神奈川県
衛生研究所

CODEN:KEKHB 8
ISSN:0303-0350

神奈川県衛生研究所研究報告

第45号（平成27年9月）

目　　次

神　奈　川　県　衛　生　研　究　所
〒253-0087　茅ヶ崎市下町屋１－３－１

県の花：山ゆり

神奈川県衛生研究所研究報告第45号

平成27年9月発行

編　集　神奈川県衛生研究所
発　行　〒253-0087　茅ヶ崎市下町屋1-3-1
TEL 0467-83-4400
印　刷　株式会社　シーケン
〒244-0842　横浜市栄区飯島町1439
TEL 045-893-5171㈹

神奈川県衛生研究所研究報告　No. 45 (2015)
Bull. Kanagawa Ins. of P.H.

総説

水道水中のクリプトスポリジウム等対策およびクリプトスポリジウム等試験法について

黒木俊郎

Control measures for *Cryptosporidium* and *Giardia* risks in drinking water and methods for detecting *Cryptosporidium* and *Giardia* in water

Toshiro KUROKI

Key Words：クリプトスポリジウム，ジアルジア，水道，対策，試験法

はじめに

わが国の水道水の微生物学的安全性は塩素消毒を含めた浄水処理により担保されている．しかし，クリプトスポリジウムおよびジアルジア（クリプトスポリジウム等）の耐塩素性微生物による水道水を介した感染事例が知られるようになり，消毒では微生物学的安全性が確保できなくなり，浄水処理の強化等の対策が必要となった．そのため，厚生省あるいは厚生労働省は対策指針を示し，自治体ならびに水道事業体等に対して対応措置を講じることを求めている．本稿では，水道水中のクリプトスポリジウム等対策が示された背景ならびに対策の概要，さらに対策の中で水道水ならびに水道原水の汚染状況を把握するために重要な位置を占め，変更が重ねられてきた試験法の概要を述べる．

クリプトスポリジウムおよびジアルジアの概要

クリプトスポリジウムは胞子虫類に属する偏性細胞寄生性原虫で，種によっては魚類から両生類，爬虫類，鳥類および哺乳類までの広い範囲の脊椎動物を宿主とする．消化管の上皮細胞中に虫嚢を形成し，そこで無性生殖を行い，有性生殖に移行して感染型であるオーシストを形成する．オーシストはオーシスト壁を被り，そのため消毒薬を含めた様々な環境に対して抵抗性を示す．感染はオーシストを経口的に摂取することで成立する．少数のオーシストで感染が成立することが報告されている[1]．ヒトが感染すると非血性下痢，腹痛，嘔吐，嘔気，39℃を超えない発熱等がみられる．免疫不全者では慢性消耗性下痢を呈し，時に致死的となる．

クリプトスポリジウム属原虫は胃寄生性と腸管寄生性の２つのグループに分けられ，それぞれに属する種および遺伝子型が知られている．胃寄生性グループのオーシストは長径6～8 μm，腸管寄生性グループは長径4～6 μmと大きさが異なる．グループ内の種や遺伝子型は形態での鑑別は困難であり，遺伝子の解析により鑑別しなければならない．一部例外があるが，それぞれの種および遺伝子型の宿主域は限られており，ヒトに感染する主な種は*C. hominis*, *C. parvum*および*C. meleagridis*であり[2]，その他の種や遺伝子型のクリプトスポリジウムが偶発的に感染した事例が報告されている．

クリプトスポリジウムは1907年に初めてマウスの胃における寄生が報告され[3]，1910年には種が記載された[4]．さらに，1912年にマウスの小腸での寄生が報告された[5]．その後1970年代後半までは家畜の病原体として注目されていた．1976年に英国と米国でのヒト感染事例の報告があり，*C. parvum*がヒトに寄生して病原性を発揮することが明らかになった[6,7]．

ジアルジアは鞭毛虫類に属する原虫で，ヒトを含めた動物の上部消化管の管腔に寄生し，無性生殖により増殖する．感染型はシストと呼ばれ，糞便とともに排出される．シストは5～8 μm×8～12 μm のラグビーボール形で，これを経口的に摂取することで感染が成立する．ヒトが感染すると，非血性下痢，悪心，腹痛等の症状がみられ，寄生が胆管や胆嚢に及ぶと胆嚢炎様症状がみられることがある．シストはシスト壁に被われ，水道水の塩素消毒等に耐性を示す．ヒトに寄生するジアルジアは*Giardia lamblia*であり，遺伝子解析により型別することができる．遺伝子型により宿主特異性があり，ヒトに寄生するのはAssemblage A およびAssemblage Bとされている[8]．海外では水道水を原因とする集団感染事例が報告されているが，国内では水道水から検出された事例はあるものの，集団感染事例は発生していない．

クリプトスポリジウムの海外における水系感染事例

クリプトスポリジウムは，接触感染や食品を介した感染が知られているが，これらの感染様式とは異なり，水系感染では大規模な集団下痢症が発生する点で，公衆衛生上の重大な問題として注目されている．世界的には，英国での1983年の水系感染事例の記録があり[9]，1984

神奈川県衛生研究所　微生物部
〒253-0087　茅ヶ崎市下町屋1-3-1

年に発生した米国テキサス州の井戸水の汚染により2000人余りが感染した事例が論文として初めて記載された[10]．その後毎年のように水系感染クリプトスポリジウム症が世界各地で発生している．1993年には米国のウィスコンシン州ミルウォーキーにおいて，40万人を超える人々が感染した過去最大の水系集団感染が発生した[11]．この事例では4,400人が入院し[12]，この事例に関連して亡くなったと推定される54人のうち46人がAIDS患者であったと報告されている[13]．

日本では，1985年にネフローゼ症候群の患者においてクリプトスポリジウム感染が初めて見出された[14]．高知市内の医療機関を受診した３名の下痢患者のうち１名からクリプトスポリジウムのオーシストが検出された．この患者は５歳の男子で，ネフローゼ症候群の治療のためにプレドニンの投与を受けていた．この事例に続いて，AIDS患者および海外輸入事例におけるクリプトスポリジウム感染が報告されている[15−17]．

1994年（平成６年）８月に神奈川県平塚市の雑居ビルにおいて，簡易専用水道を介したクリプトスポリジウム集団感染事例が発生した[18]．ビルの地下に設置された受水槽と隣接する汚水槽および雑排水槽を隔てる壁の穴から，汚水槽水が受水槽に逆流して混入し，汚水槽水に含まれていたクリプトスポリジウムのオーシストにより水道水が汚染された．ビルには複数の飲食店その他が入居しており，従業員と利用者461人が発症した．

1996年（平成８年）６月には，埼玉県越生町の町営水道においてクリプトスポリジウムのオーシストによる水道水の汚染に起因するクリプトスポリジウム集団感染が発生した[19]．町民の約8,800人が発症するという大規模な感染事例となった．浄水場の上流に下水処理場が設置され，処理水が水道原水の一部として利用されていた．オーシストが浄水処理により除去しきれずに水道水に混入したために集団下痢症が発生したと推測されている．

水道におけるクリプトスポリジウム等対策

1990年代前半はミルウォーキーにおいてクリプトスポリジウムによる巨大な水系集団下痢症が発生するなど，世界的に水道水のクリプトスポリジウム問題が注目されていた．こうした状況で，1996年（平成８年）６月に発生した埼玉県越生町の水道水を介したクリプトスポリジウム集団感染事例を契機に，水道水のクリプトスポリジウム対策のために講ずべき措置等を示すガイドラインとするために，厚生省は1996年（平成８年）10月４日に「水道水中のクリプトスポリジウムに関する対策の実施について」を発出し[20]，この通知により「水道におけるクリプトスポリジウム暫定対策指針」（以下，暫定対策指針）を示した．その後，表１に示すように，水道におけるクリプトスポリジウム対策に関する通知が発出され，改正等が繰り返された．

1996年（平成８年）の暫定対策指針においては，クリプトスポリジウムによる汚染の未然防止のため，以下の措置が示された．

1．水道水源の近傍上流域のクリプトスポリジウム排出源の有無を調査すること．

2．汚染のおそれがある場合は，クリプトスポリジウムを除去できる浄水処理を行うこと．およびろ過池出口の濁度を0.1度以下に維持すること．

3．水道水が原因のおそれがあるクリプトスポリジウム症が発生した場合は応急に対応すること．

表１　水道水中のクリプトスポリジウム等対策に係る通知

発出年	通知名	文献番号
平 成８年	水道水中のクリプトスポリジウムに関する対策の実施について	20
平成10年	水道水中のクリプトスポリジウムに関する対策の実施について	21
	水道に関するクリプトスポリジウムのオーシストの検出のための暫定的な試験方法について	22
平成11年	飲料水におけるクリプトスポリジウム等の検査結果のクロスチェック実施要領について	23
	水道におけるクリプトスポリジウム暫定対策指針等に関する質疑回答集の送付について	24
平成12年	水道に関するクリプトスポリジウムのオーシストの検出のための暫定的な試験方法の付録の送付について	25
平成13年	水道水中のクリプトスポリジウムに関する対策の実施について	26
平成14年	水道におけるクリプトスポリジウム暫定対策指針等に関する質疑回答集の送付について	27
平成19年	水道水中のクリプトスポリジウム等対策の実施について	28
	水道における指標菌及びクリプトスポリジウム等の検査方法について	29
	飲料水におけるクリプトスポリジウム等の検査結果のクロスチェック実施要領について	30
平成24年	水道に関するクリプトスポリジウム等の検出のための検査方法の見直し等について	31

暫定対策指針が策定されるとともに，1997年度（平成９年度）には新興・再興感染症研究事業「水道水を介して感染するクリプトスポリジウム及び類似の原虫性疾患の監視と制御に関する研究」が立ち上げられた．この研究班においては，カートリッジフィルター法等の捕捉・濃縮法の評価，オーシストの分離・精製のための免疫磁気ビーズ法の評価，直接蛍光抗体染色法の試薬の開発，PCR法の検討等の試験法に関する研究課題や水道原水の汚染実態調査等が実施され，その成果はその後のクリプトスポリジウム対策に活用された．この研究班に続いて，順次研究班が継続して立ち上げられ，試験法の評価･検討や汚染実態調査，紫外線の効果等の調査・研究が実施された．

さらに，厚生省は1997年（平成９年）８月に「水道におけるクリプトスポリジウム等病原微生物対策検討会」を設置した．検討会では暫定対策指針ならびに試験法の見直しなどの検討が行われ，その結果は暫定対策指針あるいは試験法の改正・変更に反映された．検討会は2003年度（平成15年度）まで継続し，さまざまな検討が行われ，2004年度（平成16年度）からは「水道における微生物問題検討会」に引き継がれ，現在に至っている．

暫定対策指針は1998年（平成10年）と2001年（平成13年）に改正された[21, 26]．1998年（平成10年）の改正では，①暫定試験法の変更，②排出源の存在は近傍上流域のみではなく，広範囲に上流域全体を把握すること，③指標菌に嫌気性芽胞菌を追加，ろ過池の洗浄水等の原水への返送管理についての留意事項の追加が行われた．2001年（平成13年）の改正では，①クリプトスポリジウム汚染のおそれの判断を明確にするために，指標菌（大腸菌および嫌気性芽胞菌）の検査を実施すること，②クリプトスポリジウム汚染の予防対策として，汚染のおそれがある場合はクリプトスポリジウムを除去できる設備を設置するか，汚染のおそれのない水源に変更すること，③浄水処理の徹底を図ることが示された．

2007年（平成19年）３月には「水道水中のクリプトスポリジウム等対策の実施について」が発出され，その中で新たな指針が示され，暫定対策指針が廃止された．新しい指針の主な改正点は，①クリプトスポリジウム等による汚染のおそれの程度を分類し，各分類に対応した施設整備，原水等の検査，運転管理，施設整備中の管理等の措置を示したこと，②浄水場に紫外線処理を導入することができるとし，運転・維持管理に必要な事項を示したことであった．また，留意事項として，①汚染のおそれの程度を把握するために原水検査の実施体制を整備し，定期的に原水のクリプトスポリジウム等および指標菌の検査を実施すること，②水質検査計画において指標菌検査およびクリプトスポリジウム等検査を計画に位置付けること，③定量的な汚染リスクの知見を収集することが求められた．2001年（平成13年）までの暫定対策指針では，クリプトスポリジウム等試験の主たる目的は水道水の汚染がないことを確認するためとされていたが，新たな指針では，クリプトスポリジウム汚染のおそれのレベルを把握するために水道原水を検査対象にすることを明確にした．

クリプトスポリジウム等試験法

1996年（平成８年）に発出された「水道水中のクリプトスポリジウムに関する対策の実施について」[20] の別添として暫定対策指針が示され，緊急対応のための試験法が添付された．この試験法は，飲料水からクリプトスポリジウムを検出することを目的としていた．その後の見直しや検討により，試験法は変更されている．いずれの試験法においても，10～20Lという大量の水試料から，径４～６μmほどの微小生物を検出し，さらに計数しなければならないため，操作は非常に煩雑である．実験室に搬入された試料は，①捕捉・濃縮，②分離・精製，③染色，④顕微鏡観察の４つの工程を経て試験が実施される．遺伝子検出法を用いる場合は①捕捉・濃縮と②分離・精製は顕微鏡観察法の場合と同じ工程を経てクリプトスポリジウム等を分離・精製し，遺伝子抽出と遺伝子検出が行われる．ただし，遺伝子検出法の場合は，PCR法での反応阻害物質を除去するために，分離・精製は必ず免疫磁気ビーズ法を採用することとなっている．

1996年（平成８年）の試験法は表２に示すように，試験法の各段階の操作法は選択肢が限られていた．その後，厚生労働省研究班あるいは日本水道協会等の検討により新たな知見が得られた操作法が加えられている（表２）．1998年（平成10年）の変更では，捕捉・濃縮としてポリカーボネート製メンブレンフィルター法，カートリッジフィルター法および遠心沈殿法が，分離・精製法として免疫磁気ビーズ法が，蛍光抗体染色としてスライド法が追加された[22]．2007年（平成19年）の変更では，捕捉･濃縮として親水性PTFEメンブレンフィルター法が，蛍光抗体染色としてPTFEフィルターが追加された[29]．さらに，平成24年の変更では，捕捉･濃縮として粉体ろ過法が，クリプトスポリジウム等の検出法として遺伝子検出法が追加された[31]．遺伝子検出法が加えられたことで，顕微鏡観察の結果を遺伝子検出により補完することができ，試験結果の信頼性の向上とともに，顕微鏡観察の担当者の育成に役立てるという効果も期待される[32]．

表２　水試料のクリプトスポリジウム等試験法の変遷

試験段階	発出年	
捕捉・濃縮	平 成 8 年	セルロースアセテートメンブレンフィルター・アセトン溶解法(吸引および加圧)を記載
	平 成 10 年	「標準的方法」としてメンブランフィルター吸引ろ過－アセトン溶解法とメンブランフィルター加圧ろ過－アセトン溶解法を記載
		「その他の方法」としてポリカーボネート製メンブレンフィルター法、カートリッジフィルター法、遠心沈殿法を追加
	平 成 19 年	「標準的方法」として、親水性PTFEメンブレンフィルター法を追加
	平 成 24 年	「その他の方法」として粉体ろ過法を追加
分離・精製	平 成 8 年	密度勾配遠心浮遊法を記載
	平 成 10 年	密度勾配遠沈法(浮遊法)を「標準的方法」とした
		「その他の方法」として免疫磁気ビーズ法を追加
	平 成 19 年	免疫磁気ビーズ法を「標準的方法」とした
	平 成 24 年	「その他の方法」として遺伝子検出法を追加
蛍 光 染 色	平 成 8 年	間接蛍光抗体法を記載
	平 成 10 年	メンブレンフィルター上で染色する間接・直接蛍光抗体染色法を「標準的方法」とした
		スライドグラス法を「その他の方法」とした
	平 成 19 年	「標準的方法」として直接蛍光抗体染色法を1、間接蛍光抗体染色法を2とした
		染色用にPTFEメンブレンフィルターを追加
		スライド法を削除
その他	平 成 10 年	「標準的方法」と「その他の方法」を明確化
		ジアルジアを検出するための蛍光抗体試薬について言及し、ジアルジアシストの形態的特徴と判定基準を明確化
		付録「精度管理のためのオーシスト添加実験」、「顕微鏡の取扱い」、参考「検査室におけるクリプトスポリジウムの感染防止方法」を追加
	平 成 12 年	「付録3　顕微鏡観察における蛍光フィルターの選択と観察上の注意」でG励起による観察を追加

クリプトスポリジウム等試験法は水道原水と水道水を検査の対象としているが，特に水道原水は地域や原水の種類，季節，天候，その他の要因により，さまざまな性状を示す．こうした試料を対象に試験を実施するには，通知の試験法の各段階で示された操作法のうち，「標準的方法」を用いることを原則とするが，対象とする試料への適切性や信頼性が確認されれば「その他の方法」を選択することができる．そこで，「標準的方法」あるいは「その他の方法」を適切に選定して組み合わせ，回収率を確保し，試験結果の信頼性を維持・向上することが不可欠である．さらに，信頼性の高い結果を得るためには，各操作において細心の注意を払い，対象とする試料に合わせて必要に応じて変更や工夫を加えることもありうる[33]．こうした操作の組み合わせや変更には，試験法に関する理解と操作等に関する豊富な知識が求められる．

国の研修体制

1996年（平成８年）に厚生省から暫定試験法が示されたが，水道水の微生物学的安全性を確認する上で重要な試験法があることと，試験法ならびに顕微鏡の操作が煩雑であること，クリプトスポリジウムに関する情報が少ないことなどの理由から，試験法に関する技術や知識の習得に対する要望が高まった．そこで国立公衆衛生院（現国立保健医療科学院）において1998年度（平成10年度）から短期研修として，地方衛生研究所，保健所，水道事業体等の担当者を対象にした「水試料からのクリプトスポリジウム試験法実習」が開始された．この研修に対する要望は途切れることがなく，現在では「水道クリプトスポリジウム試験法に係る技術研修」として毎年開催されている．この研修の目的は，①耐塩素性微生物に関する知識を習得する，②飲料水における耐塩素性微生物の問題を理解する，③試験方法を理解し，操作法を習得する，④技術者に求められる基本的能力と専門能力を向上させるとしている[33]．また，研修の役割は，受講生が地域におけるクリプトスポリジウム検査体制の中核となり，体制が確立・強化されること，および継続的に受講生を輩出することで地域の検査体制を支援することとされている．研修には毎年16～23人が受講し，1998年（平成10年）から2011年（平成23年）までの14年間で303人に達した[33]．

