MSを用いて、PETボトルにおいて液体を短期および長期間保存した後の溶出量を定量するために、迅速、簡便、正確な同時分析法を確立した。未使用のペットボトルを用いて25°Cで2年間保存した際の水および50%エタノールへの2-メチル-1,3-ジオキソランの最大移行量は、それぞれ2.3および19 ng/mLであった。国内外で販売されている市販のボトル入りミネラルウォーターからも同様に2-メチル-1,3-ジオキソランが検出された。一部の製品ではノナールも検出されたが、2-メチル-1,3-ジオキソランが主な揮発性化合物であることが確認された。最後に、2-メチル-1,3-ジオキソランのヒトへのばく露量を、日本における清涼飲料水の一人当たりの摂取量と本研究での移行量に基づいて推定した。

a 大阪健康安全基盤研究所

b 国立医薬品食品衛生研究所

ポリエチレンテレフタレート（PET）ボトルに含まれる揮発性化合物の同定ならびに食品擬似溶媒や清涼飲料水への短期および長期の移行について

GC-MS を用いた合成樹脂製器具・容器包装に含まれる化学物質の同定

尾崎麻子, 水口 (深瀬) 智晴, 岸 映里,
山口之彦, 山野哲夫

日本食品化学学会誌, 29 (3), 164-178 (2022)

ポジティブリスト (PL) 制度への適合性判定に資する基礎データの蓄積のため、合成樹脂製器具・容器包装に含まれる化学物質を GC-MS を用いて網羅的に分析した。PL に収載されている添加剤等約 130 物質の標準品を分析し、マススペクトルを確認するとともに保持指標 (RI) を算出しライブラリー登録値と比較した。その結果、比較できたほとんどの物質の RI 実測値とライブラリー登録値の比率は 1.0 であり非常によく一致した。これより、合成樹脂製品から未知ピークが検出された際にはマススペクトルだけでなく RI をライブラリーと比較することでより確実な物質同定が可能であることが示された。汎用樹脂であるポリプロピレン、ポリエチレン、ポリスチレンおよびポリエチレンテレフタレート製の合成樹脂製器具・容器包装を対象とし、含有される化学物質を同定・推定した。その結果、合成樹脂製品から検出された 104 物質のうち 61 物質が同定・推定され、その約半分は PL 収載物質であった。しかしながら、残り半分は非収載物質であり、その多くが合成樹脂や添加剤等の分解物、不純物、副生成物等である非意図的添加物質 (NIAS) であると考えられた。

大阪健康安全基盤研究所

GC-MS analysis for the identification of chemical substances in food utensils, containers and packaging

Oxidation of 3'-methoxyflavone, 4'-methoxyflavone, and 3',4'-dimethoxyflavone and their derivatives having 5,7-dihydroxyl moieties by human cytochromes P450 1B1 and 2A13

T. SHIMADA^a, H. NAGAYOSHI^b, N. MURAYAMA^c,
A. SAWAI^a, V. KIM^d, D. KIM^d, H. YAMAZAKI^c,
F. P. GUENGERICH^c and S. TAKENAKA^a

Xenobiotica, 52(2), 134-145 (2022)

3'-メトキシフラボン、4'-メトキシフラボン、および3',4'-ジメトキシフラボンとそれらの5,7-ヒドロキシル基を有する誘導体のヒト CYPB1 および CYP2A13 酸化について LC-MS/MS で探索した。3'-メトキシフラボンと 4'-メトキシフラボンは主に O-脱メチル化されて 3'-ヒドロキシフラボンと 4'-ヒドロキシフラボン、さらに酸化して 3',4'-ジヒドロキシフラボンへと変化した。またいずれの誘導体に対しても CYP2A13 より CYP1B1 の方が高い反応性を示した。

4'-メトキシ-5,7-ジヒドロキシフラボン (アカセチン) は CYP1B1 および 2A13 によって脱メチル化され、4'-5,7-トリヒドロキシフラボン (アピゲニン) を形成することがわかった。また、3'-メトキシ-5,7-ジヒドロキシフラボンもどちらの P450 によっても脱メチル化されたが、この場合は CYP2A13 のほうが高活性であった。3',4'-ジメトキシフラボンは CYP1B1 と反応したが CYP2A13 の基質とはならなかった。in vitro 実験によって得られた結果は PC を用いた分子ドッキング分析によっても十分支持される結果であった。

a 大阪府立大学大学院総合リハビリテーション学研究所

b 大阪健康安全基盤研究所

c 昭和薬科大学

d 建国大学校

e ヴァンダービルト大学医学部

ヒトチトクローム P4501B1 および 2A13 による 3'-メトキシフラボン、4'-メトキシフラボン、および 3', 4'-ジメトキシフラボンおよび 5,7-ジヒドロキシル部分を有する誘導体の酸化

スポンジたわしを介した調理用ボウル間の
小麦アレルゲンの二次汚染

橋本博行^a, 池田達哉^b, 吉光真人^c, 清田恭平^d

食品衛生学雑誌, 63(2), 70-78 (2022)

小麦粉バター液を調製後、その調理器具の洗浄に使用したスポンジたわしには、小麦粉が残留する可能性がある。このようなスポンジたわしを洗浄に継続して使用すれば、調理器具間で小麦アレルゲンの二次汚染の発生が考えられる。

そこで本研究では、小麦粉の二次汚染の発生可能性、およびスポンジたわしにおける小麦粉成分の残留実態を明らかにするために、モデル実験を基に調査を実施した。その結果、スポンジたわしを介した調理器具間の小麦粉の二次汚染は、陽性率約 80% で発生した。洗浄とすすぎ操作後のスポンジたわしにはバター液の残留が確認され、その残留率は 20% 程度であった。さらに、スポンジたわしにおける残留状態を詳細に観察したところ、グルテン等のタンパク質がスポンジたわしのセル骨格や骨格間に付着し、そのタンパク質にデンプン粒が付着していた。このようなスポンジたわしに対して、すすぎ操作を追加したものの、小麦アレルゲンの完全除去は困難であった。

以上より、アレルゲン混入リスクを回避すべきアレルギー対応食等の調理施設において、小麦を使用した調理器具の洗浄には、専用化したスポンジたわしの使用が望ましいと考えられる。