クリプトスポリジウム等試験法では，特に水道原水において性状に合わせた手法・操作ならびに試薬・器具器

材を選択し，回収率の向上や試験結果の信頼性の確保に努めなければならない．そのため，試験担当者が単に試験法の技術を習得しているだけでは不十分であり，各段階で用いる試薬や操作等の意義，原理，長所，短所を正しく理解し，それらの応用に関する知識や技術を備えていることが望まれる[33)]．研修の内容は，講義として「原虫汚染への行政対応」，「水道システムと水の安全性」，「原虫汚染の実態」，「浄水処理における対応とモニタリング」，「原虫の生物学的特性と水系感染」および「試験法の解説」があり，これに試験法に関する実習で構成されている[33)]．実習においては，捕捉・濃縮，分離・精製，染色・顕微鏡観察の各操作において，それぞれの段階の操作の複数の組み合わせにより実習することが可能となるようにしている．これにより，受講生は各種操作法を体験し，各自の所属にて採用している操作法が適切か否かを確認することができる．

研修体制とは別に，厚生省は検査精度の向上を目的として，1999年（平成11年）の水道整備課長通知[23)]によりクロスチェック体制の構築を行った．これは水道水からクリプトスポリジウム等を疑う粒子が検出された際に，検査実施機関において確定が困難な場合を想定し，厚生省がクロスチェックのための機関あるいは専門家を斡旋する制度である．クリプトスポリジウム等が疑われる粒子を含む顕微鏡標本あるいは顕微鏡写真に基づいて，クロスチェックが行われる．2007年（平成19年）の水道課長通知（一部改正　平成24年３月２日健水発0302 第２号）[30)] では，顕微鏡標本と顕微鏡写真に加えて，遺伝子検出法用の核酸抽出試料および増幅産物がクロスチェックの対象となった．

おわりに

水環境ならびに水道事業といった水道を取り巻く環境が今後大きく変化すると予想されている．変化する事項には水道水質リスクの増大が挙げられており，水道原水や水道水の水質管理とリスク評価の重要性はますます高まると考えられる．そのため，水質管理ならびに試験法に関する知識や技術の維持･向上と継承に加え，新たな水質管理手法や試験法の円滑な導入，さらにはこうした状況に対応する人材の確保と育成は重要な課題である．厚生労働省は，新たな知見の集積を行い，適宜対策指針ならびに検査方法を見直していくとしている[28, 31)]．したがって，水道水中のクリプトスポリジウム等対策ならびにクリプトスポリジウム等試験法に関する情報の収集ならびに研究が積極的・継続的に行われ，情報や研究成果が蓄積されていくであろう．こうした情報資源に基づいて，新たな問題あるいはより安全性の高い対策等に対応するために，現行の対策や試験法が改正・変更されることが予想され，それが必要なこととされている．

（平成27年８月１日受理）

文　献

１）Okhuysen, P.C., Chappell, C.L., Crabb, J.H., Sterling, C.R. and DuPont, H.L.: Virulence of three distinct *Cryptosporidium parvum* isolates for healthy adults, J. Infect. Dis., **180**, 1275-81 (1999).

２）Akiyoshi, D.E., Dilo, J., Pearson, C., Chapman, S., Tumwine, J. and Tzipori, S.: Characterization of *Cryptosporidium meleagridis* of human origin passaged through different host species, Infect. Immun., **71**, 1828-1832 (2003).

３）Tyzzer, E.E.: A sporozoan found in the peptic glands of the common mouse, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **5**, 12-13 (1907).

４）Tyzzer, E.E.: An extracellular coccidium, *Cryptosporidium muris* (gen. et sp. nov.), of the gastric glands of the common mouse, J. Med. Res., 23, 487-510 (1910).

５）Tyzzer, E.E.: *Cryptosporidium parvum* (sp. nov.), a coccidium found in the small intestine of the common mouse, Archiv. Prot., **26**, 394-412 (1912).

６）Meisel, J.L., Perera, D.R., Meligro, C. and Rubin, C.E.: Overwhelming watery diarrhea associated with a *Cryptosporidium* in an immuno-suppressed patient, Gastroenterology, **70**, 1156-1160 (1976).

７）Nime, F.A., Burek, J.D., Page, D.L., Holscher, M.A. and Yardley, J.H.: Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan *Cryptosporidium*, Gastroenterology, **70**, 592-598 (1976).

８）Thompson, R.C.A.: Giardiasis as a re-emerging infectious disease and its zoonotic potential, Int. J. Parasitol., 30, 1259-1267 (2000).

９）Microbiology of waterborne diseases: microbiological aspects and risks. ed. S.L. Percival et al. Elsevir, San Diego, pp480 (2004).

10）D′Antonio, R.G., Winn, R.E., Taylor, J.P., et al.: A waterborne outbreak of cryptosporidiosis in normal hosts, Ann. Intern. Med., **103**, 886-888 (1985).

11) Mac Kenzie, W.R., Hoxie, N.J., Proctor, M.E., et al: A massive outbreak in Milwaukee of *cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply, N. Engl. J. Med., **331**, 161-167 (1994).
12) Corso, P.S., Kramer, M.H., Blair, K.A., Addiss, D.G., Davis, J.P. and Haddix, A.C.: Cost of illness in the 1993 waterborne *Cryptosporidium* outbreak, Milwaukee, Wisconsin, Emerg. Infect. Dis., **9**, 426-31 (2003).
13) Hoxie, N.J., Davis, J.P., Vergeront, J.M., Nashold, R.D., Blair, K.A.: Cryptosporidiosis-associated mortality following a massive waterborne outbreak in Milwaukee, Wisconsin, Am. J. Public Health, **87**, 2032-2035 (1997).
14) 鈴木了司，岡村宣典，倉繁隆信ほか：ネフローゼ症候群の一患者のクリプトスポリジウム症，日本熱帯医学会雑誌，**14**, 13-21 (1986).
15) 増田剛太，根岸昌功，味澤篤ほか：日本人に発症した２例のクリプトスポリジウム症，感染症誌，**65**, 1614-1619 (1991).
16) 塩田恒三，織田正，有薗直樹: 輸入クリプトスポリジウム症の1例，感染症誌，68, 941-945 (1994).
17) Mohri, H., Fujita, H., Asakura, Y. et al.: Case report: inhalation therapy of paromomycin is effective for respiratory infection and hypoxia by *Cryptosporidium* with AIDS, Am. J. Med. Sci., **309**, 60-62 (1995).
18) 黒木俊郎，渡辺祐子，浅井良夫ほか：神奈川県内で集団発生した水系感染*Cryptosporidium*症，感染症誌，**70**, 132-140 (1996).
19) 埼玉県衛生部：クリプトスポリジウムによる集団下痢症報告書，越生町集団下痢症発生事件，pp374 (1997).
20) 水道水中のクリプトスポリジウムに関する対策の実施について，平成８年10月４日衛水第248号厚生省生活衛生局水道環境部長通知
21) 水道水中のクリプトスポリジウムに関する対策の実施について，平成10年6月19日生衛発第1039号厚生省生活衛生局水道環境部長通知
22) 水道に関するクリプトスポリジウムのオーシストの検出のための暫定的な試験方法について，平成10年６月19日衛水第49号厚生省生活衛生局水道環境部水道整備課長通知
23) 飲料水におけるクリプトスポリジウム等の検査結果のクロスチェック実施要領について，平成11年１月21日衛水第３号厚生省生活衛生局水道環境部水道整備課長通知
24) 水道におけるクリプトスポリジウム暫定対策指針等に関する質疑回答集の送付について，平成11年９月30日厚生省生活衛生局水道環境部水道整備課水道水質管理室事務連絡
25) 水道に関するクリプトスポリジウムのオーシストの検出のための暫定的な試験方法の付録の送付について，平成12年３月30日衛水第18号厚生省生活衛生局水道環境部水道整備課長通知
26) 水道水中のクリプトスポリジウムに関する対策の実施について，平成13年11月13日健水発第100号厚生労働省健康局水道課長通知
27) 水道におけるクリプトスポリジウム暫定対策指針等に関する質疑回答集の送付について，平成14年２月15日厚生労働省健康局水道課事務連絡
28) 水道水中のクリプトスポリジウム等対策の実施について，平成19年３月30日健水発第0330005号厚生労働省健康局水道課長通知
29) 水道における指標菌及びクリプトスポリジウム等の検査方法について，平成19年３月30日健水発第0330006号厚生労働省健康局水道課長通知
30) 飲料水におけるクリプトスポリジウム等の検査結果のクロスチェック実施要領について，平成19年３月30日健水発第0330007号厚生労働省健康局水道課長通知
31) 水道に関するクリプトスポリジウム等の検出のための検査方法の見直し等について，平成24年３月２日健水発0302 第２号厚生労働省健康局水道課長通知
32) 黒木俊郎：水試料からのクリプトスポリジウム等試験法雑感，用水と廃水，**57**, 233 (2015).
33) 黒木俊郎，泉山信司，八木田健司ほか：水道クリプトスポリジウム試験法の検査体制維持・向上に係る技術研修の役割，保健医療科学，**61**, 454-463 (2012).

短報

神奈川県における感染症媒介蚊の発生状況

稲田貴嗣

Distribution and seasonal occurrence of mosquitoes in Kanagawa

Takatsugu INADA

はじめに

日本脳炎，デング熱，チクングニア熱など，蚊が媒介する疾病が東南アジア諸国などで流行している．これらの感染症を媒介する蚊は日本でも一般的に見られる蚊であり，流行地から日本に感染蚊が侵入し，在来の蚊に感染が広がることが強く懸念されている．また，地球温暖化などの気候の変化により，感染症を媒介する熱帯・亜熱帯性の蚊の分布が温帯地域に拡大することも懸念されている．しかし，日本国内で蚊が媒介する感染症がほとんど起きていなかったことから，感染蚊が侵入した場合の防除対策を立てるために必要な地域特有の蚊の生息状況やウイルスの保有状況のデータが，近年，神奈川県域においてほとんど集められていなかった．そこで，神奈川県域の蚊の生息状況を把握するとともに，ウイルスの保有状況の調査を行った．

材料および方法

2012年は9カ所（厚木市3カ所，海老名市2カ所，寒川町1カ所，小田原市2カ所，大井町1カ所），2013年は3カ所（大井町（2012年と同地点）1カ所，茅ヶ崎市2カ所）で蚊成虫の採集を行った（表1）．

蚊成虫の採集は，CO_2トラップ（CDC型ミニチュアライトトラップ Model 512）を田の近辺，建物近くの樹木や建物の軒下に24時間設置して行った．2012年は各調査地にトラップ1個，2013年は採集場所：茅ヶ崎市Kにトラップ4個，他の調査地にはトラップ1個を設置した．CO_2の発生には，ドライアイスを用いた．

表1　採集地および採集期間

調査年	採集場所	ﾄﾗｯﾌﾟ	採集時期
2012年	厚木A	A-1	5月～11月
	厚木B	B-1	5月～11月
	厚木C	C-1	5月～11月
	海老名D	D-1	5月～11月
	海老名E	E-1	5月～12月
	寒川F	F-1	5月～11月
	小田原G	G-1	5月～11月
	小田原H	H-1	5月～11月
	大井I	I-1	5月～11月
2013年	大井I	I-1	4月～12月
	茅ヶ崎J	J-1	4月～12月
	茅ヶ崎K	K-1	7月～12月
	茅ヶ崎K	K-2	7月～12月
	茅ヶ崎K	K-3	7月～12月
	茅ヶ崎K	K-4	7月～12月

蚊は同定後，採集場所別，採集日別，種別に1～24匹を1プールとしてRNAの抽出を行い，RT-PCR法により日本脳炎ウイルス，ウエストナイルウイルス，デングウイルス，チクングニアウイルスの遺伝子検出を行った．

RNAの抽出にはQIAamp MinElute Virus Vacuum Kit (QIAGEN)を用いた．PBS 1mlを試料に添加し，マルチビーズショッカー（安井器械㈱）(2000rpm，30秒）で蚊を破砕した．破砕液を遠心（12000rpm，5分）し，上清をRNA抽出試料とした．

遺伝子検出には，TaKaRa One Step RNA PCR Kit（タカラバイオ㈱）を用いた．PCR用プライマーを表2に

表2　遺伝子の検出に用いたプライマー

検出ウイルス	プライマー	配列
日本脳炎ウイルス及び ウエストナイルウイルス	Fla-U5004	GGAACDTCMGGHTCNCCHAT
	Fla-U5457	GTGAARTGDGCYTCRTCCAT
デングウイルス	Dus	TCAATATGCTGAAACGCGCGAGAAACCG
	Duc	TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTTC
チクングニアウイルス	Chik10294s	ACGCAATTGAGCGAAGCACAT
	Chik10573c	AAATTGTCCTGGTCTTCCTG

神奈川県衛生研究所　微生物部
〒253-0087　茅ヶ崎市下町屋1-3-1

示した．

増幅条件は，53℃10分間インキュベートした後，熱変性92℃１分間，アニーリング53℃１分間，伸長反応72℃１分間を35サイクル行い，72℃で10分インキュベートした．

増幅バンドの有無は，反応産物を1.5％アガロースゲルで電気泳動した後，エチジウムブロマイドで染色し，紫外線照射下で確認した．

結果および考察

蚊の生息状況

日本脳炎，デング熱，チクングニア熱などを媒介する蚊の神奈川県内における生息状況を明らかにするため，2012年に９カ所９定点，2013年に３カ所６定点において蚊の採集を行った．その結果，アカイエカ群（*Culex pipiens* complex）599匹（2012年：468匹，2013年：131匹），コガタアカイエカ（*C. tritaeniorhynchus*）310匹（2012年：163匹，2013年：147匹），ヒトスジシマカ（*Aedes albopictus*）218匹（2012年：70匹，2013年：148匹），オオクロヤブカ（*Armigeres subalbatus*）122匹（2012年：３匹，2013年：119匹），シナハマダラカ（*Anopheles sinensis*）88匹(2012年)，ヤマトヤブカ（*A. japonicus*）２匹（2012年：１匹，2013年：１匹），キンパラナガハシカ（*Tripteroides bambusa*）112匹（2013年），同定不可３匹（2013年）の５属７種1454匹（2012年：793匹，2013年：661匹）が採集された（表３）．アカイエカ群，コガタアカイエカ，ヒトスジシマカ，オオクロヤブカ，ヤマトヤブカ，キンパラナガハシカの６種は，横浜市のサーベイランス事業[1)]や川崎市の調査[2)]において採集されており，神奈川県内に一般に生息している種と考えられる．

表３　蚊の種別採集結果

種類	採集個体数					
	2012年		2013年		合計	
アカイエカ群	468	(59.0%)	131	(19.8%)	599	(41.2%)
コガタアカイエカ	163	(20.6%)	147	(22.2%)	310	(21.3%)
ヒトスジシマカ	70	(8.8%)	148	(22.4%)	218	(15.0%)
オオクロヤブカ	3	(0.4%)	119	(18.0%)	122	(8.4%)
シナハマダラカ	88	(11.1%)	0	(0.0%)	88	(6.1%)
ヤマトヤブカ	1	(0.1%)	1	(0.2%)	2	(0.1%)
キンパラナガハシカ	0	(0.0%)	112	(16.9%)	112	(7.7%)
同定不可	0	(0.0%)	3	(0.5%)	3	(0.2%)
合計	793		661		1454	

県内に生息する蚊の季節消長を調べた結果，アカイエカ群の発生時期は，主に５月下旬～11月下旬であったが，12月まで発生した調査地も見られた（表４）．田部井ら[3)]は，東京のアカイエカの発生時期は４月～12月と報告しており，同様な結果が得られた．

コガタアカイエカの発生時期は，2012年は６月下旬～10月下旬，2013年は５月下旬～９月下旬で，発生のピークは両年とも８月下旬（2012年：12.2±25.6匹，2013年：19.7±17.7匹）に見られた（表５）．神奈川県内のコガタアカイエカの発生時期の調査は，森谷ら[4，5)]によって1958年～1960年代に行われており，発生時期は４月頃～10月上旬頃で，発生のピークは７月～８月頃であると報告されている．本調査でも同様の結果が得られており，1960年代とコガタアカイエカの発生時期に変化がないことが示された．

ヒトスジシマカの発生時期は，2012年は５月下旬～10月下旬，2013年は７月下旬～10月下旬で，発生のピークは，2012年は７月下旬（4.6±7.2匹），2013年は８月下旬（12.5±11.3匹）に見られた（表６）．横浜市のサーベイランス事業[6)]では，発生時期は６月～10月で，発生のピークは８月であり，本調査も同様な結果が得られた．

オオクロヤブカは，2012年は厚木Cで５月下旬，小田原Gで８月下旬，大井Iで７月下旬に採集された（表７）．2013年は，茅ヶ崎Kで８月下旬～10月下旬に採集され，発生のピークは９月下旬（17.8±8.9匹）であった．オオクロヤブカは，南日本において４月～11月まで発生する[7)]とされており，本調査も同様な結果が得られた．

シナハマダラカの発生時期は５月下旬～９月下旬に見られ，発生のピークは８月下旬（15.2±22.7匹）であった（表８）．シナハマダラカは３月頃に越冬個体が活動を開始して，５月頃に次世代成虫が羽化し，10月頃まで活動し，発生のピークは７月頃[7)]とされており，本調査も同様な結果が得られた．

ヤマトヤブカは2012年６月下旬に厚木C，2013年８月下旬に茅ヶ崎Kで採集された（表９）．本調査では採集数が少なかったが，横浜市のサーベイランス事業[1,6)]では，６月～10月まで採集され，採集個体の約２％を占めており，県域でも多数生息する地域があると推測される．ヤマトヤブカの成虫は日当たりのあまりよくない雑木林などで見られる[8)]ことから，雑木林を対象とした調査を行い，ヤマトヤブカの発生時期を明らかにする必要がある．

キンパラナガハシカは茅ヶ崎Kのみで７月下旬～10月下旬に見られ，発生のピークは８月下旬（8.8±8.4匹）であった（表10）．横浜市のサーベイランス事業[6)]では，６月～10月までキンパラナガハシカが採集されており，本調査も同様な結果が得られた．キンパラナガハシカは竹の切株にたまった水などが発生源になる．茅ヶ崎Kには雑木林があり，竹林が混在していることから，そのような場所が発生源になっていると推測された．

表 4　アカイエカ群の月別採集結果

調査年	採集場所	ﾄﾗｯﾌﾟ	雌雄	採集個体数									
				採集時期									合計
				4月 下旬	5月 下旬	6月 下旬	7月 下旬	8月 下旬	9月 下旬	10月 下旬	11月 下旬	12月 下旬	
2012年	厚木A	A-1	F	N.C.	0	0	6	3	2	0	0	N.C.	11
	厚木B	B-1	F	N.C.	0	7	22	45	2	1	0	N.C.	77
	厚木C	C-1	F	N.C.	1	1	1	0	0	0	0	N.C.	3
	海老名D	D-1	F	N.C.	0	0	16	8	0	2	0	N.C.	26
	海老名E	E-1	F	N.C.	3	22	6	24	8	30	42	0	135
	寒川F	F-1	F	N.C.	2	0	12	6	12	5	1	N.C.	38
	小田原G	G-1	F	N.C.	3	9	9	13	1	2	1	N.C.	38
	小田原H	H-1	F	N.C.	3	8	23	15	7	13	3	N.C.	72
	大井I	I-1	F	N.C.	6	36	9	7	4	6	0	N.C.	68
	合計			−	18	83	104	121	36	59	47	0	468
	平均			−	2.0	9.2	11.6	13.4	4.0	6.6	5.2	0	52.0
	標準偏差			−	2.0	12.3	7.5	13.8	4.2	9.7	13.8	−	40.8
2013年	大井I	I-1	F	0	6	9	10	1	5	2	7	0	40
	茅ヶ崎J	J-1	F	0	0	2	3	4	1	0	2	0	12
	茅ヶ崎K	K-1	F	N.C.	N.C.	N.C.	20	2	2	0	1	1	26
		K-2	F	N.C.	N.C.	N.C.	13	2	2	0	1	0	18
		K-3	F	N.C.	N.C.	N.C.	6	1	5	0	0	0	12
		K-4	F	N.C.	N.C.	N.C.	18	2	2	0	1	0	23
	合計			0	6	11	70	12	17	2	12	1	131
	平均			0	3.0	5.5	11.7	2.0	2.8	0.3	2.0	0.2	21.8
	標準偏差			0	4.2	4.9	6.7	1.1	1.7	0.8	2.5	0.4	10.6

F：メス，N.C.：未採集

表 5　コガタアカイエカの月別採集結果

調査年	採集場所	ﾄﾗｯﾌﾟ	雌雄	採集個体数									
				採集時期									合計
				4月 下旬	5月 下旬	6月 下旬	7月 下旬	8月 下旬	9月 下旬	10月 下旬	11月 下旬	12月 下旬	
2012年	厚木A	A-1	F	N.C.	0	1	0	0	4	0	0	N.C.	5
	厚木B	B-1	F	N.C.	0	0	0	10	13	0	0	N.C.	23
	厚木C	C-1	F	N.C.	0	0	0	4	1	0	0	N.C.	5
	海老名D	D-1	F	N.C.	0	0	0	2	0	0	0	N.C.	2
	海老名E	E-1	F	N.C.	0	0	0	5	1	0	0	0	6
	寒川F	F-1	F	N.C.	0	0	0	2	3	0	0	N.C.	5
	小田原G	G-1	F	N.C.	0	2	2	5	11	1	0	N.C.	21
	小田原H	H-1	F	N.C.	0	0	1	2	1	0	0	N.C.	4
	大井I	I-1	F	N.C.	0	0	0	80	12	0	0	N.C.	92
	合計			−	0	3	3	110	46	1	0	0	163
	平均			−	0	0.3	0.3	12.2	5.1	0.1	0	0	18.1
	標準偏差			−	0	0.7	0.7	25.6	5.3	0.3	0	−	28.8
2013年	大井I	I-1	F	0	2	12	9	16	3	0	0	0	42
	茅ヶ崎J	J-1	F	0	0	0	0	2	0	0	0	0	2
	茅ヶ崎K	K-1	F	N.C.	N.C.	N.C.	3	48	0	0	0	0	51
		K-2	F	N.C.	N.C.	N.C.	0	3	0	0	0	0	3
		K-3	F	N.C.	N.C.	N.C.	0	32	0	0	0	0	32
		K-4	F	N.C.	N.C.	N.C.	0	17	0	0	0	0	17
	合計			0	2	12	12	118	3	0	0	0	147
	平均			0	1.0	6.0	2.0	19.7	0.5	0	0	0	24.5
	標準偏差			0	1.4	8.5	3.6	17.7	1.2	0	0	0	20.4

F：メス，N.C.：未採集

表６　ヒトスジシマカの月別採集結果

調査年	採集場所	ﾄﾗｯﾌﾟ	雌雄	採集個体数 採集時期 4月下旬	5月下旬	6月下旬	7月下旬	8月下旬	9月下旬	10月下旬	11月下旬	12月下旬	合計
2012年	厚木B	B-1	F	N.C.	0	0	0	0	1	0	0	N.C.	1
	厚木C	C-1	F	N.C.	2	1	20	3	1	2	0	N.C.	29
	海老名D	D-1	F	N.C.	0	2	4	3	0	0	0	N.C.	9
	海老名E	E-1	F	N.C.	0	1	1	3	0	0	0	0	5
	寒川F	F-1	F	N.C.	0	0	0	2	1	0	0	N.C.	3
	小田原G	G-1	F	N.C.	0	0	1	1	2	0	0	N.C.	4
	大井I	I-1	F	N.C.	0	4	6	2	7	0	0	N.C.	19
	合計			−	2	8	32	14	12	2	0	0	70
	平均			−	0.3	1.1	4.6	2.0	1.7	0.3	0	0	10.0
	標準偏差			−	0.8	1.5	7.2	1.2	2.4	0.8	0	−	10.3
2013年	大井I	I-1	F	0	0	0	1	8	22	1	0	0	32
	茅ヶ崎J	J-1	F	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
	茅ヶ崎K	K-1	F	N.C.	N.C.	N.C.	1	13	2	2	0	0	18
		K-2	F	N.C.	N.C.	N.C.	13	33	19	0	0	0	65
		K-3	F	N.C.	N.C.	N.C.	1	5	1	0	0	0	7
		K-4	F	N.C.	N.C.	N.C.	6	15	4	0	0	0	25
	合計			0	0	0	22	75	48	3	0	0	148
	平均			0	0	0	3.7	12.5	8.0	0.5	0	0	24.7
	標準偏差			0	0	0	5.0	11.3	9.8	0.8	0	0	22.8

F：メス，N.C.：未採集

表７　オオクロヤブカの月別採集結果

調査年	採集場所	ﾄﾗｯﾌﾟ	雌雄	採集個体数 採集時期 5月下旬	6月下旬	7月下旬	8月下旬	9月下旬	10月下旬	11月下旬	12月下旬	合計
2012年	厚木C	C-1	F	1	0	0	0	0	0	0	N.C.	1
	小田原G	G-1	F	0	0	0	1	0	0	0	N.C.	1
	大井I	I-1	F	0	0	1	0	0	0	0	N.C.	1
	合計			1	0	1	1	0	0	0	−	3
	平均			0.3	0	0.3	0.3	0	0	0	−	1.0
	標準偏差			0.6	0	0.6	0.6	0	0	0	−	0.0
2013年	茅ヶ崎K	K-1	F	N.C.	N.C.	0	6	31	2	0	0	39
		K-2	F	N.C.	N.C.	0	2	13	0	0	0	15
		K-3	F	N.C.	N.C.	0	11	12	0	0	0	23
		K-4	F	N.C.	N.C.	0	22	15	5	0	0	42
	合計			−	−	0	41	71	7	0	0	119
	平均			−	−	0	10.3	17.8	1.8	0	0	29.8
	標準偏差			−	−	0	8.7	8.9	2.4	0	0	12.9

F：メス，N.C.：未採集

表８　シナハマダラカの月別採集結果

調査年	採集場所	ﾄﾗｯﾌﾟ	雌雄	採集個体数								
				採集時期								合計
				5月下旬	6月下旬	7月下旬	8月下旬	9月下旬	10月下旬	11月下旬	12月下旬	
2012年	厚木A	A-1	F	0	0	0	1	0	0	0	N.C.	1
	厚木C	C-1	F	1	4	6	3	0	0	0	N.C.	14
	海老名E	E-1	F	0	0	0	17	0	0	0	0	17
	小田原G	G-1	F	0	0	0	1	0	0	0	N.C.	1
	大井I	I-1	F	0	0	0	54	1	0	0	N.C.	55
	合計			1	4	6	76	1	0	0	0	88
	平均			0.2	0.8	1.2	15.2	0.2	0	0	0	17.6
	標準偏差			0.4	1.8	2.7	22.7	0.4	0	0	－	22.2

F：メス，N.C.：未採集

表９　ヤマトヤブカの月別採集結果

調査年	採集場所	ﾄﾗｯﾌﾟ	雌雄	採集個体数								
				採集時期								合計
				5月下旬	6月下旬	7月下旬	8月下旬	9月下旬	10月下旬	11月下旬	12月下旬	
2012年	厚木C	C-1	F	0	1	0	0	0	0	0	N.C.	1
2013年	茅ヶ崎K	K-3	F	N.C.	N.C.	0	1	0	0	0	0	1

F：メス，N.C.：未採集

表10　キンパラナガハシカの月別採集結果

調査年	採集場所	ﾄﾗｯﾌﾟ	雌雄	採集個体数						
				採集時期						合計
				7月下旬	8月下旬	9月下旬	10月下旬	11月下旬	12月下旬	
2013年	茅ヶ崎K	K-1	F	1	0	3	2	0	0	6
		K-2	F	18	19	10	10	0	0	57
			M	0	1	0	1	0	0	2
		K-3	F	0	9	0	1	0	0	10
		K-4	F	8	15	10	4	0	0	37
	合計			27	44	23	18	0	0	112
	平均			5.4	8.8	4.6	3.6	0	0	22.4
	標準偏差			7.8	8.4	5.1	3.8	－	－	23.7

F：メス，M：オス

ウイルスの検出

県内に生息している蚊の日本脳炎ウイルス，ウエストナイルウイルス，デングウイルス，チクングニアウイルスの保有状況を明らかにするために，採集した蚊を175プール（2012年：103プール，2013年：72プール）に分けてRNA抽出を行い， PCR検査を行った．日本脳炎ウイルスとウエストナイルウイルスのPCR検査をアカイエカ群（2012年：52プール，2013年：28プール），コガタアカイエカ（2012年：24プール，2013年：13プール），ヒトスジシマカ（2012年：22プール，2013年：19プール），オオクロヤブカ（2012年：４プール，2013年：11プール），ヤマトヤブカ（2012年：1プール，2013年：１プール）で行い，ウイルス遺伝子は全て不検出であった．デングウイルスとチクングニアウイルスのPCR検査をヒトスジシマカ（2012年：22プール，2013年：19プール）で行い，ウイルス遺伝子は全て不検出であった．

アカイエカ群は，ウエストナイル熱が日本に侵入した場合に媒介種となる可能性が高いとされている．本調査においてウエストナイルウイルスを保有した蚊は確認されなかったが，アカイエカ群は採集数が最も多く，また，すべての調査地で採集されており，ウエストナイルウイルス感染蚊が県内に侵入した場合には，県内全域に感染が広まる可能性が高いと考えられる．

コガタアカイエカは日本脳炎の主な媒介種として知られている．近年，日本で日本脳炎はほとんど発生していないが，日本脳炎ワクチンの接種を控えた時期があり，抗体を持たない世代への感染が危惧されている．本調査で採集されたコガタアカイエカから日本脳炎ウイルスは検出されなかったが，コガタアカイエカは，本調査において採集された蚊の21％を占め，都市部の調査（６％以下）[1, 3]と比較して高かった．コガタアカイエカは水田が主な発生源とされており，本調査を行った田園地帯で感染ブタが発生した場合，都市部に比べて日本脳炎の感染のリスクが高いと考えられる．

ヒトスジシマカは，デング熱やチクングニア熱を媒介することが知られている．2014年８月に東京都においてデング熱の国内感染事例が発生した．感染者は日本全国に広まり，神奈川県でも東京都で感染したと思われる患者が発生した．神奈川県では，そこからさらに感染が広まる事態にはならなかったが，県内でもデング熱の輸入感染例は毎年発生している．神奈川県でヒトスジシマカの発生が多いのは７月～９月であり，この時期にデングウイルスを保有した蚊が侵入するか，感染者が吸血されると国内感染が起こる可能性が高い．そのような国内感染が本県で発生した場合，県内でのヒトスジシマカの発生が10月下旬まで確認されたことから，感染蚊の死滅を確認するために11月まで本種の発生状況を確認する必要があると考える．

シナハマダラカは三日熱マラリアを媒介することが知られている．本調査では５カ所からシナハマダラカが採集され，田園地帯に広く生息している可能性が示された．現在，日本においてマラリアの国内感染は起きていないが，朝鮮半島では現在でも流行が続いており，県内に媒介蚊が侵入した場合，マラリアの再興が起きる可能性は否定できない．

まとめ

本調査によって，海外で発生している感染症を媒介するアカイエカ群，ヒトスジシマカなどの蚊が県域に広く生息している可能性が示された．物流や人の往来によって，いつでも県内に感染蚊が侵入する可能性がある．そのような場合を想定し，まだ明らかになっていない地域の蚊相や発生状況を調査し，県内感染時に備えておく必要があると考える．

謝　辞

ウイルス検査でご協力いただきました当所微生物部鈴木理恵子主任研究員に深謝いたします．

（平成27年８月１日受理）

引用文献

１）横浜市衛生研究所：横浜市内の蚊成虫生息状況調査結果－平成25年６～10月－，検査情報月報，2014年１月，１-２　(2014)

２）川崎市：平成22年度の蚊の捕集結果〈http://www.city.kawasaki.jp/350/page/0000005953.html〉

３）田部井由紀子，岩崎則子，岡崎輝江，長谷川道弥，保坂三継，甲斐明美：東京都におけるウエストナイルウイルス及び日本脳炎ウイルスを媒介する蚊の生息状況，東京都健康安全研究センター研究年報，60，73-78 (2009)

４）森谷清樹，矢部辰男，原田文雄，平野拓雄，宮下一郎，今木恒朗ほか：神奈川県下の豚舎における蚊，とくにコガタアカイエカの季節的消長　1965，1966年の調査結果，1967年度神奈川県衛生研究所年報，17，153-172 (1968)

５）森谷清樹，原田文雄，矢部辰男，平野拓雄，高橋久，今木恒郎ほか：神奈川県下における蚊初発期のライトトラップによる採集成績について，1968年度神奈川県衛生研究所年報，18，157-167 (1969)

6）横浜市衛生研究所：2013年度蚊媒介感染症サーベイランス結果
〈http://www.city.yokohama.lg.jp/kenko/eiken/idsc/pathogen/pdf/2013kakekka.pdf〉
7）佐藤仁彦（編集）：生活害虫の事典，朝倉書店，352pp（2003）
8）加納六郎，篠永哲：日本の有害節足動物，東海大学出版会，389pp（1997）

短報

神奈川県域におけるインフルエンザウイルスA(H1N1)pdm09の遺伝子解析

渡邉寿美，近藤真規子，黒木俊郎

Genetic analysis of influenza virus A(H1N1)pdm09 in Kanagawa Prefecture

Sumi WATANABE, Makiko KONDO and Toshiro KUROKI

はじめに

インフルエンザウイルスは，少しずつ遺伝子変異を繰り返しながら，毎年のように流行する．ヒトにおいてはA（H1N1）型，A（H3N2）型の２種類のA型とB型が単独で，あるいは混合で流行している．しかし，A型は前年までとは全く違う遺伝子配列を持ったウイルスが出現し，世界的大流行（パンデミック）を起こすことがあり，最近では2009年にブタ由来のA（H1N1）型ウイルスpandemic A（H1N1）2009（以下，AH1pdm09）が世界中で大流行した．AH1pdm09ウイルスは，前年までにヒトで流行していたA（H1N1）型（通称Aソ連型）と同じH1N1で表現されるが，遺伝的に異なる系統のウイルスである[1]．

近年では，抗インフルエンザ薬が開発されて早期治療が可能になり，また，ワクチン接種や抗菌剤で 細菌の２次感染を防ぐなど様々な対策により，重症化率は著しく改善している．しかし，2007/2008シーズンには，抗インフルエンザ薬の一つであるリン酸オセルタミビル耐性ウイルスの流行が確認されている．また，過去のパンデミックを参考にすると，1918年にパンデミックを起こしたA（H1N1）型（いわゆる「スペインかぜ」）の場合は，第２波の流行時には罹患者数は第１波よりも少なかったにもかかわらず，死亡率が高くなっている[2]．そのため，AH1pdm09ウイルスに関しても監視する必要があり，病原性への関与が報告されている遺伝子変異について調査を行った．

神奈川県衛生研究所　微生物部
〒253-0087　茅ヶ崎市下町屋1-3-1

材料および方法

パンデミックが発生した2008/2009シーズン以降の６シーズンに神奈川県域（横浜市，川崎市，相模原市および横須賀市を除く神奈川県内，以下，県域）で分離されたAH1pdm09株のうち，入院例29例（死亡３例，脳症12例，肺炎14例）を重症例として選択し，インフルエンザウイルスの８分節遺伝子のうち病原性に関係することが分かっている４つの遺伝子（PB1，PB2，HA，NS1）を対象として遺伝子解析を行った．調査対象とした各遺伝子のAH1pdm09初期分離株における特徴[1]と調査項目は表１のとおりである． また，流行ウイルスの進化の傾向を知るため，感染症発生動向調査病原体定点の検体から分離された株を軽症例として各シーズン10株程度を選択し，HAの遺伝子解析を行った．シーズン毎の調査数は表２のとおりである．