Simultaneous determination of five triarylmethane
colorants in syrup by applying multivariate curve
resolution to second-derivative visible absorption spectra

H. MATSUI^a and T. YAMASAKI^b

Analytical Sciences, 39(1), 77-85 (2023)

本研究ではケモメトリックスの手法の1つである **Multivariate Curve Resolution** 法を 2 次微分可視吸収スペクトルに適用することで、シロップ中に含まれる、化学的に類似した構造・性質を有する 5 種類のトリアリールメタン系着色料 (ブリリアントブルー FCF、パテントブルー-V、パテントブルー-VF、ファストグリーン FCF、グリーン S) を同時に定量する分析手法を開発した。

無色のシロップに対して行った添加回収試験において、本手法は 5 成分全てについて決定係数 0.90 以上、予測最小二乗誤差 0.20 mg/L 未満、検出限界 0.50 mg/L 未満と良好な性能を達成した。また検討の結果、クエン酸緩衝液と炭酸緩衝液の 2 種類の緩衝液での測定データを統合すること、ならびに 2 次微分スペクトルへ適用することによって、分析対象物質への特異性が向上することを明らかにした。

さらに、ガウス関数の 2 次導関数を基底とした基底関数展開を利用して妨害物質のスペクトルを推定する手法を新たに開発した。開発した手法は検証のために意図的に添加した妨害物質のスペクトルを精度良く推定することに成功した。

これらの成果をふまえて、実際の市販品に開発した分析手法を適用したところ、液体クロマトグラフィーを用いた従来の手法によるものとよく整合した結果が得られた。

開発した手法により、従来の手法に比べて試料の精製手順を大きく簡略化することに成功した。また、データ解析の手法も他の物質へと応用可能であることから、本研究は着色料のみならず他の様々な物質に対する新たな迅速分析手法の開発に資することが期待される。

a 三重短期大学

b 農研機構西日本農業研究センター

c 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部食品化学課

d 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部食品安全課

Secondary contamination by wheat allergens across cooking bowls through the use of sponge scourers

a 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部食品化学課

b 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部食品安全課

2 次微分可視吸収スペクトルへの **Multivariate Curve Resolution** 法の適用によるシロップ中の 5 種のトリアリールメタン系着色料の同時定量法

エンメイソウについて
HPLCによるエンメイン分析法の検討と
市場品の分析

田上貴臣^{a, b}, 石田晃大^b, 石原理恵^b,
伊藤美千穂^b, 大井逸輝^b, 岡坂 衛^b,
河端昭子^b, 酒井英二^b, 蔦原稜太^b, 西尾雅世^b,
松田久司^b, 森川敏生^b, 山本 豊^b, 横倉胤夫^b

生薬学雑誌, 76(2), 37-44 (2022)

エンメイソウは日本薬局方外生薬規格 2018 に収載されており、その基原はヒキオコシ又はクロバナヒキオコシの地上部であると規定されている。エンメイソウは胃腸薬等に配合されている他、健康食品や化粧品にも配合されている。

本研究ではエンメインを品質評価の指標とし、HPLCによるエンメイソウ中のエンメイン分析法の検討を行った。その結果を以下に示す。

- (1) エンメイソウ中のエンメインについて、分析バリデーションを実施し、HPLCによる定量法を確立した。
- (2) 確立した分析法を用いてエンメイン含量を測定したところ、以下の結果が得られた。
 - a) 細かく刻んだ葉に対する粉碎した葉のエンメイン含量は、51.9~184.0%となり、有意差は認められなかった ($p < 0.05$)。
 - b) 茎の含量は、葉のエンメイン含量に対して0~4.0%であり、茎には葉に比べてわずかなエンメインしか含まれていなかった。
 - c) 市場品7検体について、葉及び茎のエンメイン含量と葉及び茎の質量から、当該市場品の含量を算出したところ、0.010~0.181%であった。
- (3) 採取品について、自然乾燥及び機械乾燥の影響を調べたところ、自然乾燥では約40%の含量低下が認められた。また、機械乾燥においても約30%の含量低下が認められたが、温度による差はほとんど認められなかった。

a 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部医薬品課

b 生薬品質集談会

Studies on ISODONIS HERBA

Changes in bacterial diversity and community structure
in drinking water distribution system revealed by high
throughput sequencing

Y. KOIZUMI^{a,b}, T. ICHIJO^{c,d}, K. UCHII^e
and M. NASU^{b,f}

Journal of Microorganism Control, 28(1), 27-34 (2023)

上水道配水システム (DWDS: Drinking Water Distribution System) における細菌群集構造と多様性の変化をポータブルシーケンサー MinION (Oxford Nanopore Technologies, Oxford, UK) を用いた 16S rRNA 遺伝子アンプリコンシーケンス法で解析した。対象設備としては、他の浄水施設の水が混入しない緩速砂ろ過を採用した DWDS を選んだ。試料は 2021 年 4 月から 8 月にかけて、原水である渓流水、浄水処理施設の着水、砂ろ過水、塩素処理水および配水過程の配水池、末端の給水栓で採取した。

細菌群集の多様性についてシャノンインデックスを用いて評価した結果、門、綱、属のすべてのレベルにおいて、塩素処理により多様性が減少していた。属レベルの群集構造を非計量多次元尺度法 (NMDS) により解析したところ、緩速砂ろ過と塩素消毒により細菌群集構造が大きく変化していることが示唆された。

ポータブルシーケンサーによる DWDS 中の細菌の定期的なモニタリングにより、指標となる細菌の存在量や、属・種レベルでの群集構造の変化を短時間のうちに把握することができる。このような情報は処理プロセスの微生物学的制御に直接的に貢献するものであり、DWDS 中の細菌の変化を理解することにより異常事態が発生する前に迅速な行動が可能となる。

a 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部生活環境課

b 大阪大谷大学大学院薬学研究科

c 大阪樟蔭女子大学健康栄養学部

d 大阪樟蔭女子大学大学院人間科学研究科

e 大阪大谷大学薬学部

f 大阪大学

ハイスループットシーケンシングによる上水道配水システムにおける細菌多様性と群集構造の解析

Role of nitrous acid in the association between nitrogen dioxide and asthma symptoms: effect of nitrous acid exposure on specific airway resistance in guinea pigs