ウイルス分離は，インフルエンザ診断マニュアル（第２版）[3]に準拠し，MDCK細胞を用いて行った．分離株からQIAamp Viral RNA Mini Kit（キアゲン）を用いてRNAを抽出した．抽出RNAからA型共通プライマー（SZA+）[4]およびSuper ScriptⅡRT（ライフテクノロジーズ）を用いて逆転写反応を行い，cDNAを作製した．PB1，PB2およびNS遺伝子のRT-PCR用およびシークエンス用プライマーは，ワクチン株であるA/California/7/2009の遺伝子配列を参考にして作製し，HA遺伝子のRT-PCR用およびシークエンス用プライマーはインフルエンザ診断マニュアル（第２版）[3]に従った（表３）．TaqポリメラーゼはTaKaRa EX Taq Hot Start Version（タカラバイオ）を使用した． PCR産物について，BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit（ライフテクノロジーズ）を用いてダイレクトシークエンス法で塩基配列を決定し，PB1，PB2， HA，NSの病原性に関与する遺伝子変異の有無を確認した． また，HAについてはNeighbor-Joining（NJ）法を用いて進化系統樹を作成し，流行株の特徴を解析した．

結果および考察

重症例の病原性に関与する遺伝子の解析結果を表４に示した．比較対象として，ワクチン株のA/California/7/2009と県域の初期軽症例であるA/Kanagawa/137/2009を用いた．PB1はRNA合成に関与する蛋白で，ヒトのAH3N2由来の特徴を持っている．PB1-F2が発現すると細菌感染による二次感染を重篤化させることが分かっている[5]が，AH1pdm09は３か所（12番目，55番目，88番目）に終止コドンがありPB1-F2は発現していない[1]．県域の分離株からもPB1-F2が発現した株は見つからなかった．

表１ インフルエンザウイルスの病原性に影響する因子の特徴および調査項目

因子	病原性への関与	初期流行株の特徴	調査項目
PB1	PB1-F2蛋白が発現すると細菌感染による二次感染を重篤化させる	未発現	PB1-F2蛋白の発現
PB2	E627K変異したウイルスは病原性が強くなる	E	E627K変異
HA	欧州の重症例の一部にD222G変異がみられる	D	D222G変異
NS	C末端が欠損すると病原性が弱くなる	欠損	C末端の復活

表２ AH1pdm09分離株の調査数

			インフルエンザシーズン＊						
		計	2008/2009	2009/2010	2010/2011	2011/2012	2012/2013	2013/2014	2014/2015
重症例 29	死亡	3	0	3	0	0	0	0	0
	脳症	12	0	11	1	0	0	0	0
	肺炎	14	0	10	2	0	0	2	0
軽症例		48	10	10	10	0	3	8	7

＊９月から翌年８月まで

表３ プライマーセット

	増幅用		シークエンス用	
PB1	A/PB1-f	5’-GAATGGATGTCAATCCCAC-3’	増幅用と同じ	
	AH1pdm/PB1-448r	5’-AGACTTCTATGGTGTTGGCC-3’		
PB2	A/PB2-1654f	5’-TGGATMATCAGRAAYTGGGA-3’	増幅用と同じ	
	A/PB2-2277r	5’-ATTGATGGCCATCCGAATTC-3’		
HA[3)]	H1HA1-BIGIN	5’-AGCAAAAGCAGGGGAAAATAA-3’	swineH1-56-76F	5’-CATTATGTATAGGTTATCATG-3’
	swineH1-1106-1087R	5’-TGATAACCGTACCATCCATC-3’	swineH1-596-578R	5’-GGATGGTGAATGCCCCATA-3’
			swineH1-768-788F	5’-AATAACATTCGAAGCAACTGG-3’
			swineH1-1106-1087R	5’-TGATAACCGTACCATCCATC-3’
NS	AH1pdm/NS-f	5’-ATGGACTCCAACACCATGTC-3’	増幅用と同じ	
	AH1pdm/NS-r	5’-CATTAAATAACGTGAAACG-3’		

A/Califolnia/7/2009 の GenBank Accession No.：(PB1)FJ969531，(PB2)FJ969530，(HA)FJ969540，(NS)FJ969538

PB2は宿主範囲の決定に関与する蛋白で，増殖効率や増殖至適温度に影響する．1997年に香港で分離されたAH5N1の場合は，627番目のアミノ酸がトリ型（E）からヒト型（K）に変異（E627K）した結果，ウイルスの病原性が強くなり患者を死に至らしめたことが分かっているが[6)]，AH1pdm09の場合は北米のトリ由来の特徴を持ち，627番目はトリ型（E）である[1)]．県域の分離株からもE627K変異は見つからなかった．

NS1はウイルス粒子に含まれない非構造蛋白であり，AH1pdm09の場合は古典的ブタ由来株の特徴を持っている．AH1pdm09ではC末端が欠損しているために増殖力が低下していると考えられている[1, 7)]．県域の分離株すべて220番目に終止コドンがあり，C末端は欠損していた．

HAは宿主細胞へのレセプター結合性を決定する蛋白で，AH1pdm09の場合は古典的ブタ由来株の特徴を持っている．1918年のスペインかぜの場合は，187番目がトリ型（E）からヒト型（D）の変異（E187D）が初期に起き，加えて222番目がトリ型（G）からヒト型（D）へ変異（G222D）した後に大流行したが[8)]，

AH1pdm09の場合は両方とも最初からヒト型（D）であり[1]，県域の分離株も同様にヒト型（D）であった．しかし，欧州の重症例患者の一部から該当部分がトリ型に変異（D222G）しているものがあると報告されており[9]，今後も注目して解析する必要があると思われる．

HAの進化系統樹を図1に示した．県域では，パンデミックが発生した2008/2009シーズンの後半から2009/2010シーズンにかけて，2010/2011シーズン，2013/2014シーズンにAH1pdm09の流行がみられたが，2011/2012シーズンは検出が無く，2012/2013シーズンと2014/2015シーズンは散発的な検出にとどまった．2008/2009および2009/2010シーズンの分離株はS203T変異をもつグループ1を形成し，2010/2011と2012/2013シーズンの分離株はS203T，A197T，S185T変異をもつグループ2を形成し，2013/2014と2014/2015シーズンの分離株はS203T，S185T，D97N，T197A，K163Q変異をもつグループ3を形成していた．

表4　重症例における病原性に関係する遺伝子の解析結果

株名		PB1 PB1-F2発現	PB2 E627K変異	HA D222G変異	NS NS1-C末端
ワクチン株	A/Califolnia/7/2009	未発現	E	D	欠損
初期軽症例	A/Kanagawa/137/2009	未発現	E	D	欠損
死亡例	A/Kanagawa/335/2009	未発現	E	D	欠損
死亡例	A/Kanagawa/374/2009	未発現	E	D	欠損
死亡例	A/Kanagawa/384/2009	未発現	E	D	欠損
脳症例	A/Kanagawa/275/2009	未発現	E	D	欠損
脳症例	A/Kanagawa/308/2009	未発現	E	D	欠損
脳症例	A/Kanagawa/315/2009	未発現	E	D	欠損
脳症例	A/Kanagawa/326/2009	未発現	E	D	欠損
脳症例	A/Kanagawa/328/2009	未発現	E	D	欠損
脳症例	A/Kanagawa/329/2009	未発現	E	D	欠損
脳症例	A/Kanagawa/341/2009	未発現	E	D	欠損
脳症例	A/Kanagawa/356/2009	未発現	E	D	欠損
脳症例	A/Kanagawa/377/2009	未発現	E	D	欠損
脳症例	A/Kanagawa/378/2009	未発現	E	D	欠損
脳症例	A/Kanagawa/391/2009	未発現	E	D	欠損
脳症例	A/Kanagawa/34/2011	未発現	E	D	欠損
肺炎例	A/Kanagawa/276/2009	未発現	E	D	欠損
肺炎例	A/Kanagawa/278/2009	未発現	E	D	欠損
肺炎例	A/Kanagawa/350/2009	未発現	E	D	欠損
肺炎例	A/Kanagawa/351/2009	未発現	E	D	欠損
肺炎例	A/Kanagawa/365/2009	未発現	E	D	欠損
肺炎例	A/Kanagawa/371/2009	未発現	E	D	欠損
肺炎例	A/Kanagawa/380/2009	未発現	E	D	欠損
肺炎例	A/Kanagawa/383/2009	未発現	E	D	欠損
肺炎例	A/Kanagawa/10/2010	未発現	E	D	欠損
肺炎例	A/Kanagawa/54/2010	未発現	E	D	欠損
肺炎例	A/Kanagawa/38/2011	未発現	E	D	欠損
肺炎例	A/Kanagawa/42/2011	未発現	E	D	欠損
肺炎例	A/Kanagawa/44/2014	ND	ND	D	欠損
肺炎例	A/Kanagawa/79/2014	ND	ND	D	欠損

ND：シークエンス未実施
A/Califolnia/7/2009のGenBank Accession No.：(PB1)FJ969531，(PB2)FJ969530，(HA)FJ969540，(NS)FJ969538
A/Kanagawa/137/2009のGenBank Accession No.：(PB1)GU136037，(PB2)GU136070，(HA)GU014792，(NS)GU136006

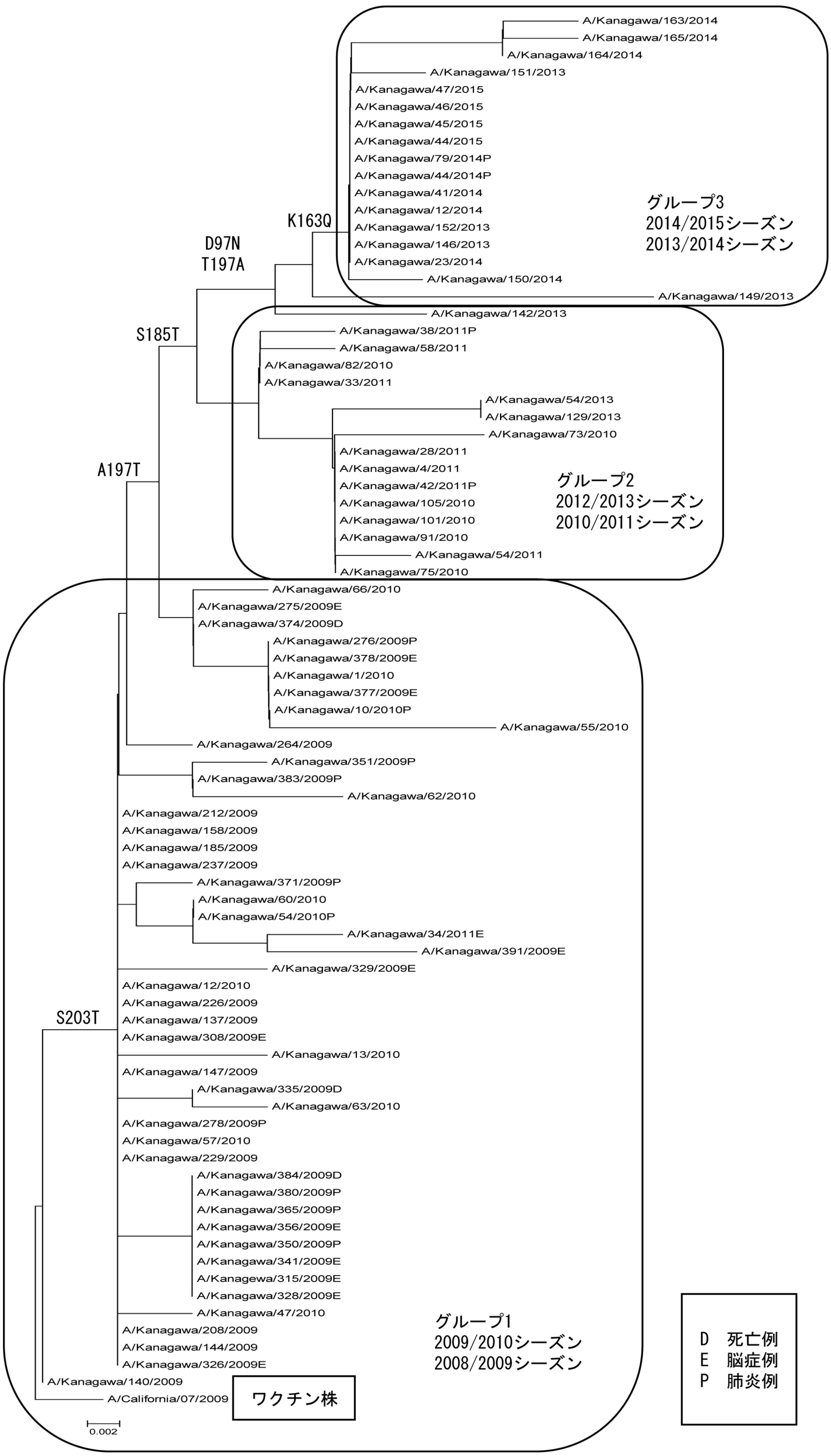


図４ AH1pdm09株のHA遺伝子NJ系統樹（236AA）

29例の重症例の遺伝子解析結果からは，重症化に関係すると考えられる遺伝子変異は確認されず，調査対象とした部分の遺伝子はパンデミック初期から変異していないことがわかった．一方，5シーズン分のHA遺伝子解析では，軽症例，重症例の別なく概ねシーズン毎にグループを形成しており，遺伝子変異の蓄積が起きている様子が伺えた．現段階では，重症化の要因は，ウイルス側の遺伝子変異よりも宿主側に何らかの要因が存在するのではないかと推察される．

AH1pdm09はパンデミックに続くシーズンの後も，2013/2014シーズンに流行がみられたことから，季節性インフルエンザとして定着したと考えられる．今後も，ほかの季節性インフルエンザと共に薬剤耐性や病原性の変化などに注目しながら監視を続けていく必要があると考える．

最後になりましたが，検体採取および患者情報の収集にご協力いただきました医療機関の先生方および県域各保健福祉事務所職員の皆様に深謝いたします．

本研究の一部は，平成25年度神奈川県公衆衛生協会調査研究助成金を受けて実施した．

（平成27年８月１日受理）

文　献

１）杉田繁夫：インフルエンザの世界的広がり（分子疫学），インフルエンザ，**11**，31-48（2010）

２）加地正郎：インフルエンザの流行史，インフルエンザとかぜ症候群，改訂2版，加地正郎編，pp.5-15，南山堂，東京（1997）

３）国立感染症研究所：インフルエンザ診断マニュアル（第２版）

４）Zou,S.：A practical approach to genetic screening for Influenza virus variants， J.Clin. Microbiol.，**35**，2623-2627（1997）

５）Zamarin,D.，Ortigoza,M.B. and Pakese,P.：Influenza A virus PB1-F2 protein contributes to viral pathogenesis in mice， J.Virol.，**80**，7976-7983（2006）

６）Hatta,M.，Gao,P.，Halfmann,P. and Kawaoka，Y.：Molecular basis for high virulence of Hong Kong H5N1 influenza A viruses，Science，**293**，1840-1842（2001）

７）Glaser,L.，Stevevns,J.，Zamarin,D.，Wilson,I.A.，Garcia-Sastre,A.，Tumper,T.M.，et al.：A single amino acid substitution in 1918 influenza virus hemagglutinin changes receptor binding sepecificity，J.Virol.，**79**，11533-11536（2005）

８）Liu,Y.，Childs,R.A.，Matrosovich,T.，Wharton,S.，Palma,A.S.，Chai,W.，et al.：Altered receptor specificity and cell tropism of D222G hemagglutinin mutants isolated from fatal cases of pandemic A(H1N1)2009 influenza virus，J. Virol.，**84**，12069-12074（2010）

９）Garten,R.J.，Davis,C.T.，Russell,C.A.，Shu,B.，Lindstrom,S.，Balish,A，et al.：Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans：Science，**325**，197-201（2009）

短報

パレコウイルス3型による無菌性髄膜炎の流行解析

伊達佳美*，佐野貴子，渡邉寿美，
近藤真規子，黒木俊郎

Analysis of aseptic meningitis epidemic by human parechovirus3

Yoshimi DATE，Takako SANO,
Sumi WATANABE, Makiko KONDO
and Toshiro KUROKI

はじめに

無菌性髄膜炎の主な原因はエンテロウイルス属であり，例年夏季に小児で流行がみられる．エンテロウイルスは無菌性髄膜炎のほか手足口病やヘルパンギーナなどの原因となるが，疾患ごとに検出されるウイルスの血清型には特徴があり，様々な型のエンテロウイルスが周期的に流行することが報告されている[1]．

パレコウイルス属はエンテロウイルス属と同じピコルナウイルス科であり，エンテロウイルス属のエコーウイルス22型，23型が他のエンテロウイルス属とのアミノ酸配列の違いから1999年にパレコウイルス（HPeV）1型，2型に再分類された． その後，HPeV 3型が高熱，胃腸炎症状，一過性下肢麻痺症状を呈した1歳児の糞便から1999年に分離され， 2004年に報告された[2]．

本邦におけるHPeV 3型感染症の流行は2006年，2008年，2011年にみられ，2014年夏季には国立感染症研究所の微生物検出情報（IASR）においてHPeV 3型感染症の入院症例の急増が報告された[3]．当所においても複数の無菌性髄膜炎患者からHPeV 3型が検出された．そこで今回，HPeV 3型による無菌性髄膜炎の流行状況を解析するため，神奈川県の病原体定点医療機関から得られた無菌性髄膜炎患者検体からのウイルス検出状況を集約し，検出されたHPeV 3型の遺伝学的な解析や患者の疫学的特徴を解析したので報告する．

神奈川県衛生研究所　衛生物部
〒253-0087　茅ヶ崎市下町屋1-3-1
*現　企画情報部

対象と方法

1．対象

2013年1月～2014年12月に神奈川県の基幹および小児科病原体定点医療機関から得られた無菌性髄膜炎患者54症例から採取された髄液43検体，咽頭ぬぐい液44検体，糞便40検体，尿1検体の計128検体を用いた．また，疫学的特徴の解析には患者の発生動向調査票のデータを使用した．

2．ウイルス分離・同定

1） 遺伝子増幅法（RT-PCR法，PCR法）

無菌性髄膜炎の主な原因とされるエンテロウイルス（ライノウイルスを含む）， HPeV，ムンプスウイルス，ヘルペスウイルスを対象として各ウイルス遺伝子の検索を行った．すべての検体（128検体）からQIAmp Viral RNA Mini Kit(QIAGEN)を用いて遺伝子を抽出し，RT-PCR法またはPCR法を実施した． RT-PCRはAccess™ RT-PCR System（Promega）を使用した．

各ウイルスの検出には，エンテロウイルスは5’NTR-VP 4部分領域[5]とVP 4 -VP 2部分領域[6]を，HPeVはVP 3 -VP 1部分領域[4]を，ムンプスウイルスはSH gene部分領域[7]を，ヘルペスウイルス（1～8型）はpolymerase gene領域[8]を標的とした．

PCR実施後PCR産物の電気泳動を行い，増幅バンドの有無を確認した．増幅バンドがみられたPCR産物を精製後，ダイレクトシーケンス法（BigDye® Terminator V3．1Cycle Sequencing Kit：Applied Biosystems™）により塩基配列を決定し，塩基配列データーベースに登録されている遺伝子配列との相同性検索により同定を行った．

2）細胞培養法によるウイルス分離

すべての検体をそれぞれ200 μlずつ4種類の細胞株（RD-A，HEp-2，VeroE 6，Vero）に接種し，37℃で5％CO_2に1時間放置後，分離培養液（1％FBS添加MM培地）を1 ml添加し，34℃，5％CO_2で培養を行い，3代まで継代した．分離されたウイルスの同定は，各種抗ウイルス血清を用いた中和試験のほか，細胞より遺伝子を抽出し上記の遺伝子増幅法を行った．

3．HPeV 3型の遺伝子解析

分離されたHPeV 3型の遺伝子情報に，GenBankに登録されているHPeV 1～6型の標準株（HPeV 1型（Accession No. L02971)，HPeV 2型（AJ005695)，HPeV 3型（AB084913)，HPeV 4型（AM235750)，HPeV 5型（AM235749)，HPeV 6型（AB252582)）の遺伝子情報を加え，MEGA 6ソフトウエア[9]を用い近隣接合法による分子系統樹を作成した．

4．無菌性髄膜炎患者の疫学的解析

患者54症例の発生動向調査票の患者情報に基づき，性別，年齢および臨床症状について解析した．

結　果

1．ウイルス検出状況

表１に無菌性髄膜炎患者の症例数とウイルス検出数および検出されたウイルスの内訳を示した．2013年は28症例中18例からウイルスが検出され，検出率は64.3%，2014年は26症例中17例，検出率は65.4%であった．2013年と2014年では症例数，検出率ともに大きな差は見られなかった．

検出されたウイルスの内訳は，2013年はエンテロウイルスが最も多く15株，ヘルペスウイルスが11株，アデノウイルスが１株であり，2014年はHPeV３型が最も多く11株，エンテロウイルスが６株，ヘルペスウイルスが２株であった．

月別の検出傾向を比較すると，2013年では流行の主流であったエンテロウイルスが６～11月に，ヘルペスウイルスが６月と９月を除き４月から11月まで検出された． 2014年ではHPeV３型が６～10月にかけて，エンテロウイルスは７～９月と12月に検出された（図１）．

2．検体・検査方法別検出状況

検体別のウイルス検出状況を表２に示した．エンテロウイルスとHPeV３型は髄液，咽頭ぬぐい液，糞便から検出され，HPeV３型は尿からも検出された．アデノウイルスとヘルペスウイルスのほとんどは咽頭ぬぐい液から検出された．

表１　無菌性髄膜炎患者からのウイルスの検出状況

		検出数	
		2013年	2014年
症例数		28	26
検出症例数(検出率)		18(64.3%)	17(65.4%)
ﾊﾟﾚｺウイルス	HPeV3		11[h) i)]
ｴﾝﾃﾛウイルス	CoxA4		2[h)]
	CoxA16	1	
	CoxB1	2[e)]	
	CoxB3	4[c)g)]	
	CoxB5	1[b)]	
	EV68	1[e)]	
	EV71	1	
	E7	1[a)]	
	E9	1[g)]	
	E16		1
	E18	1[d)]	
	E30		1
	ﾗｲﾉｳｲﾙｽ*	2[f)]	2
小計		15	6
ﾍﾙﾍﾟｽウイルス	HHV-4	1[d)]	
	HHV-5		1[i)]
	HHV-6	3[f)]	
	HHV-7	7[a)b)c)d)]	1
小計		11	2
ｱﾃﾞﾉウイルス	Ad1	1[e)]	
検出株数		27	19

a) E7 と HHV-7 の重複感染
b) CoxB5 と HHV-7 の重複感染
c) CoxB3 と HHV-7 の重複感染
d) E18 と HHV-4 および HHV-7 の重複感染
e) CoxB1 と EV68 および Ad1 の重複感染
f) ライノウイルスと HHV-6 の重複感染
g) CoxB3 と E9 の重複感染
h) HPeV3 と CoxA4 の重複感染
i) HPeV3 と HH-V5 の重複感染
＊ライノウイルスはエンテロウイルスと同一プライマーで検出されるため,エンテロウイルスにライノウイルスも含めて記載

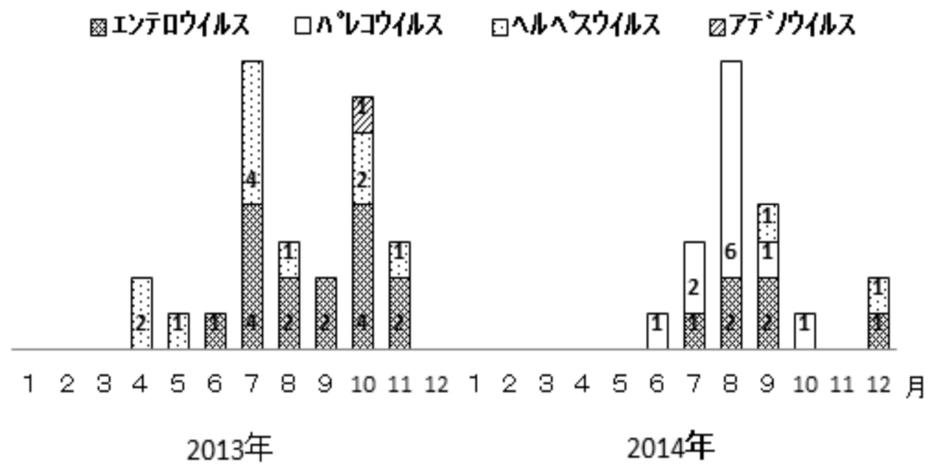


図１　無菌性髄膜炎患者からの月別ウイルス検出状況　(2013.1～2014.12)

表２　検体別ウイルス検出状況

	髄液（43）	咽頭ぬぐい液（44）	糞便（40）	尿（1）	計（128）
HPeV3	7	8	9	1	25
エンテロウイルス	9	13	11	0	33
ヘルペスウイルス	0	13	1	0	14
アデノウイルス	0	1	0	0	1
ムンプスウイルス	0	0	0	0	0
計	16	35	21	1	73

（）は検体数

表３　検出方法別ウイルス検出状況

	検出数	遺伝子増幅法（分離率％）	細胞培養法（分離率％）
HPeV3	11	11（100）	9（81.8）
エンテロウイルス	21	18（85.7）	13（61.9）
ヘルペスウイルス	13	13（100）	0（0）
アデノウイルス	1	NT	1（100）
ムンプスウイルス	0	0（0）	0（0）

検出方法別のウイルス検出数と分離率を表３に示した．HPeV３型と同定された11例のうち，遺伝子増幅法での検出率は100％，細胞培養法では81.8％（９例）であった．一方，エンテロウイルスは，遺伝子増幅法では21例中18例（85.7％），細胞培養法では13例（61.9％）検出された．ヘルペスウイルスは13例とも遺伝子増幅法で検出され，細胞培養法では検出されなかった．

３．HPeV３型の系統樹解析

系統樹解析の結果を図２に示した．各種患者検体から検出された24株は標準株であるHPeV３型：A308-99(AB084913)と同一のクラスターを形成し（Bootstrap値99％），その中で２つのサブクラスターに分かれていた(Bootstrap値≧95％)．HPeV３型が検出された11例のうち８例が藤沢市内，２例が平塚市内，１例が足柄市内の医療機関から得られた検体であるが，発生地域による遺伝学的な差はみられなかった．

４．患者情報による疫学的解析

年代別のウイルス検出状況を表４に示した．HPeV３型はすべて生後３か月未満，エンテロウイルスは19例中９例の約半数が生後１年未満の乳児から検出された．ヘルペスウイルスは13例中1例が生後１年以降の患者から検出された．

無菌性髄膜炎患者54症例のうち，生後１年未満の乳児25症例の男女比と臨床症状を図３に示した．HPeV３型が検出された11例（HPeV３検出群）とそれ以外の14例（HPeV３非検出群）に分け解析した結果，男女比はHPeV３検出群が81.8％対18.2％であったが，HPeV３非検出群では同じ割合であった．臨床症状は，HPeV３検出群ではすべての症例で38℃以上の発熱がみられたが，呼吸器症状がみられた例はなかった．HPeV３非検出群では発熱が71.4％，呼吸器症状は28.6％にみられた．また，HPeV３検出群のその他の症状の内訳をみると，浮腫，白血球減少，チアノーゼ，代償性ショック等，重度の症状がみられた．

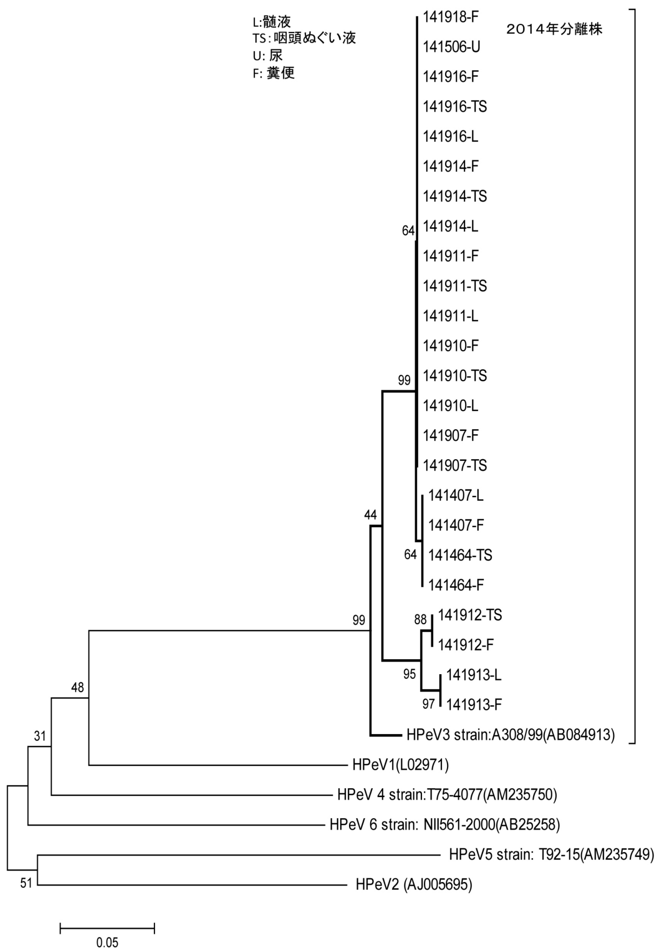


図２　HPeVのVP1-VP3部分領域（261ｂｐ）のNJ系統樹

表４　年齢別ウイルス検出状況

	0-<3M	3-<12M	1-<3Y	3-<13Y	≧13Y	計
患者数	22	3	12	9	8	54
HPeV3	11					11
エンテロウイルス	8	1	2	6	2	19
ヘルペスウイルス	1	1	3	6	2	13
アデノウイルス			1			1
計	24	4	14	14	9	65

＊重複感染例はそれぞれ検出されたウイルス毎にカウント.
ただし,同一属の場合は1とカウント

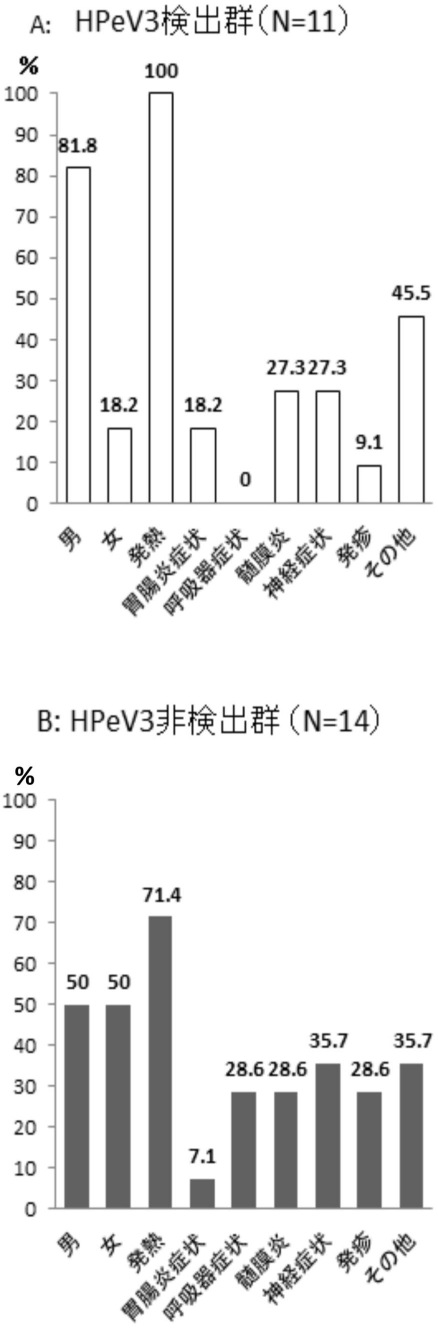


図３　無菌性髄膜炎患者の男女比と臨床症状

考　察

神奈川県における無菌性髄膜炎患者からのウイルス検出状況をまとめたところ，最も多く検出されたウイルスは2013年ではエンテロウイルス，2014年はHPeV３型であった．病原微生物検出情報（IASR）によると，各都道府県市の地方衛生研究所からのHPeV３型の分離/検出報告数は，2013年では３例であったが2014年は333例と急増し（2015年４月27日分報告数），2014年30～31週をピークに22週から40週頃まで検出されている．今回の調査で，神奈川県域においても同時期にHPeV３型が検出されたことから同様の流行があったと考えられた．しかし，IASRの診断名別のHPeV３型分離/検出数をみると，その他・不明が256例と最も多く，以下無菌性髄膜炎38例，上気道炎21例，手足口病18例（2015年４月27日分報告数）であった．神奈川県で検出されたHPeV３型は，無菌性髄膜炎が11例と最も多く，その他手足口病，不明熱，咽頭結膜熱が各１例ずつであった．また，遺伝子解析の結果，今回検出された24株のHPeV３型は，1999年に分離されたHPeV３型の標準株と同一のクラスターを形成したことから，いずれの株も1999年に分離された株と遺伝学的に近縁であり，さらに発生地域における遺伝学的な差がみられないこと，HPeV３型が2014年６月～10月の間に検出されたことから，神奈川県において2014年の夏季に遺伝学的に近縁のHPeV３型による無菌性髄膜炎の流行があったと考えられた．

HPeV３型が検出された無菌性髄膜炎患者はいずれも生後３か月未満で，エンテロウイルスなど他のウイルスが検出された患者よりも低月齢である傾向がみられた．また，男性から多く検出されたが，検出例が少なく男女の違いによる臨床症状の差は認められなかった．共通する臨床症状は高熱で，無菌性髄膜炎を発症していることから重症例であったと考えられるが，上気道炎など呼吸器症状はみられなかった．HPeV３型は不顕性感染が多いとされるが，乳児に感染した場合は中枢神経系の関連が報告されている[10),11)]．オーストラリアではHPeV３型感染乳児118例のほとんどが敗血症様の症状を呈し，高い確率で高熱，頻脈，循環障害，易刺激性が認められたことが報告されている[12)]．国内でも同様に発熱，頻呼吸，頻脈，網状チアノーゼ，白血球値減少，脳症等呈した敗血症ショック例など重症例が報告されている[13)]．今回データとして使用した発生動向調査票にもHPeV３型検出群はこれらの症状が記載された例もみられ，重症化する理由として，母体からのHPeV３型に対する移行抗体が少なく，出生直後の免疫能が未熟なためと推察されている[14)]．HPeV３型の病原性や疫学的特徴から，罹患する年齢や性別が関与すると考えられたが，その解明には更

に検出例を増やして調査する必要がある.

無菌性髄膜炎の原因ウイルスを検索する際，髄液からの検出が重要であるが，検体として髄液のほか咽頭ぬぐい液，糞便などが検査対象となる．検体別のウイルス検出状況から，HPeV３型は髄液以外の検体からも検出され，HPeV３型はいずれの検体にも存在することが確認された．また，検出法の比較において，HPeV３型の検出はVP３-VP１部分領域を標的としたRT-PCR法が高感度であったが，細胞培養でもVeroあるいはVeroE６から高確率で分離されており，今後遺伝学的，ウイルス学的性状の解析を行うためには検体からの遺伝子増幅法（RT-PCR法，PCR法）と細胞培養の併用は重要であると考えられる.

2014年におけるHPeV３型の流行は予測されていたが，エンテロウイルスと同様，今後周期的に流行する可能性がある．HPeV３型感染症は臨床症状が多岐に渡っており，低月齢で罹患すると重症化する理由など不明な点も多く残されている．今後，HPeV３型の実態を把握し，不明点を解明していくことは公衆衛生上重要であると考えられた.

謝　辞

本調査を実施するにあたり，多大なご協力を頂きました基幹および小児科病原体定点医療機関の先生方と藤沢市保健予防課の皆様に深謝いたします.