M. OHYAMA^a, K. AZUMA^b, C. MINEJIMA^c,
N. TAKENAKA^d and S. ADACHI^e

Environmental Sciences Europe, 34, 112 (2022)
<https://doi.org/10.1186/s12302-022-00693-1>

二酸化窒素 (NO₂) が喘息と関連することは疫学調査で示唆されている。しかし、NO₂ 測定は亜硝酸 (HONO) も NO₂ として検出するため、疫学調査での関連が NO₂ と HONO のどちらに起因するかは不明である。動物実験における喘息への影響指標には肺抵抗や気道抵抗が用いられる。ラット曝露実験において、肺抵抗を HONO は亢進するが、NO₂ は亢進できず、NO₂ より HONO の方が喘息への影響が強いことが示唆されている。但し、NO₂ のモルモット曝露実験では 2 ppm 以上の 12 週間曝露で特異的気道抵抗 (sRaw) の亢進が観察されている。本研究の目的は、HONO のモルモット曝露実験で sRaw への影響を調べ、NO₂ の知見と比較をすることである。モルモットを 3 群に分け 7 週間 HONO 曝露を行い (各群の HONO 濃度 : 0.02、0.66、3.43 ppm) 毎週 sRaw 測定した結果、曝露 4 週目以降で 0.02 ppm 群 (対照群) と比較して HONO 濃度に依存して有意に sRaw が亢進した。今回の結果は、sRaw において、HONO の最小毒性濃度が 0.66 ppm 未満であること、HONO は NO₂ より短期間・低濃度で sRaw を亢進すること、さらに、疫学調査における NO₂ と喘息症状の関連は HONO に起因する可能性を示唆する。

a 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部生活環境課

b 近畿大学医学科

c 国際基督教大学リベラルアーツ

d 大阪公立大学現代システム科学研究科

e 相模女子大公衆衛生

二酸化窒素と喘息症状との関連における亜硝酸の役割 :
モルモットの特異的気道抵抗に対する亜硝酸曝露の影響

Microbial water quality assessment of private wells using 16S rRNA gene amplicon sequencing with a nanopore sequencer

M. MIMURA^{ab}, Y. KOIZUMI^{ab}, M. WADA^c,
T. ICHIO^{d,e}, K. UCHII^f and M. NASU^b

Biological and Pharmaceutical Bulletin,
46, 263–271 (2023)

井戸水は、身近な家庭用水源として世界中で日常的に利用されている。水道の普及率が高い日本では、非飲用水として利用されていることが多い。散水などに利用される場合、バイオエアロゾルが発生しエアロゾル感染の原因となる可能性がある。

現在、井戸水の微生物学的水質検査は、糞便汚染の指標となる大腸菌の検出と、標準寒天培地や R2A 寒天培地などを用いた培養法でコロニーを形成する細菌の検出である。しかし、例えばレジオネラ属菌などのエアロゾル感染症起因菌は、一般的な培地を用いた培養法では検出が困難なものが多い。そこで、井戸水の微生物学的水質を確保するために、より包括的な評価法の採用が望ましい。

今回、MinION シーケンサを用いて、異なる環境にある 5 本の井戸の井戸水中の細菌群集構造を解析した。16S rRNA 遺伝子の全長配列に基づいて細菌を種レベルまで特定することができた。その結果、5 本の井戸の井戸水中の細菌群集構造の違いが明らかとなった。また、従来法では検出が困難であった日和見感染症の起因菌の検出に成功し、新たな指標細菌候補として *Legionella pneumophila* と *Aeromonas hydrophila* を検出した。

本研究で用いた網羅的な解析手法は、井戸水の衛生微生物学的水質を高精度に評価する手法として、今後日常的に適用されることが期待される。

a 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部生活環境課

b 大阪大谷大学大学院薬学研究科

c 大阪府立環境農林水産総合研究所

d 大阪樟蔭女子大学健康栄養学部

e 大阪樟蔭女子大学大学院人間栄養学専攻

f 大阪大谷大学薬学部

ナノポアシーケンサを用いた 16S rRNA 遺伝子アンプリコンシーケンスによる井戸水の衛生微生物学的水質評価

Exposure to organophosphorus compounds of Japanese children and the indoor air quality in their residences

T. YOSHIDA^a, M. MIMURA^a and N. SAKON^b

Science of the Total Environment, 850, 158020 (2022)

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.158020>

住居内で主に殺虫剤や難燃剤として使用される有機リン系化合物の中には、発がん性や内分泌系への影響が疑われるものが存在する。本研究では、子どもにおける有機リン系化合物の一日の総摂取量とそれに及ぼす彼らの自宅室内空気質の影響について解明することを目的とした。

大阪府内在住の子ども 132 名を対象とし、彼らの寝室空気中の有機リン系化合物の濃度および起床直後の尿中のこれらの代謝物量を調べた。殺虫剤の空気試料からの検出率は難燃剤（リン酸トリエチル、リン酸トリ-n-ブチル）よりも低かった。主な化合物の一日の総摂取量 ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$, 中央値) は、クロルピリホス 0.042、ダイアジノン 0.067、リン酸トリ-n-ブチル 0.094 であり、これらの一日総摂取量の 95 パーセンタイル値は、いずれも WHO などの示す一日摂取許容量を超過しなかった。しかし、リン酸トリ-n-ブチルの一日総摂取量の最高値は許容量の約 2 倍であり、調査対象者におけるその尿中代謝物の検出頻度と濃度レベルは、ともに他の多くの国の子どもよりも高い傾向であった。在宅中におけるリン酸トリ-n-ブチルの曝露に関し、総摂取量に対する吸入による摂取量の割合は、中央値としてわずかに 2.3%であった。

吸入は有機リン系化合物の曝露経路として大きく寄与せず、それらの一日総摂取量に対する室内空気質の影響は比較的小さいことが示唆された。また、有機リン系殺虫剤の曝露量は、通常我国の子どもの健康に悪影響を及ぼすレベルではないと推定された。

a 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部生活環境課

b 大阪健康安全基盤研究所微生物部ウイルス課

子どもにおける住宅内での有機リン系化合物の曝露と室内空気質の寄与

Development and validation of an analytical method for simultaneous determination of perfluoroalkyl acids in drinking water by liquid chromatography/tandem mass spectrometry

N. KOBAYASHI^a, S. TAKAGI^b, T. KINOSHITA^c,
O. SAKATA^d, F. NAKANO^e, N. WATANABE^f,
A. NOMURA^g, N. KAWAI^h, T. HIRAIWAⁱ,
M. OKUMURA^j, K. FURUKAWA^k, T. KASUYA^l,
N. IWAMA^m, J. YONEKUBOⁿ, R. TAKAHARA^o,
S. TANAKA^p, Y. TSUCHIYA^a and Y. IKARASHI^a

Journal of Water and Environment Technology, 20(6),
219-237 (2022)

液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析計を用いた水道水中の 21 種類のパーフルオロアルキル酸 (PFAA) の一斉分析法を開発するため、16 機関による分析法のバリデーション試験を実施した。多くの PFAA の回収率は、対応する ^{13}C -PFAA をサロゲートとして補正した場合、真度、併行精度および室間精度は満足できるものであった。したがって、対象 PFAA と同様の回収特性を持つサロゲートを用いて回収率を補正する必要があることがわかった。

a 国立医薬品食品衛生研究所生活衛生部第三室

b 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部生活環境課

c 東京都健康安全研究センター事業環境科学部

d 埼玉県衛生研究所

e 神奈川県衛生研究所

f 広島市水道局

g 川崎市上下水道局

h 福山市上下水道局

i 神奈川県企業局

j 名古屋市上下水道局

k 一般社団法人三重県環境保全事業団

l 一般社団法人千葉県薬剤師会

m 一般財団法人岐阜県公衆衛生検査センター

n 日本ウォーターズ株式会社

o ジーエルサイエンス株式会社

p アジレント・テクノロジー株式会社

液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析計を用いた水道水中パーフルオロアルキル酸の一斉分析法開発と妥当性評価

Novel automated identification and quantification database using liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry for quick, comprehensive, cheap and extendable organic micro-pollutant analysis in environmental systems

K. KADOKAMI^a, T. MIYAWAKI^a, S. TAKAGI^b,
K. IWABUCHI^c, H. TOWATARI^d, T. YOSHINO^e,
M. YAGI^f, Y. AITA^f, T. ITO^g, S. TAKEMINE^g,
D. NAKAJIMA^h and X. LIⁱ

Analytica Chimica Acta, 1238, 340656 (2023)
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2022.340656>

人の健康や環境を守るために有害化学物質の高効率・低コスト・省力化・グリーン分析が急務となっている。これを達成するために我々は、LC-QTOF-MSを用いたデータベースを用いた自動同定・定量システム(AIQS)を新たに開発し、このAIQSの精度を検証した。208種類の農薬標準物質について2濃度で7台の装置を用いて測定した。真度は平均でそれぞれ106および95%、農薬類の90%が相対標準偏差30%以下であった。5機関で河川水試料を用いて200種類の農薬の回収テストをした。平均回収率は72%となり、精製水を用いた場合よりも15%低くなった。平均相対標準偏差は、標準物質の測定値よりも30%悪化した。しかし、回収率および再現性は、厚生労働省の示す目標を満たした。AIQSは、新規物質の追加や追加後の遡及分析が容易である。実試料に適用した結果、AIQSは環境試料中の多数の物質に対するターゲットスクリーニング法として十分な同定・定量性能を有することが示された。

a 北九州市立大学

b 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部生活環境課

c 岩手県環境保健研究センター

d 福岡市保健環境研究所

e 神戸市健康科学研究所

f 株式会社エービー・サイエックス

g 埼玉県環境科学国際センター

h 国立環境研究所

i 大連理工大学

環境中の有機微量汚染物質の迅速かつ網羅的分析のための液体クロマトグラフィー四重極飛行時間質量分析法を用いた新規自動同定・定量化データベースについて

高速液体クロマトグラフ質量分析計(LC-MS/MS)を用いたアルデヒド前駆体20物質の一斉分析法の開発

小池真生子, 吉田 仁, 山口進康

水道協会雑誌, 91(5), 2-11 (2022)

浄水処理によりホルムアルデヒド等を生成する「アルデヒド前駆体」のうち23物質について一斉分析法を検討し、その分析精度の評価を行った。

分析条件の検討の結果、アルデヒド前駆体23物質のうち20物質がLC-MS/MSで分離することができた。これら20物質について、分析法の妥当性評価を行ったところ、19物質が厚生労働省の示す妥当性評価ガイドラインの目標を満たし、精度の高い分析法を開発することができた。開発した一斉分析法を用いて、大阪府内の河川を対象に、アルデヒド前駆体の実態調査を行った結果、全ての地点において定量下限値(0.0005~0.01 mg/L)未満であった。今回開発した方法は迅速に分析が可能なることから、水質汚染事故等の緊急時にも有用な方法であると考えられた。

大阪健康安全基盤研究所衛生化学部生活環境課

Development of an analytical method for simultaneous determination of the 20 aldehyde precursors using a high-performance liquid chromatograph-mass spectrometer (LC-MS/MS)

大阪府内浄水場におけるフィプロニルおよび
フィプロニル分解物 4 種の実態調査

小池真生子^a, 長谷川有紀^a, 高木総吉^a,
吉田 仁^a, 安達史恵^a, 小泉義彦^a, 中島孝江^a,
竹中凜代^b, 山口進康^a

水道協会雑誌, 91(11), 2-9 (2022)

水環境中におけるフィプロニル (FIP) および分解物 4 種 (FIP-SFI, FIP-DSF, FIP-SFO および FIP-DTFMS) の検出状況を明らかにすることを目的として、大阪府内の浄水場において夏季 (6 月) および冬季 (1 月) に実態調査を行った。その結果、夏季原水において、FIP は 5 地点 (濃度: 0.00058~0.0025 µg/L)、FIP-SFI は 5 地点 (濃度: 0.00089~0.0041 µg/L)、FIP-DSF は 3 地点 (濃度: 0.00097~0.0027)、FIP-SFO は 6 地点 (濃度: 0.00057~0.0018) からそれぞれ検出された。冬季原水において、FIP は 2 地点 (0.00055 または 0.00057 µg/L)、FIP-SFI は 2 地点 (濃度: 0.00098 または 0.0010 µg/L)、FIP-SFO は 3 地点 (濃度: 0.00057~0.00098 µg/L) からそれぞれ検出された。一方、夏季浄水では FIP-DSF が 0.00052 µg/L、冬季浄水では FIP-SFI が 0.00081 µg/L 検出された。検出濃度は FIP 分解物を合算した最大検出濃度を原体である FIP の目標値 (0.5 µg/L) と比較しても十分に低い濃度であった。さらに原体である FIP を合算した最大検出濃度においても、同様に低い濃度であった。しかし、原体である FIP よりも分解物が占める割合が多かったことから、原体だけでなく分解物もモニタリングする必要があると考えられた。