（平成27年８月１日受理）

文　献

１）Cherry, JD. And Shields, W.D.: Aseptic meningitis and viral meningitis, In " Textbook of Pediatirc infectious diseases 4th Ed" , pp.457-467, Saunders, Philaderphia (1998)

2　Ito, M., Yamashita, T., Tsuzuki, H., Takeda, N. and Sakae, K.: Isolation and identification of a novel human parechovirus, J. Gen. Virol., **85**, 391-398 (2004)

３）相澤悠太，鈴木優子，大石智洋，齋藤昭彦，渡邉香奈子：新潟県におけるヒトパレコウイルス３型感染症の患者報告の急増，国立感染症研究所　病原体微生物情報，**35**，220（2014）

４）Harvala, H., Robertson, I., McWilliam, Leitch.E.C., Benschop, K., Wolthers, KC., et al.: Epidemiology and Clinical Associations of Human Parechovirus Respiratory Infections., J. Clin. Microbiol., **46**, 10, 3446-3453 (2008)

５）川俣　治：RT－PCR法によるエンテロウイルス及びライノウイルスの検出系，新潟医学界雑誌，**111**，633-646（1997）

６）宗村徹也，藤本嗣人，近平雅嗣，木村博一，西尾治，吉田弘ほか:エンテロウイルス遺伝子診断法における市販RNA 抽出キット選択の影響，感染症学雑誌，**82**，55-57（2008）

７）加藤篤，竹内薫，唐内良明，木所稔，青森県環境保健センター，長崎県衛生公害研究所他：ムンプスウイルス病原体検査マニュアル，国立感染症研究所〈http://www.nih.go.jp/niid/images/lab-manual/Mumps2015.pdf〉

８）Johnson, G., Nelson, S., Petric, M. and Tellier, R.: Comprehensive PCR-based assay for detection and species identification of human herpesviruses., J. Clin. Microbiol., **38**, 3274-3279 (2000)

９）Tamura, K., Stecher , G., Peterson, D., Filipski, A. and Kumar, S.: MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0, Molecular Biology and Evolution, **30**, 2725-2729 (2013)

10) Wolthers, K.C., Benschop, K.S., Schinkel, J., Molenkamp, R., Rosemarijn, M., Bergevoet, R.M., et al.: Human parechoviruses as an important viral cause of sepsislike illness and meningitis in young children., Clin. Infect. Dis., **47**, 358-63 (2008)

11) Harvala, H., Robertson, I., Chieochansin, T., McWilliam Leitch, E.C., Templeton, K. and Simmonds, P.: Specific Association of Human Parechovirus Type 3 with Sepsis and Fever in Young Infants, as Identified by Direct Typing of Cerebrospinal Fluid Samples, J. Infect. Dis., **199**, 1753-1760 (2009)

12) Khatami, A., McMullan, B.J., Webber, M., Stewart, P., Francis, S., Timmers, K.J. et al.: Sepsis-like disease in infants due to human parechovirus type 3 during an outbreak in Australia, Clin. Infect. Dis., **60**, 228-36 (2015)

13) 澤田奈実，問田千晶，六車崇，宮入烈： 重篤化した乳児期ヒトパレコウイルス感染症の2例，日集中治誌，**21**，3，258-262（2014）

14) Abed, Y. and Boivin, G.: Human parechovirus types 1, 2 and 3 infections in Canada, Emerg. Infect. Dis., **12**, 969-75 (2006)

神奈川県衛生研究所研究報告　No. 45 (2015)
Bull. Kanagawa Ins. of P.H.

短報

麻疹疑い患者からの麻疹ウイルス検出状況と遺伝子解析

鈴木理恵子，金城恵子，高橋淳子，
近藤真規子，黒木俊郎

Detection and genetic analysis of Measles virus from suspected Measles patients in Kanagawa Prefecture

Rieko SUZUKI, Keiko KINJYO, Junko TAKAHASHI, Makiko KONDO and Toshiro KUROKI

はじめに

麻疹は，一般的には「はしか」とも呼ばれ，麻疹ウイルス（Paramyxovirus科Morbillivirus属）による感染症で，38℃前後の高熱に続き，咳や鼻水（カタル症状），口腔内に出現するコプリック斑，全身に出現する特有な発疹が特徴の全身性ウイルス感染疾患である．感染経路は空気感染，飛沫感染，接触感染など様々であるが感染力が非常に強い上，罹患すると稀に急性脳炎を発症し，精神発達遅滞等の重篤な後遺症が残る場合や，さらに稀ではあるが，亜急性硬化性全脳炎を発症した場合には数年以内に死に至る．このような麻疹の感染力や重篤性，流行した場合の社会に与える影響を考えると，予防に積極的に取り組むべき重要な疾患である．

我が国においては，麻疹患者発生の減少に伴い，自然感染による免疫増強効果が得づらくなってきたことから，予防接種は，それまでの１回接種から２回接種へと移行し，より確実に免疫を獲得できる体制をとっていた．しかし，2007年には首都圏の10～20歳代を中心に大流行が起こった．厚生労働省は「麻しんに関する特定感染症予防指針」（以下，指針）（2007年12月28日厚生労働省告示第442号）を策定し，予防接種の対象者を拡大するなどの施策を推進し，2012年度までの麻疹排除を目標としたが達成に至らなかった．その後，指針の一部を改訂（2013年３月30日改訂厚生労働省告示第126号）し，2015年度までに麻疹排除を達成し，WHO（世界保健機関）西太平洋地域事務局の排除認定をうけ，引き続き麻疹の排除状態を維持することを目標とした．

神奈川県衛生研究所　微生物部
〒253-0087　茅ヶ崎市下町屋1-3-1

また，「感染症の予防及び感染症患者に対する医療に関する法律」が2008年に一部改正され，麻疹を５類感染症の全数報告疾患として指定し，届出には臨床診断および麻疹IgM抗体測定または病原体の検出などの検査診断を満たすこととなった．しかし，麻疹IgM抗体検査は，麻疹以外の疾患でも陽性になることがあり，厚生労働省は2010年11月，麻疹の確定診断にはPCR法等による病原体検査診断の実施を推奨し，2013年に改訂された指針には，原則として全例にウイルス遺伝子検査等を実施し，麻疹ウイルスが検出された場合には遺伝子配列の解析の実施が明記され，土着株による感染ではないことを遺伝子型解析により明らかにすることになった．神奈川県では，病原体による検査診断が強化された2010年11月より，５類全数報告疾患として届出のあった麻疹疑い症例について，PCR法による遺伝子検査および陽性例について遺伝子型解析を実施している．2007年の麻疹の大流行後，患者報告数は徐々に減少していたが，2013年末から2014年にかけて，全国的に麻疹報告数の増加がみられ，2014年には，神奈川県においても麻疹報告数の増加がみられたことから，その流行状況および流行株の遺伝子学的特徴について報告する．

材料および方法

2014年１月から12月に神奈川県域（横浜市，川崎市，横須賀市，相模原市を除く）で発生した麻疹疑い症例58例133検体（咽頭ぬぐい液57検体，血液36検体，尿40検体）について，病原体検出マニュアル第２版麻疹[1)]（以下：麻疹マニュアル）に準じ，麻疹ウイルス遺伝子の検出と解析を行った．

１．ｃDNAの作製

咽頭ぬぐい液は3,000rpm，20分間遠心後，上清を抽出用検体とした．EDTA等の抗凝固剤入り血液は3,000 rpm，20分間遠心後，血球分画表層の白血球層を回収し，元の血液と同量のウイルス保存液を添加し抽出用検体とした．尿は1,500rpm，10分間遠心後，沈渣細胞を２～３mlのウイルス保存液に再浮遊させ抽出用検体とした．市販のウイルスRNAキットQIAamp viral RNA mini kit（キアゲン）を用いて，抽出用検体140μlから説明書に準じてウイルスRNAを抽出した．逆転写反応は，PrimeScript RT reagent kit（タカラバイオ）を用い，5×PrimeScript Buffer 4μl, PrimeScript RT Enzyme Mix I 1μl, Random 6mers 4μl, RNase Free dH2O 1μlの反応液に抽出RNA10μlを添加し全量を20μlとし，37℃15分，85℃５秒逆転写反応を行いcDNAを作製した．

２．麻疹ウイルス遺伝子の検出と解析

麻疹マニュアルに従い，Ｎ遺伝子，Ｈ遺伝子の増幅を行った．遺伝子の増幅には，Ｎ遺伝子増幅用プライマー（pMvGTf1m，pMvGTr1：1st，pMvGT2m，pMvGTr2：2nd），Ｈ遺伝子増幅用プライマー（MHL1，MHR1：1st，MHL2，MHR2：2nd）およびPerfectShot Ex-Taq（Loading dye mix）（タカラバイオ）を用い，RT-nested PCRを行った．PCR産物は1.5%アガロースゲルを用いて電気泳動し，エチジウムブロマイドで染色後，紫外線下で増幅バンドの有無を確認した．Ｎ遺伝子の増幅バンドが見られたＰＣＲ産物については，BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit（ABI）を用い，ダイレクトシークエンス法により塩基配列を決定し，Ｎ遺伝子領域の配列情報を構築した．検出株にWHOが定めた遺伝子型参照株を加え，解析ソフトMEGA5[2]を用いて，Neighbor-Joining法によるＮ遺伝子（450bp）の系統樹を作成し遺伝子型の解析を行った．

結果および考察

表１に発病月別麻疹疑い患者からのウイルス検出状況を示した．

2014年１月から12月に搬入された麻疹疑い例58例133検体について，麻疹ウイルス遺伝子の検出を行ったところ，2014年１月，２月，３月に１例ずつ，５月２例，６月６例，７月４例，８月３例，11月２例の計20例43検体から麻疹ウイルス遺伝子が検出され，検出率は34.5％（咽頭拭い液33.3％，血液25.0％，尿37.5％）であった．麻疹ウイルスは，2010年の病原体の検査診断の実施以降，2011年に１例（2.2％），2013年に３例（4.7％）検出されたのみであったが，2014年は20例（34.5％）と増加した．全国的には，2013年末から麻疹患者の増加がみられ，2014年４月以降の麻疹患者報告数は減少傾向であったが[3]，神奈川県内では2014年の５月から８月にかけて患者数の増加がみられた．麻疹ウイルス遺伝子が検出された20例の詳細を表２に示した．

20例中ワクチン接種歴無あるいは不明は16例，接種歴有が４例であった．20歳以下の4例は接種歴無で，うち３例は１歳以下であり，定期ワクチンの接種前に感染した．20歳以上では，16例中12例がワクチン接種歴無あるいは不明であったが，４例は接種歴有と回答している．接種歴があっても，感染を防御するために必要な抗体価を保有していないこともある．また，罹患歴が明確でない，ワクチン接種歴不明または１回である場合には，積極的にワクチン接種をおこない，感染を防御できる抗体を獲得することが予防として重要である．

20症例43検体について，検体ごとのウイルス遺伝子検出率を見てみると，咽頭ぬぐい液が100％と最も高く，次いで尿93.8％，血液は64.3％と低かった．血液の14例

表１　発病月別麻疹疑い例からの麻疹ウイルス検出状況

年　月	症例数	検　体　数			検出症例数	検出検体数		
		咽頭拭い液	血液	尿		咽頭拭い液	血液	尿
2014年　1月	2	2	1	1	1	1	0	0
2月	3	3	1	0	1	1	0	0
3月	2	2	1	2	1	1	0	1
4月	6	6	2	3	0	0	0	0
5月	7	7	4	4	2	2	1	2
6月	11	10	9	9	6	5	4	6
7月	8	8	7	6	4	4	2	3
8月	9	9	6	6	3	3	1	1
9月	1	1	0	1	0	0	0	0
10月	2	2	1	1	0	0	0	0
11月	6	6	3	6	2	2	1	2
12月	1	1	1	1	0	0	0	0
合計	58	57	36	40	20	19	9	15
（検出率%）					(34.5)	(33.3)	(25.0)	(37.5)

表２　麻疹ウイルス遺伝子検出例の詳細（2014年１月～12月）

症例No.	発症日	年齢	性別	麻疹ワクチン接種歴	PCR結果			採取病日	遺伝子型	備考
					咽頭ぬぐい液	血液	尿			
1	1月20日	1	F	無	検出	NT	NT	8	B3	渡航歴あり（フィリピン）
2	2月10日	25	F	有	検出	NT	NT	6	B3	
3	3月22日	28	M	不明	検出	NT	検出	5	B3	
4	5月24日	19	M	無	検出	NT	検出	6	D8	麻疹患者との接触歴あり
5	5月24日	29	M	不明	検出	検出	検出	7	D8*	
6	6月23日	22	M	不明	NT	検出	検出	2	D8	麻疹患者との接触歴あり
7	6月20日	29	M	不明	検出	検出	検出	7	D8	
8	6月25日	31	F	不明	検出	検出	検出	7	D8	
9	6月25日	21	F	無	検出	不検出	検出	8	D8	
10	6月25日	45	F	無	検出	検出	検出	10	D8	
11	6月23日	31	F	無	検出	NT	検出	11	D8	
12	7月4日	26	M	無	検出	検出	検出	1	D8	麻疹患者No.11（家族）との接触歴あり
13	7月7日	33	F	無	検出	不検出	検出	5	D8	麻疹患者No.8（家族）との接触歴あり
14	7月11日	49	M	有	検出	検出	検出	2	D8	麻疹患者No.10（家族）との接触歴あり
15	7月20日	0	F	無	検出	不検出	検出	9	D8	
16	8月1日	29	F	有	検出	検出	不検出	1	D8	麻疹患者No.15（家族）との接触歴あり
17	8月6日	32	F	有	検出	不検出	検出	5	B3	
18	8月17日	0	F	無	検出	不検出	NT	6	B3	
19	11月7日	41	M	不明	検出	検出	検出	6	D8	渡航歴（ベトナム）
20	11月7日	58	F	不明	検出	NT	検出	12	D8	渡航歴（ベトナム）

＊：H遺伝子で遺伝子型を決定

中５例は遺伝子が検出されず，これら５例の検体採取時期は，発病日から５日以上経過していた．また，尿は17例中16例から遺伝子が検出されたが，発病当日に採取された１例からは，遺伝子が検出されなかった．しかし，発病から８日以上経過後に採取された尿５検体からは，遺伝子が検出できた．麻疹の病原体検査に適切な検体は，咽頭ぬぐい液，血液，尿であり，採取に適切な時期は，発症２－３日前から発疹出現後１週間程度とされている[1]．麻疹の適切な病原体検査には，発病後速やかに，咽頭ぬぐい液を含んだ２種類以上の検体を確保することが望ましいが，発疹出現後８日以上経過した症例については，尿からの検出が可能であった．検体採取に適切な時期を逸した場合は，尿による検査が有効と考えられた．麻疹ウイルス遺伝子型は，Ｎ遺伝子領域の解析により決定した．その結果，20例中Ｂ３型が５例，Ｄ８型が14例であったが，１例（症例５）はＮ遺伝子領域の増幅ができなかったため，Ｈ遺伝子領域について解析し，Ｄ８型と決定した．

図１に麻疹ウイルスのＮ遺伝子（450bp）の分子系統樹を示した．

今回検出されたＢ３型５例は，2014年に香港で報告されたMvs/HongKongCHN/10.14/3[B3]と同一のクラスターを形成していた．５例のうち１月の１例（症例１）にはフィリピンへの渡航歴があったが，他の４例には渡航歴はなく，疫学調査では麻疹患者との接点はなかった．2013年末から2014年にかけては，日本国内においてフィリピンを中心としたアジア諸国からの輸入例が多数報告[3]され，各地で二次感染事例の報告例[4]もあったことから，この４症例も国内での感染事例と思われた．

Ｄ８型は，ベトナム，インドネシアなどの地域から報告[3,5]されている．Ｄ８型14例は２つのクラスターを形成し，このうち11月に発症した２例（症例19，症例20）はベトナムへの渡航歴があり，2014年にベトナムで報告されたMvs/HoChiMinh.VNM/9.14/MV2[D8]と同一のクラスターを形成していた．この２例は，渡航時期および渡航先での立ち寄り場所が一致しており，ベトナムでの感染が推定された．また，この患者からの国内での二次感染の報告は確認されていない．

５月から８月に検出された12例は，2012年にインドで報告されたMvs/UttarPradesh.IND/11.12/6478[D8]と同一のクラスターを形成していた．この12例のうち，初めて県域で検出されたのは，５月の１例（症例４）で，東京都Ｍ市の学校で麻疹患者との接触歴があった．Ｍ市の学校の麻疹患者は，カザフスタンへの渡航歴のある東京都Ｈ市の麻疹患者からの二次感染者であることが確認されていた．この学校では，５月から６月にかけて症例