ガスクロマトグラフ-質量分析計 (GC/MS) を
用いた水道水中イプフェンカルバゾンの
分析法検討

吉田 仁, 高木総吉

水道協会雑誌, 91(7), 9-12 (2022)

水道水中のイプフェンカルバゾンの検査法として、固相抽出-ガスクロマトグラフ-質量分析計による一斉分析法 (別添方法 5 の 2) が適用可能か判定するために妥当性評価を実施した。検量線の妥当性評価を実施した結果、真度 92~105%、精度 1~3%となった。また、イプフェンカルバゾンの目標値の 1/100 である 0.000020 mg/L を水道水に添加して添加試料の妥当性評価を実施したところ、真度 114%、併行精度 4%となった。検量線、添加試料のいずれもガイドラインの目標を満たす結果を得たため、本法はイプフェンカルバゾンの検査法として適用可能であることが明らかになった。

a 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部生活環境課

b 大阪府健康医療部生活衛生室環境衛生課

Presence of fipronil and four fipronil degradation products in raw and drinking water in Osaka, Japan

大阪健康安全基盤研究所衛生化学部生活環境課

Development of an analytical method for ipfencarbazon in tap water using a gas chromatograph mass spectrometer (GC/MS)

一般細菌検査における外部精度管理の試み

安達史恵^a, 吉田 仁^a, 吉田直志^b, 谷口直生^b,
竹中凜代^b, 上澤行成^b, 山口進康^c;

水道協会雑誌, 91(10), 16-24 (2022)

大阪府では水道水質検査精度の向上を図ることを目的に、水道事業者等を対象とし、外部精度管理を実施しているが、細菌の検査項目である一般細菌については、精度管理の手法が明示・確立されていないことから、今まで実施してこなかった。本研究では、統一試料を用いた一般細菌の外部精度管理の実現に向けて、その手法等を検討のうえ、試料を配付し実証実験を試みた。またその評価方法について検討を行った。

その結果、当手法を用いて、統一試料の調製が可能であることが明らかとなった。評価方法としては、 \bar{X} -R 管理図および Z スコアの併用が有用であり、Z スコアの算出方法については、今後データを蓄積し、決定する必要があると考えられた。

a 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部生活環境課

b 大阪府健康医療部生活衛生室環境衛生課

c 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部食品化学課

A trial of external quality assessment in standard plate count of tap water

CHERP による選択的 mRNA スプライシング制御

山中靖貴

CHERP regulates the alternative splicing of pre-mRNAs in the nucleus

Yasutaka Yamanaka

I 緒言

高等真核生物の遺伝子発現過程において、その遺伝情報はゲノム DNA から未成熟な mRNA 前駆体 (premature-mRNA: pre-mRNA) へと転写された後、5'キャッピング、スプライシング、および3'ポリアデニル化を受けて成熟 mRNA へと伝達される。成熟 mRNA は核膜を通過し細胞質に輸送され、タンパク質へと翻訳される。スプライシングは mRNA プロセッシング過程の一つで、イントロンが除去されエキソン同士を繋ぎ合わせる反応であり、構成的または選択的スプライシングに分けられる。

Calcium homeostasis endoplasmic reticulum protein (CHERP) は、小胞体や核周辺部における 1,4,5-trisphosphate receptor と共局在し、細胞内カルシウムシグナル伝達において役割を担う。加えて、核内に局在することやスプライソソームと相互作用することが報告されている。しかしながら、その核内における役割は十分に解明されていない。

本研究では、CHERP が核内で選択的スプライシングの制御に関わるかを解析した。

II CHERP の局在とスプライシングへの関与

本研究では、先ずヒト骨肉腫由来細胞株 U2OS 細胞を用いて、CHERP が核内で局在することを Western blot により確認した。

次に CHERP 減少下の U2OS 細胞においてポリ(A)⁺ RNA が核内で蓄積することを RNA 蛍光 *in situ*

ハイブリダイゼーションを用いて示すことで、CHERP が mRNA プロセッシングまたは核外輸送に関わることを見出した。

さらに、CHERP を過剰発現させたヒト胎児腎細胞由来細胞株 HEK293 細胞における生化学解析やイメージング解析により、CHERP が U2 small nuclear ribonucleoprotein (snRNP) や U2 snRNP 関連タンパク質との相互作用を通して選択的スプライシングに関与する可能性を示した。

次に、RNA シークエンス解析を通して、CHERP がカセットエキソン型、相互排他的エキソン型、選択的 5'スプライス部位選択型、選択的 3'スプライス部位選択型およびイントロン保持型といった様々な選択的スプライシングを制御することを明らかとした。

III CHERP によるイントロン保持の標的イントロン同定、その性質・特徴と標的 pre-mRNA の制御

5 種類の選択的スプライシングの中でイントロン保持型が最も頻度よく観察されたため、その標的 pre-mRNA について gene ontology (GO) 解析を行ったところ、RNA 代謝に関わる細胞機能が多く検出された。標的 pre-mRNA の性質を対照として用いた参照イントロンと比較したところ、スプライシングの生じやすさを表す指標である 5'および 3'スプライス部位スコア (値) が低いこと、GC 含量が高いこと、およびイントロンの長さが短いといった特徴を見出した。

IV CHERP によるカセットエキソンの標的イントロン同定、その性質・特徴と標的 pre-mRNA の制御

CHERP による制御を受ける選択的スプライシングとしてイベント数が最も多かったカセットエキソン型について GO 解析を行ったところ、細胞周期や細胞分裂に係る遺伝子が多く同定された。また、カセットエキソン型の標的 pre-mRNA では参照イントロンと比較して、3'スプライス部位やスプライシングの生じやすさを表す指標の 1 つであるブランチポイント部位のスコアが低いこと、GC 含量は低く、イントロンの長さが長いという特徴が見出された。

V まとめ

本研究により、CHERP が核にも局在し、mRNA 代謝に関与することを示した。CHERP と相互作用するタンパク質の多くはプロセッシングやスプライシングに関連することが分かった。そして、CHERP が制御する選択的スプライシング機構について、カセットエキソン、相互排他的エキソン、選択的 5'スプライス部位選択、選択的 3'スプライス部位選択およびイントロン保持のうち、カセットエキソンの個数が最も多く、イントロン保持が最も頻度よく検出された。イントロン保持とカセットエキソンに関わる標的 pre-mRNA について、5'、3'スプライス部位、ブランチポイント部位、イントロンの長さや GC 含量を解析すると、変化を有するものがあつた。以上から、CHERP は核内で選択的スプライシングの制御に関与することが明らかとなった。今後、CHERP による選択的スプライシングの分子機構を解析することで、選択的スプライシングの全体像解明に近づくのみならず、癌や神経疾患等の病気への理解が深まると考えられる。

謝辞

本研究について、終始ご懇篤なるご指導、ご鞭撻を賜りました京都大学大学院 生命科学研究科 分子応答機構学分野 准教授（現近畿大学 農学部 食品栄養学科 教授）増田誠司博士に心より深甚なる謝意を表します。研究を遂行するに当たりに、多大なるご指導、ご鞭撻を賜りました京都大学大学院

生命科学研究科 分子応答機構学分野 教授 片山高嶺博士、同助教 加藤紀彦博士に謹んで深謝申し上げます。またご指導、ご助言を賜りました京都大学大学院 生命科学研究科 生体情報応答学分野 教授 永尾雅哉博士、同准教授 神戸大朋博士、同助教 西野勝俊博士に謹んで深謝申し上げます。研究を遂行するにあたり、多大なるご協力を賜りかつ終始温かく支えて頂きました京都大学大学院 生命科学研究科 分子応答機構学分野および生体情報応答機構学分野の皆様へ深謝申し上げます。本研究を遂行するにあたり多大なるご指導、ご配慮を賜りました地方独立行政法人 大阪健康安全基盤研究所 公衆衛生部および微生物部の皆様方に謹んで深謝申し上げます。

（本稿は、著者が京都大学大学院生命科学研究科において令和 4 年 9 月 26 日に博士（生命科学）の学位を授与された際の論文の概要であり、その詳細は以下に掲載されている。）

Yamanaka Y, Ishizuka T, Fujita K, Fujiwara N, Kurata M, Masuda S. CHERP regulates the alternative splicing of pre-mRNAs in the nucleus. *Int. J. Mol. Sci.* 2022; **5**: 2555, <https://doi.org/10.3390/ijms23052555>.

上水道配水システムにおけるハイスループットシーケンシング による細菌の多様性と群集構造解析

小泉義彦

Changes in bacterial diversity and community structure in drinking water distribution system
revealed by high throughput sequencing

Yoshihiko Koizumi

I 概要

水中の微生物に起因する感染症は水道の普及により激減し、水道は生活基盤の一つとなっている。近年、水道システムの各処理段階で、それぞれに特有の細菌群集構造が存在することが明らかになりつつある。水道システム中に存在する細菌の群集構造についての理解を深めることは、水質異常の早期検出と早期対応に大きく寄与するものと期待される。水道水中の細菌に関するより詳細な情報が必要になっている。

本研究では、上水道配水システム (DWDS: Drinking Water Distribution System) における細菌群集構造とその多様性の変化をハイスループットシーケンサーである MinION で得た配列情報をもとに解析した。

II 対象と方法

1. 対象

山間部にある緩速砂ろ過方式の水道施設及びその配水システムを対象に原水の渓流水、処理施設の着水、緩速砂ろ過水、塩素処理水、3か所の配水施設水及び末端給水栓水を採取した。

2. 方法

理化学的水質指標として、水温、残留塩素、濁度、色度、pH、全有機炭素 (TOC) を測定した。
大阪健康安全基盤研究所衛生化学部生活環境課

微生物生態学的項目として、細菌現存量と細菌群集構造を測定した。細菌現存量は培養法による一般細菌数及び従属栄養細菌数を測定し、直接計数法では、SYBR Green I 染色による全菌数、エステラーゼ活性を利用した 6-CFDA 染色による生菌数を測定した。細菌の多様性と群集構造解析はポータブルシーケンサー MinION による 16S rRNA 遺伝子アンプリコンシーケンス法を用いた。

III 結果と考察

1. 細菌現存量

直接計数法で計数した細菌現存量は、浄水場出口から末端給水栓に至る配水過程において、全菌数に占めるエステラーゼ活性を有する CFDA 生菌数の割合が増加傾向にあることを認めた。配水過程においては残留塩素に耐性のある細菌が選択されていることが示唆された。

2. 細菌群集構造

試料は 2021 年 4 月から 8 月にかけて、原水である渓流水、浄水処理施設の着水、砂ろ過水、塩素処理水及び配水過程の配水池、末端の給水栓で採取した。細菌群集構造は、MinION を用いた 16S rRNA 遺伝子アンプリコンシーケンス法で解析した。門レベルでは、着水及び砂ろ過水では *Bacteroidetes*、*Acidobacteria*、*Cyanobacteria*、*Proteobacteria* など多くの門が確認され、多様性は高かったが、塩素処理