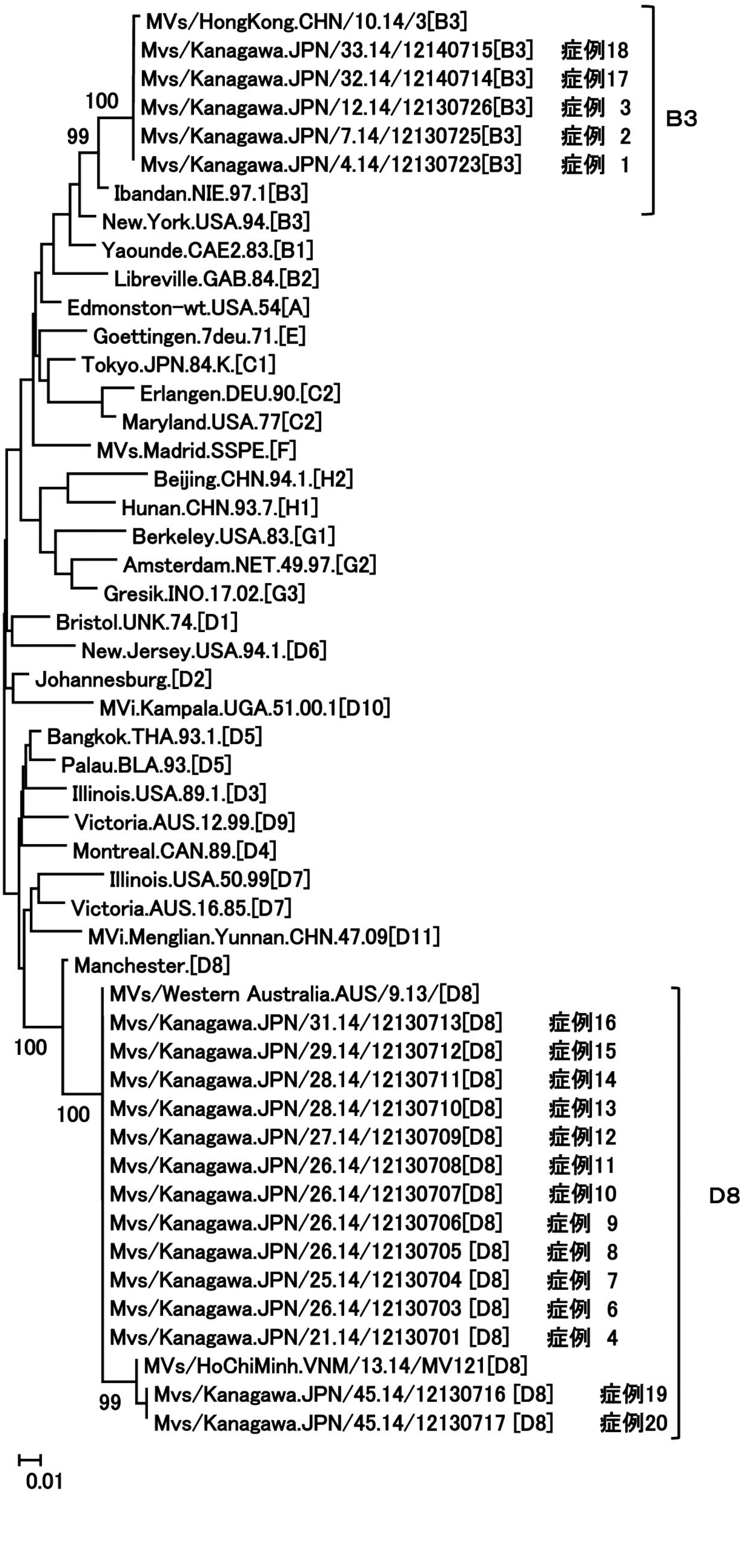


図1　麻疹ウイルスのN遺伝子領域（450bp）の分子系統樹

４を含む８名の麻疹患者が報告され，学校内で感染が広まっていた．患者の居住地は，東京都市部，横浜市，川崎市，神奈川県域と広域にわたっており，学校以外での二次感染が懸念されていた．６月１例（症例６）は，症例４とは異なる東京都M市の学校での麻疹患者との接触歴が確認されている．この学校での麻疹患者は症例６を含む３名であったが，症例４と症例６の学校間での交流や，患者間の接触歴などの接点は確認できなかった．神奈川県内では６月の下旬以降，渡航歴もなく麻疹患者との接触歴が不明な６例（症例７，８，９，10，11，15）の麻疹患者の発生が続き，感染ルートを解明するために疫学調査が行われたが，疫学的接点は見いだせなかった．７月から８月に発生した４例（症例12，13，14，16）は，同居する麻疹患者（症例８，10，11，15）との接触により起こった家族内感染であった．

麻疹は感染力が非常に強い感染症であり，免疫のない集団に１人の発症者が入ると12人～14人に感染させる可能性がある[6)]．５月から８月に発生したＤ８型の患者発生の特徴は，発生地域は県央地区および湘南地区に限定されていたことと，患者の多くは，公共交通機関の利用歴があり，ショッピングモール等，多くの人と接触する機会のある場所へ立ち寄りがあったため，発生時期が４ヶ月の長期に渡っていたことである．今回の事例では，症例間での直接的な接触の確認はできず，感染経路は不明であったが，分子系統樹では同じクラスターを形成することが確認されたことから，５月に東京都で発生した輸入麻疹例を発端に，感染を防御できる十分な抗体を保持しない人々を中心に麻疹が伝播したと考えられた．

神奈川県域では，毎年麻疹ウイルス抗体保有状況の調査[7)]を行っており，凝集反応（PA）法で抗体価16倍以上を抗体陽性と判定している．2014年に実施した全国調査[8)]では，抗体保有率は95％で，2013年と同等であったが，神奈川県域の抗体保有率は，2012年97%，2013年91％，2014年87％と年々減少傾向である．神奈川県域における麻疹の抗体保有率は全国的にもかなり低く，感染が蔓延しやすい状況である．麻疹の感染拡大を未然に防ぐためには，ワクチン接種による抗体保有することが効果的であるため，今後もワクチン接種の推奨を喚起していく必要がある．

2015年３月27日付でWHO西太平洋地域事務局は，日本を麻疹排除状態にあることを認定した．我が国の指針では，「2015年までの麻疹排除を達成しWHOによる麻疹排除の認定を受ける」ことを目標とし，適切なサーベイランス体制の下，病原体診断による遺伝子型の解析を実施する取り組みを行い，これを達成することができた．地方衛生研究所は，今後も指針に基づき，麻疹対策の推進に努め，排除状態を維持する取り組みや，発生状況の把握を行っていく必要がある．

謝　辞

本調査を実施するにあたり，多大なご協力をきました医療機関の関係者の方々，保健福祉事務所ならびに県健康危機管理課の皆様に深謝いたします．

（平成27年８月１日受理）

文　献

１）病原体検出マニュアル　麻疹 第２版

２）Koichiro T., Daniel P., Nicholas P., Glen S., Masatoshi N. and Sudhir N.: MEGA5: Molecular Evolutionary Gentics Analysis Using Maximum Lilelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods, Mol. Biol. Evol. **28**(10), 2731-2739 (2011)

３）麻疹2015年３月現在，病原微生物検出情報（IASR），**36**，51-53（2015）

４）石川真理子，中島閲子，松島勇紀，駒根綾子，清水英明，大嶋孝弘ほか：フィリピン渡航者からの麻疹ウイルス遺伝子型B3の検出-川崎市，病原微生物検出情報（IASR），**35**，102-103（2012）

５）国立感染症研究所：麻疹ウイルス分離　検出情報，病原微生物検出情報（IASR）〈http://www.nih.go.jp/niid/ja/iasr-measles.html〉

６）国立感染症研究所：疾患別情報　麻疹，感染症情報センター（IDSC）〈http://idsc.nih.go.jp/disease/measles/QA.html〉

７）鈴木理恵子，金城恵子，近藤真規子,黒木俊郎：神奈川県（横浜市・川崎市・横須賀市・相模原市および藤沢市を除く）の麻疹ウイルス抗体保有状況，神奈川の感染症－平成26年度－

８）佐藤弘，多屋磐子，大石和徳；2014年度麻疹感受性調査および予防接種状況調査実施都道府県：2014年度麻疹予防接種状況および抗体保有状況－2014年度感染症流行予測調査（暫定結果），病原微生物検出情報（IASR），**36**，60-62（2015）

神奈川県衛生研究所研究報告　No. 45 (2015)
Bull. Kanagawa Ins. of P.H.

短報

うなぎ蒲焼き中のマラカイトグリーン試験法の検討及び妥当性評価

小菅教仁[2]，福光徹[1]，脇ますみ[1]，
林孝子[1]，岸弘子[1]

Examination and validation on the analysis of malachitegreen in broiled eels

Norihito KOSUGE, Toru FUKUMITSU,
Masumi WAKI, Takako HAYASHI
and Hiroko KISHI

緒　言

トリフェニルメタン系合成抗菌剤であるマラカイトグリーン（以下，MG）は，食品，添加物等の規格基準[1)]で，食品において「不検出」とされる農薬等の成分である物質（以下，不検出物質）として規定されている．MG及びその代謝物であるロイコマラカイトグリーン（以下，LMG）の試験方法は食品，添加物等の規格基準[1)]で定められている（以下，告示試験法）が，平成22年12月の通知[2)]により，告示試験法についても，同等以上の性能を有すると認められる試験法による試験が可能となった．

また，平成22年12月の通知[3)]により改正された，「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドライン（以下，妥当性評価ガイドライン）」では，告示試験法も妥当性評価の対象とされ，安定同位元素標識標準品（以下，サロゲート）を使用した場合には，その回収率が40％以上であることを確認することとされた．当所では，告示試験法に従い，サロゲートを用いた内標準法により，高速液体クロマトグラフ-タンデム質量分析計（LC-MS/MS）を用いて，うなぎ蒲焼き中のMG及びLMG検査を実施してきたが，LMGのサロゲートの回収率が40%未満であった．

1 神奈川県衛生研究所 理化学部
〒253-0087 茅ヶ崎市下町屋1-3-1
2 神奈川県食肉衛生検査所
〒243-0022 厚木市酒井892-1
前　神奈川県衛生研究所　理化学部

これまでに，LMGのサロゲートの低回収率に対する改善法について，告示試験法を改良した試験法[4), 5)]が報告されている．そこで今回，これらの試験法を参考に，告示試験法の試験溶液及び前処理方法を検討し，妥当性評価を実施したので報告する．

方　法

1．試　料

うなぎ蒲焼きの皮及びたれを可能な限り取り除き，細切，均一化したものを試料とし，あらかじめMG及びLMGを含まないことを確認した．

2．試薬等

標準品はいずれも和光純薬工業㈱製を用いた．MGしゅう酸塩及びLMG標準品は高速液体クロマトグラフ用を用いた．サロゲートとして，MG及びLMGを重水素標識したMG-d5しゅう酸塩及びLMG-d5標準品を使用し，いずれも環境分析用を用いた．各標準品を精密に量り，メタノールに溶解して100 μg/mLの標準原液を調製した．各標準原液を混合し，0.05%ぎ酸含有メタノール溶液で希釈し，各サロゲートが0.025 μg/mL含まれるよう混合標準溶液を調製した．内標準液は，各サロゲートの濃度が0.025 μg/mLになるよう0.05%ぎ酸含有メタノール溶液を用いて調製した．

クエン酸・リン酸緩衝液（pH3.0）は，クエン酸63.0 gを水に溶かして1000mLとしたものと，リン酸二ナトリウム215gを水に溶かして1000mLとしたものをpH3.0となるように混和した．

固相抽出カラムはAgilent Technologies社製Bond Elut SCX（500mg），GL Science社製Inert Sep C18（1g），GL Science社製Inert Sep NH_2（500mg）及びGL Science社製Inert Sep PSA（500mg）を用いた．

試薬及び試液はいずれも和光純薬工業㈱製を用いた．アセトニトリルは残留農薬・PCB試験用及びLC/MS用，メタノール，ぎ酸及びぎ酸アンモニウムはLC/MS用，無水硫酸ナトリウム及び塩化ナトリウムは残留農薬・PCB試験用，その他の試薬は特級を用いた．

3．装置及び測定条件

高速液体クロマトグラフ（HPLC）はWaters社製ACQUITY UPLC H-classを，質量分析装置（MS/MS）はWaters社製Xevo TQを用いた．分析カラムは化学物質評価研究機構製L-column2 ODS（2.1mm i.d.×150 mm，3 μm）を用いた．その他の測定条件を表1に，各分析対象化合物の多重反応モニタリング（MRM）測定パラメータを表2に示した．

表１　HPLC及びMS/MS測定条件

HPLC条件			
移動相	A：0.01mol/Lぎ酸アンモニウム溶液		
	B：アセトニトリル		
グラジェント条件	B:10%(0分)→50%(8分)→99%(9分)→100%(10分)→100%(18分)		
カラム温度	40℃		
流速	0.2mL/min		
注入量	5μL		
MS/MS条件			
イオン化方式	ESI＋	ソース温度	150℃
測定モード	MRM	脱溶媒温度	500℃
キャピラリー電圧	3kV	脱溶媒ガス流量	800L/Hr
コーンガス流量	50L/Hr	コリジョンガス流量	0.15mL/min

表２　MRM測定パラメータ

分析対象化合物	ﾌﾟﾘｶｰｻｰｲｵﾝ (m/z)	ﾌﾟﾛﾀﾞｸﾄｲｵﾝ (m/z)	Cone (V)	Coll (eV)
MG	329.2	313.2	29	35
		208.1	29	42
LMG	331.2	239.1	36	32
		316.2	36	22
MG-d5	334.2	318.2	54	38
LMG-d5	336.2	329.1	36	32

Cone：コーン電圧　　Coll：コリジョン電圧

４．試験溶液の調製

改良試験法による試験溶液の調製方法を図１に示した．試料5.00gに内標準液を正確に１mL添加し，クエン酸・リン酸緩衝液（pH3.0）10mLを加えてホモジナイズした後，アセトニトリル15mLを加えて５分間振とう後，毎分3,000回転で５分間遠心分離し，アセトニトリル－水層を採った．残留物にアセトニトリル15mLを加え，上記と同様に振とう及び遠心分離し，アセトニトリル－水層を合わせた．これに20％塩化ナトリウム溶液30mLを加えて５分間振とう後，毎分3,000回転で５分間遠心分離し，アセトニトリル層を採った．

この溶液を予めアセトニトリル10mLでコンディショニングしたInert Sep NH_2に負荷し，さらにアセトニリル５mLを注入して全溶出液を採り，無水硫酸ナトリウムを加えて脱水後，無水硫酸ナトリウムをろ過し，ろ液にぎ酸0.5mLを加えた．この溶液を予め１％ぎ酸含有アセトニトリル溶液５mLでコンディショニングしたBond Elut SCXに負荷し，さらに１％ぎ酸含有アセトニトリル溶液３mLにより洗浄後，アセトニトリル/アンモニア水（９：１）10mLを注入して溶出した．これを40℃以下で減圧濃縮し，窒素気流下で乾固した．残留物に0.05％ぎ酸含有メタノール溶液を正確に１mL加えて溶解し，フィルターろ過したものを試験溶液とした．

試料5.00g
├ 内標準液を正確に1mL添加
├ クエン酸・リン酸緩衝液(pH3.0)10mL
ホモジナイズ1分
├ アセトニトリル15mL
振とう5分
遠心分離 3000rpm，5分，5℃
アセトニトリル-水層　　残留物
　　├ アセトニトリル15mL
　　振とう5分
　　遠心分離 3000rpm，5分，5℃
　　アセトニトリル-水層　　残留物
├ 20%塩化ナトリウム溶液30mL
振とう5分
遠心分離 3000rpm，5分，5℃
アセトニトリル層　　水層
Inert Sep NH_2　コンディショニング：アセトニトリル10mL
負荷
溶出：アセトニトリル5mL
負荷液及び溶出液
脱水(無水硫酸ナトリウム)
ろ過
ろ液
├ ぎ酸0.5mL
Bond Elut SCX　コンディショニング：1%ぎ酸含有アセトニトリル5mL
負荷
洗浄：1%ぎ酸含有アセトニトリル溶液3mL
溶出：アセトニトリル-アンモニア水(9:1)10mL
減圧濃縮・窒素乾固
├ 0.05%ぎ酸含有メタノール溶液を正確に1mL
ろ過（0.2μmMilexフィルター）
試験溶液

図１　改良試験法による試験溶液の調製法

５．検量線及び定量方法

検量線はMG及びLMGの濃度が0.0025，0.005，0.0075，0.01，0.015及び0.02μg/mLとなるように調製した．各サロゲートの濃度は0.025μg/mLとし，定量はサロゲートを用いた内標準法により行った．

６．妥当性評価

検討した試験法を用いて，妥当性評価ガイドラインに従って添加回収試験を実施し，各性能パラメータ（選択性，真度，併行精度，室内精度及び定量限界）を求め，目標値等に適合しているか評価した．

６．１　添加濃度

不検出物質では検出限界を定量限界と同義とし，これ

を添加濃度とする[3)]とされているため，MG及びLMGの添加濃度を0.002μg/gとした．

6．2　選択性

試料において，定量を妨害するピーク（以下，妨害ピーク）がないことを確認した．妨害ピークを認めた場合は，不検出物質の許容範囲として定められた，「妨害ピークの面積が定量限界濃度に相当する標準溶液から得られるピークの1/3未満であること」を確認した．

6．3　真度及びサロゲートの回収率

添加試料5個以上を試験法に従って試験し，サロゲート補正後の定量値の平均値の添加濃度に対する比を求め，添加濃度0.002μg/g の目標値70～120%であることを確認した．サロゲートの回収率は，添加回収試験溶液の面積と検量線用標準溶液の面積の平均との比から算出し，40%以上であることを確認した．

6．4　併行精度及び室内精度

添加試料の試験を5回繰り返し実施し，得られた試験結果の標準偏差及び相対標準偏差を求め，添加濃度0.002μg/g の目標値である併行精度25%未満及び複数の実施者又は実施日による室内精度30%未満を確認した．

6．5　定量限界

試料の試験溶液で調製した定量限界相当濃度の混合標準溶液（以下，マトリックス混合標準溶液）から得られるピークのS/N比が，10以上であることを確認した．

結果及び考察

1．試験溶液の検討

告示試験法に基づき，MG標準原液をアセトニトリルで希釈し，測定したところ，MGから変換したLMGのピークが認められた（図2-a）．希釈溶媒を酸性にすることでMGからLMGへの変換が抑制されるとの報告[6)]があることから，MG及びLMG標準原液をぎ酸含有アセトニトリル溶液及びぎ酸含有メタノール溶液（各ぎ酸濃度：0.05%，0.1%，0.2%）で定量限界相当濃度（0.01μg/mL）に希釈後，LC-MS/MSで測定し，MG及びLMGの面積値を比較した（表3）．

MGは，アセトニトリル溶液中に比べ，酸性溶液中でLMGへの変換が抑制され，MGから変換したLMG（以下，変換LMG）の面積値は，ぎ酸含有アセトニトリル溶液中の方が，ぎ酸含有メタノール溶液中の面積値より小さかった．

一方，LMGは，アセトニトリル溶液中に比べ，酸性溶液中では面積値が低下し，LMGからMGへの変換が認められた．LMGの面積値は，ぎ酸含有アセトニトリル溶液中の方が，ぎ酸含有メタノール溶液中の面積値より著しく小さく，LMGから変換したMG（以下，変換MG）の面積値は，ぎ酸含有アセトニトリル溶液中の方が，ぎ酸含有メタノール溶液中の面積値より大きかった．