により *Proteobacteria* が優占した。*Proteobacteria* についてさらに綱レベルで解析を行った。渓流水と着水では、*Betaproteobacteria*、*Alphaproteobacteria*、*Gammaproteobacteria* で構成されていたのに対し、砂ろ過水では、*Alphaproteobacteria*、*Betaproteobacteria*、*Gammaproteobacteria*、*Deltaproteobacteria* がほぼ同じ割合であった。塩素処理後は、*Alphaproteobacteria* の割合が大きく増加し、末端給水栓水ではほとんどの細菌が *Alphaproteobacteria* であった。属レベルで解析したところ、着水では *Yersinia* 及び *Aeromonas* が優占種であった。*Yersinia* は哺乳類の腸内に生息しており、野生動物の排泄物が原水に影響を与えた可能性があった。*Aeromonas* は自然の水環境に分布し、魚類や甲殻類などの動物にも生息することから、原水に存在したと考えられた。砂ろ過水では *Legionella* が優占種であった。緩速砂ろ過の表面にはバイオフィームがあり、複雑な生態系が形成される。バイオフィームに生息するアメーバ体内で増殖したレジオネラ属細菌が水中に放出されたことも考えられた。塩素処理により、*Yersinia*、*Aeromonas* 及び *Legionella* の相対量が大幅に減少した。これらの細菌を制御するためには、DWDS 内の残留塩素の維持が重要であることが再確認された。塩素処理後の水中では、*Sphingomonas*、*Methylobacterium*、*Starkeya* が優占種であった。*Sphingomonas* はバイオフィーム形成能力が高く、バイオフィームの内部は殺菌のための塩素が届きにくいいため、残留塩素の存在下で優占種になると考えられている。*Methylobacterium* は、塩素消毒に耐性を持つことが知られている。*Starkeya* はコンクリートを腐食させることが報告されている。DWDS に用いられる鋼管は塩素による鉄の腐食を防ぐ目的でモルタルライニングされており、*Starkeya* はモルタルを腐食することにより、その表面に生息しているものと考えられた。これらの細菌は、緩速砂ろ過や塩素消毒の効率を示す重要な指標として利用できるものと考えられた。

各サンプリング地点の 4 月と 8 月の属レベルの群集構造を非計量多次元尺度法 (NMDS) により解析したところ、渓流水、着水及び砂ろ過水、塩素処理水のクラスターが確認され、緩速砂ろ過と塩素消毒により細菌群集構造が大きく変化していることが示唆された。また、門、綱、属の各レベルでの細菌群集の多様性をシャノンインデックスを用いて評価した結果、すべてのレベルにおいて、塩素処理

により多様性が減少した。門及び綱レベルの多様性は塩素処理後いったん増加したが、末端の給水栓水に至る間に減少したのに対し、属レベルの多様性は塩素処理後の配水過程で増加し、末端給水栓まで高い状態が維持された。MinION は 16S rRNA 遺伝子の全長配列を解析するので、種レベルまで同定することが可能となる。着水では *Aeromonas hydrophila* (average accuracy 86.7%) と *Yersinia enterocolitica* (average accuracy 85.7%) が存在した。また、砂ろ過水では *Legionella pneumophila* (accuracy 84.2%) が存在したが、末端給水栓水では、これらの菌種は検出限界以下であった。

ハイスループットシーケンシングにより DWDS における細菌群集構造を属や種レベルで短時間のうちに把握することができるようになった。原水、各処理段階及び配水過程における細菌群集構造の変化と指標細菌に関わる基礎的知見は、水質異常を早期に検出し、異常事態が発生する前に迅速に対応することを可能にするものである。

謝 辞

本論文作成にあたり、ご指導いただきました大阪大谷大学大学院薬学研究科 那須正夫教授に厚く御礼申し上げます。本研究を進めるにあたり、ご協力いただきました共著研究者の大阪樟蔭女子大学健康栄養学部 一條知昭先生、大阪大谷大学薬学部内井喜美子先生、技術指導いただきました姫路獨協大学薬学部 川井眞子先生、大阪樟蔭女子大学健康栄養学部 灰尾真結子先生に深く感謝します。

(本稿は、著者が大阪大谷大学大学院薬学研究科において令和 5 年 3 月 17 日に博士 (薬学) の学位を授与された際の論文の概要であり、その詳細は以下に掲載されている。)

- 1) Koizumi Y, Ichijo T, Uchii K, Nasu M. Changes in bacterial diversity and community structure in drinking water distribution system revealed by high throughput sequencing. *J Microorg Control* 2023; **28**(1): 27-34.

16S rRNA 遺伝子全長のアンプリコンシーケンスによる

浅井戸の衛生微生物学的水質評価

味村真弓

Microbial water quality assessment of shallow wells using full-length 16S rRNA gene amplicon sequencing

Mayumi Mimura

I 緒言

身近で重要な水資源であった井戸水は、水道網が全国的に充実するにつれ、日本ではその存在意義が大きく変化した。人口比 98 % 以上の水道普及率となった現在は、個人が所有する井戸は使用される機会が少なくなった。そして、その主な用途は農業用の灌漑や庭木の水やり、入浴、トイレの洗浄などの非飲用に变化した。一方、世界に目を向けると、井戸水は、家庭における身近な水源として日常的に利用され、先進国でも農村部での飲用を含めた重要な水資源となっている。井戸水は流域の地質や地形、土壌、植生をはじめ様々な周辺環境の影響を受けて水質が変化する。ところが、その微生物学的検査は、目的に応じた培地による細菌数の測定や、糞便汚染指標となる細菌種の検出が主である。自然環境中で検出される細菌の多くは、従来の培養法では検出が困難であることから、井戸水の衛生微生物学的水質を確保するためには、培養に依存しない迅速かつ包括的な評価法が望まれる。また、井戸水を農作物や庭木への散水のような用途に用いる際にはエアロゾルが発生する。微生物粒子よりなるエアロゾルは「バイオエアロゾル」と呼ばれ、エアロゾル感染を引き起こす可能性がある。そのため、消化器感染症起因菌だけでなく呼吸器感染症起因菌にも留意が必要である。本研究では、大阪近隣に所在する浅層地下水を利用した 5 本の浅井戸を対象として、井戸水中の細菌群集構造の理解と新しい指標細菌の探

索を目指した。

II 浅井戸の衛生微生物学的及び理化学的水質評価

浅井戸の水質評価のため、衛生微生物学的項目として培養法及び直接計数法による細菌数の測定と理化学的項目として TOC、pH、濁度、色度を調査した。

日常的に使用されている井戸の井戸水は、特殊な環境要因がない条件下では、理化学的項目については飲料水基準値を満たしていた。しかし、下水道管理設工事後にサンプリングした試料水では、濁度の上昇と pH のアルカリ化が観察され、周辺環境の影響による水質の変化が確認できた。一方、長期間放置されている井戸では、濁度や色度が高かった。これらの井戸について、換水（井戸内部の水をポンプで排水し、その後水位を自然に回復させた）を実施したところ、濁度や色度は改善された。細菌数については、飲料水の基準である「標準寒天培地を用いて検出される CFU/mL が 100 以下」を満たしたのは、気温の低い時期にサンプリングした日常的に使用されている井戸の試料水のみであった。一方、長期間放置されている井戸では、直接計数法及び培養法ともに検出される細菌数が高値だった。換水後の試料水でも基準を満たすものはなかったが、培養法で検出される細菌数は 1 桁以上低くなった。すなわち、井戸水の使用や換水による水質改善が確認できた。

大阪健康安全基盤研究所衛生化学部生活環境課

III ポータブルシーケンサを用いた浅井戸水中の細菌群集構造解析

ナノポアシーケンサ MinION を用いた 16S rRNA 遺伝子の全長配列を対象とするアンプリコンシーケンスにより井戸水中の細菌群集構造を解析する方法が、新しい水質評価法として適用可能であるか検討した。更に、網羅的解析により検出された細菌の中から糞便性大腸菌や代表的な消化器感染症起因菌以外でヒトへの健康影響が考えられる新しい指標細菌の探索を行った。

5 本の浅井戸からサンプリングした井戸水について細菌群集構造を解析したところ、迅速かつ簡便に網羅的な解析ができた。そして、井戸が所在する周辺環境の違いによると考えられる、特徴的な細菌の検出が種レベルで可能であった。また、井戸の近隣で実施された下水道管理設工事が原因と考えられる、pH 変化に伴う細菌群集構造の変化を確認することができた。今回得られた細菌種レベルの解析結果から、*Legionella pneumophila* と *Aeromonas hydrophila* が新たな指標細菌候補として考えられた。

井戸水の衛生微生物学的水質を確保するためには、迅速かつ包括的な評価が望まれる。今回用いた 16S rRNA 遺伝子の全長配列を対象とした網羅的解析手法では、日和見感染の起因菌など、従来の手法では検出が困難な細菌の種レベルの解析が迅速に行えることがわかった。ヒトへの健康影響を評価するために重要な種レベルの情報も得られる点で優れた手法であることが確認できた。当該手法は、井戸水中の細菌群集構造を解析可能で、新しい衛生微生物学的水質評価手法として適用可能であることがわかった。

IV 微小粒子の拡散と沈降に関する検討

環境中のバイオエアロゾル微小粒子の拡散と沈降、及び換気による除去について、土壌粒子を用いて検討した。発じんにより空気中に拡散した微小粒子を、パーティクルカウンターを用いて粒径別に解析した。その結果、空間中に拡散した 5 μm 以下の微小粒子は、気流の無い状態では空気中で滞留し、長時間高い粒子数を維持した。滞留時に計測された微小粒子は粒径が 5 μm 以下のものが全微小粒子数の 99 % 以上で、そのうち粒径 0.5~2 μm の微小粒子が 95 % 以上を占め、換気によりその数は減少し

た。

長時間環境中に滞留しつづける 5 μm 以下の微小粒子について、単位体積当たりの空気中の数を減らすためには、換気と気流制御が重要であることがわかった。

V 結論

本研究により、浅井戸は周辺環境の影響を受けやすく、理化学的及び衛生微生物学的水質や細菌群集構造が変化することが確認された。ポータブルシーケンサによる 16S rRNA 遺伝子全長配列を対象とした網羅的解析手法を用いることで、日和見感染の起因菌など、従来の手法では検出が困難な細菌種レベルの解析が、迅速かつ簡便に行うことができた。解析結果から新たな指標細菌候補となりうる *Legionella pneumophila* と *Aeromonas hydrophila* が検出された。

安全で安定した井戸水の衛生微生物学的水質を確保するためには、定期的な細菌数と細菌群集構造の情報や、細菌の生息に影響を及ぼす理化学的な水質のモニタリングが必要であると考えられる。また、ヒトへの健康影響を評価するためには、細菌種に関する情報とその現存量の情報も重要である。すなわち、水質の衛生微生物学的水質評価には、従来の培養法と遺伝子をターゲットとした方法の組み合わせが有効である。今後、井戸水の衛生微生物学的水質を高精度に評価する新しい手法として 16S rRNA 遺伝子全長配列を対象とした網羅的解析手法が日常的に適用されることが期待される。

謝 辞

本論文作成にあたり、ご指導いただきました大阪大谷大学大学院薬学研究科教授那須正夫先生に篤く御礼申し上げます。また、研究実施にあたり様々なご助言や技術的なサポートを頂きました大阪樟蔭女子大学准教授一條知昭先生、大阪大谷大学薬学部准教授内井喜美子先生、金沢大学教授古内正美先生、エーイーエスラボ馬場貴志先生と大阪大谷大学薬学部教授谷佳津治先生、准教授見坂武彦先生（研究当時）はじめ衛生・微生物学研究室の皆様、姫路獨協大学薬学部准教授川井眞好先生、大阪府立環境農林水産技術総合研究所和田匡司主任研究員に心から感謝いたします。最後に研究に供する井戸水及

び関連情報を提供して下さいました皆様に御礼申し上げます。

(本稿は、著者が大阪大谷大学大学院 薬学研究科において令和 5 年 3 月 17 日に博士 (薬学) の学位を授与された際の論文の概要であり、その詳細は以下に掲載されている。)

- 1) Mimura M, Koizumi Y, Wada M, Ichijo T, Uchii K, Nasu M. Microbial water quality assessment of private wells using 16S rRNA gene amplicon sequencing with a nanopore sequencer. *Biol Pharm Bull* 2023; **46**: 263-271.
- 2) 味村真弓, 馬場貴志, 和田匡司, 古内正美, 那須正夫. 医薬品製造施設を想定した室内環境における微小粒子の滞留と換気による除去. *医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス* 2021; **52** (8): 657-661.

編集委員

井原 隆
○入谷展弘
高橋佑介
中村暁彦
西田陽子
馬場 孝
山口瑞香
油谷藍子
吉田俊明
(○編集委員長)

査読者

入谷展弘
上村聖子
小笠原 準
川畑拓也
神吉政史
倉田貴子
新矢将尚
永吉晴奈
平井佑治
廣井 聡
村上太郎
本村和嗣

地方独立行政法人 大阪健康安全基盤研究所

研究年報 第7号 令和5年度

ISSN 2433-5819

(無断転載禁止)

令和6年1月

編集・発行 地方独立行政法人 大阪健康安全基盤研究所

大阪市東成区中道1丁目3番3号

電話 06-6972-1321