以上の結果より，ぎ酸含有アセトニトリル溶液と比較して，変換LMGの面積値はやや大きくなるが，LMGの面積値が大きく，変換MGの面積値が小さいぎ酸含有メタノール溶液を希釈溶媒とした．また，ぎ酸含有メタノール溶液のぎ酸濃度については，MG，LMG，変換MG及び変換LMGの面積値に大きな差が認められなかったことから，0.05%とした（図2-b）．

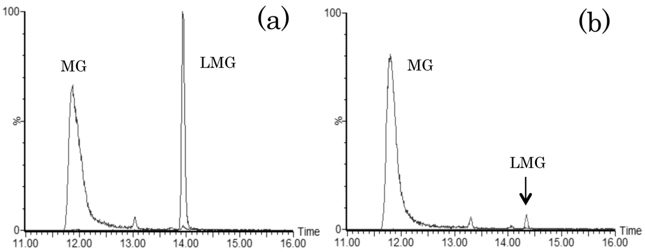


図2　希釈溶媒の違いによるMG標準溶液のトータルイオンクロマトグラム

(a) 告示法に従ってアセトニトリルで調製したMG標準溶液(0.01μg/mL)
(b) 0.05%ぎ酸含有メタノール溶液で調製したMG標準溶液(0.01μg/mL)

表3　希釈溶媒の違いによるMG及びLMGの面積値の比較

MG標準溶液(0.01μg/mL)

希釈溶媒		MG	変換LMG
アセトニトリル		153373	61693
ぎ酸含有アセトニトリル	0.05%	139136	1161
	0.1%	129630	597
	0.2%	150283	340
ぎ酸含有メタノール	0.05%	161375	3424
	0.1%	157306	3191
	0.2%	159951	2243

LMG標準溶液(0.01μg/mL)

希釈溶媒		LMG	変換MG
アセトニトリル		801805	0
ぎ酸含有アセトニトリル	0.05%	78660	4914
	0.1%	9556	20216
	0.2%	10749	6559
ぎ酸含有メタノール	0.05%	304672	1849
	0.1%	329462	1587
	0.2%	278861	1690

２．抽出方法及び精製方法の検討

告示試験法では，試料の精製のため，n-ヘキサンによる脱脂，塩析及びジクロロメタンによる転溶を行い，強酸性陽イオン交換体ミニカラム（Bond Elut SCX等）を用いるとされている．しかし，LMGは脱脂に用いるn-ヘキサン層に移行し，回収率低下の一因となることが確認されている[6]こと，転溶に用いるジクロロメタンは検査従事者の健康への影響が危惧されることから，n-ヘキサン及びジクロロメタンによる精製に代わる方法を検討した．代替として，20%塩化ナトリウム溶液による塩析後，Bond Elut SCXの精製前に，千葉らの報告[5]で示された，脂質除去に有効とされるC18固相抽出カラムのうち，Inert Sep C18を用いることとした．さらに，試験溶液の検討結果により，溶液中の酸濃度が，MG，LMG，MG-d5及びLMG-d5の変換に影響を与えることから，Bond Elut SCX負荷液にぎ酸0.5mLを添加し，さらにSCXカラムのコンディショニング及びSCXカラム負荷後の洗浄溶液をアセトニトリルから１％ぎ酸含有アセトニトリルに変更する試験法を検討した．

その結果，サロゲートの回収率は平均でMG-d5：43.6%，LMG-d5：53.3%となり，いずれも40%以上を満たしたが，40%を下回る試料も一部認められた（表４）．

この原因として，抽出液中に残存した夾雑物質がBond Elut SCXのイオン交換作用を妨害すると推察し，Inert Sep C18に代えて陰イオン交換固相抽出カラム（Inert Sep NH_2及びInert Sep PSA）により精製する試験法を検討した．

表４　SCXカラムへの保持の改良による添加回収率

分析対象化合物	試料 No.1 (%)	No.2 (%)	No.3 (%)	No.4 (%)	No.5 (%)	average (%)
MG	99.0	99.0	98.3	100.7	96.3	98.7
LMG	89.2	99.8	92.6	99.6	92.2	94.7
MG-d5	68.2	60.0	20.2	48.3	21.2	43.6
LMG-d5	64.9	53.2	59.4	38.5	50.5	53.3

*添加濃度は定量限界濃度：0.002μg/g（サロゲート：0.005μg/g）

試料を抽出後，塩析し，得られたアセトニトリル層に定量限界相当量（0.01μg）のMG及びLMGを添加し，各固相抽出カラム（Inert Sep NH_2，Inert Sep PSA及びInert Sep C18）で精製後，Bond Elut SCXを用いて精製した．得られた試験溶液をLC-MS/MSで測定し，MG及びLMGの回収率を求めた（表５）．その結果，Inert Sep NH_2では，MGが58.2%，LMGが97.3%であり，Inert Sep PSA及びInert Sep C18に比べて良好であったため，Inert Sep NH_2を用いることとした．

表５　MG及びLMGの回収率

分析対象化合物	Inert Sep NH_2 (%)	Inert Sep PSA (%)	Inert Sep C18 (%)
MG	58.2	33.4	4.6
LMG	97.3	95.9	73.0

*n=2で実施
*添加濃度は定量限界相当量：0.01μg

３．妥当性評価

固相抽出カラムをInert Sep NH_2に変更した改良試験法について，試料を用いて添加回収試験を行い，妥当性評価を実施した結果を表６に，MG及びLMGのMRMクロマトグラムを図３に示した．

検量線は，MG及びLMGともに0.0025～0.02μg/mLの範囲で相関係数0.99以上の良好な直線性が得られた．

MG及びLMGの選択性，真度，併行精度，室内精度及び定量限界は，いずれも目標値を満たした．サロゲートの回収率は，MG-d5：54.6%（40.1～67.4%），LMG-d5：70.0%（44.3～90.5%）であり，目標値である40%以上を満たし，うなぎ蒲焼きについて改良試験法の妥当性が確認された．

表６　改良試験法による妥当性評価結果

分析対象化合物	選択性	真度 (%)	サロゲート真度 (%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)	定量限界 （マトリックス混合標準溶液0.01μg/mLのS/N比）
MG	＜ 定量限界濃度 (0.01μg/mL) の面積値×1/3	97.5	54.6	3.6	4.0	527
LMG		96.7	70.0	4.0	2.9	999

**添加濃度は定量限界濃度：0.002μg/g　（サロゲート：0.005μg/g）

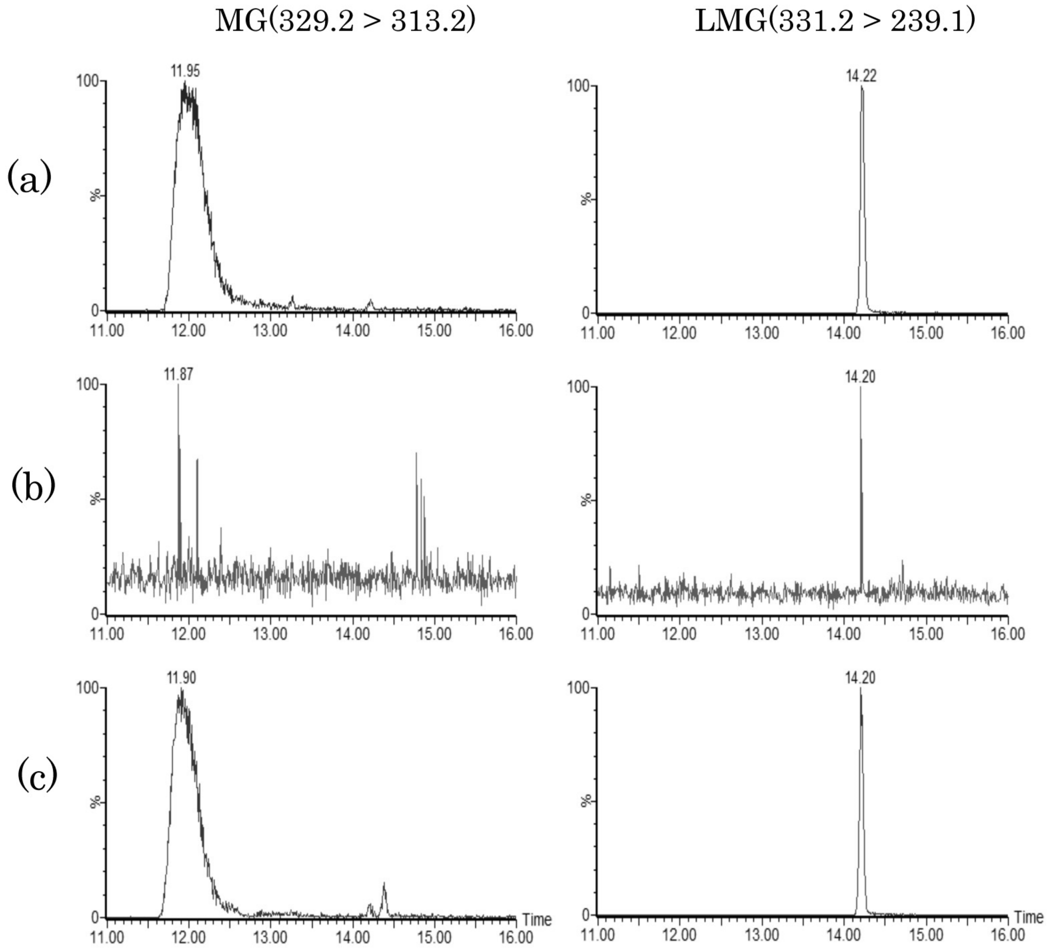


図３　MG及びLMGのMRMクロマトグラム
(a) 混合標準溶液(0.01μg/mL)
(b) うなぎ蒲焼き抽出液
(c) マトリックス混合標準溶液(0.01μg/mL)

まとめ

今回，うなぎ蒲焼きを対象として，告示試験法の試験溶液及び前処理方法を検討した．試験溶液を0.05%ぎ酸含有メタノールに変更したところ，MGからLMGへの変換が抑制された．併せて，n-ヘキサン及びジクロロメタンを用いた精製から，Inert Sep NH_2を用いた固相抽出カラムによる精製に変更し，Bond Elut SCX負荷液にぎ酸を添加することとした．この改良試験法により，LMG-d5の回収率は大幅に改善し，妥当性評価の性能パラメータの全項目で目標値を満たし，うなぎ蒲焼きについて妥当性が確認された．

今後は，改良試験法を用いて，過去に検出事例のあるうなぎ肝串蒲焼き及びサバ塩焼き等の加工食品を含む，他の食品についても妥当性評価を実施していきたい．

（平成27年８月１日受理）

文　献

１）厚生省：告示第370号（昭和34年12月28日）
２）厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知：食安発1213第１号(平成22年12月13日)
３）厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知：食安発第1224第１号(平成22年12月24日)
４）山下毅，西川清文，篠﨑史義，伴埜行則，川上雅弘：LC-MS/MSによるうなぎかば焼中のマラカイトグリーン分析法の妥当性評価，食衛誌，**56**(1)，31-36 (2015)
５）千葉美子，吉田直人，高橋祐介，氏家愛子：うなぎ中のマラカイトグリーン分析における脂質精製と溶解溶媒の違いによる標準溶液の安定性の検討，宮城県保健環境センター年報，**29**，20-53 (2011)
６）大熊紀子，氏家愛子，千葉美子，吉田直人，濱名徹：うなぎ中のマラカイトグリーン分析法の検討，宮城県保健環境センター年報，**28**，101-102 (2010)

短報

神奈川県における牛乳の放射能調査

殿原真生子*，飯島育代，林　孝子，酒井康宏*，
桑原千雅子，上村　仁

Surveillance of Radioactive nuclides in Milk in Kanagawa Prefecture

Makiko TONOHARA, Ikuyo IIJIMA,
Takako HAYASHI, Yasuhiro SAKAI,
Chikako KUWAHARA and Hitoshi UEMURA

はじめに

2011年３月に発生した東京電力株式会社福島第一原子力発電所（以下，福島第一原発）事故により，大量の人工放射性物質が環境中に放出され，食品においても放射性物質の汚染が危惧される事態となった．

国内食品に含まれる放射性物質については，福島第一原発事故以前は法的な規制値が定められておらず，原子力安全委員会により示された指標値のみであった．同年３月17日，厚生労働省は，この指標値を食品の放射性物質の暫定規制値として設定した[1)]．その後，食品安全委員会において放射性物質による健康影響の評価が検討され，小児の期間については成人より感受性が高い可能性があるとの指摘があった．このことを受け，厚生労働省は，小児の健康影響への具体的な配慮として，小児の摂取量が多い牛乳および乳幼児食品について独立した区分を設けるなど見直しを実施し，2012年４月１日から放射性セシウムについて新たな基準値を設定した[2, 3)]．

神奈川県衛生研究所では，国の委託事業である環境放射能水準調査の一環として，福島第一原発事故前から牛乳について放射能調査を実施している．本事故後は，県の行政検査として，原乳では生産段階での濃度把握と暫定規制値および基準値を超えた場合の出荷停止等の迅速な対応を可能とするため，試料採取当日に検査，翌朝に結果公表という体制を組み，現在も臨んでいる．また，県内に流通している市販乳についても行政検査で対応している．さらに県民の不安解消のために，検査後，より高感度な測定を実施し，情報提供できるように努めている．

本報では，牛乳についてガンマ（γ）線スペクトロメトリーによる核種分析を行い，その結果を基に放射能濃度レベルを明らかにするとともに，過去の核実験やチェルノブイリ事故による神奈川県への影響についても比較検討したので報告する．

神奈川県衛生研究所　理化学部
〒253-0087　茅ヶ崎市下町屋1-3-1
*現　地域調査部

方　法

１．試料

牛乳試料として県内産原乳906検体および県内流通の市販乳121検体を対象とした．これらの試料は，環境放射能水準調査ならびに調査研究，福島第一原発事故以降は，行政検査として採取されたものである．

２．試料の処理

試料の調製及び測定は，科学技術庁，文部科学省，厚生労働省のマニュアル[4−7)]および厚生労働省通知[8)]に準じた．マリネリ法は，牛乳2Lをマリネリビーカーに封入し測定に供した．灰化法は，マリネリ法で測定後の牛乳を凍結乾燥後450℃で24時間灰化し，U-8容器に封入し測定した．

３．測定核種

ヨウ素-131（以下，^{131}I），セシウム-134（以下，^{134}Cs），セシウム-137（以下，^{137}Cs）およびカリウム-40（以下，^{40}K）を対象とした．

４．測定装置

ゲルマニウム（以下，Ge）半導体検出器γ線スペクトロメータ[9)]

・PGT社製　Ge半導体検出器IGC40200
・OXFORD社製　Ge半導体検出器CNVDS30-35195
・CANBERRA社製　Ge半導体検出器GC3520

４．測定時間および検出限界値

行政検査の試料の測定時間は，マリネリ法で7,500秒，環境放射能水準調査および調査研究では，マリネリ法で80,000～100,000秒，灰化法80,000～100,000秒とした．

なお，それぞれの検出限界値は表１のとおりである．

表１　γ線スペクトロメトリーにおける検出限界値

	検出限界値(Bq/kg)		
	マリネリ法		灰化法
測定時間 (s)	7,500	80,000～100,000	80,000～100,000
^{131}I	0.31-0.63	0.047-0.056	－
^{134}Cs	0.16-0.24	0.044-0.055	0.015-0.025
^{137}Cs	0.16-0.30	0.049-0.055	0.016-0.029

結果および考察

1．マリネリ法による牛乳の放射能濃度

短時間測定のマリネリ法による牛乳の放射能濃度の推移を図１に示す．福島第一原発事故発生後，県内の環境試料から事故由来の人工放射性核種が検出されたことを受けて，県内産原乳について，2011年３月21日からマリネリ法による緊急時調査を開始した．

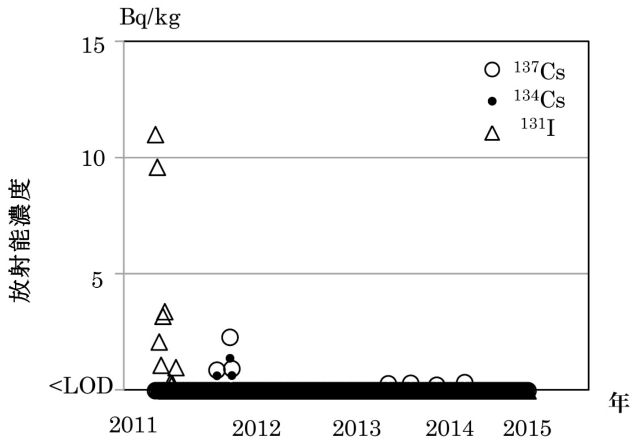


図１ 短時間マリネリ法による牛乳中の放射能濃度の推移
LOD（検出限界値）：約0.3Bq/kg

^{131}Iは，2011年では事故後，県内産原乳64試料中10試料より検出されたが，暫定規制値（放射性ヨウ素として300Bq/kg）を十分下回っていた．最高値は調査開始日の３月21日の11Bq/kgで，その後，短期間に急激に減少し，４月21日以降検出限界値未満となった．半減期が8日と短く，また，環境への新たな大量放出が無かったため，短期間で減少したものと考える．一方^{134}Cs，^{137}Csは，事故当初からいずれも検出限界値未満であったが，2011年９月８日に採取された試料から，暫定規制値（放射性セシウムとして200Bq/kg）を十分に下回るものの，それぞれ1.4，2.3Bq/kg検出された．同採取場所において，その後，採取された試料は全て検出限界値未満となったので，原因の特定には到らなかったが，餌からの移行が考えられた[10]

2．灰化法による牛乳の放射能濃度

図2に灰化法での牛乳の放射能濃度の推移を示す．灰化により試料を濃縮し，測定時間を長くして，検出限界値をマリネリ法の約１/10まで下げた（表１）ことで，多くの試料から^{134}Cs，^{137}Csが検出された．前述した^{134}Cs，^{137}Csが最大値となった2011年９月８日頃までは^{134}Cs，^{137}Csの濃度が比較的高い試料が確認されたが，その後，急激に低下した．同年10月以降は^{134}Cs，^{137}Csともに濃度は漸減し，^{134}Csは2013年３月12日を最後にすべて検出限界値未満となった．

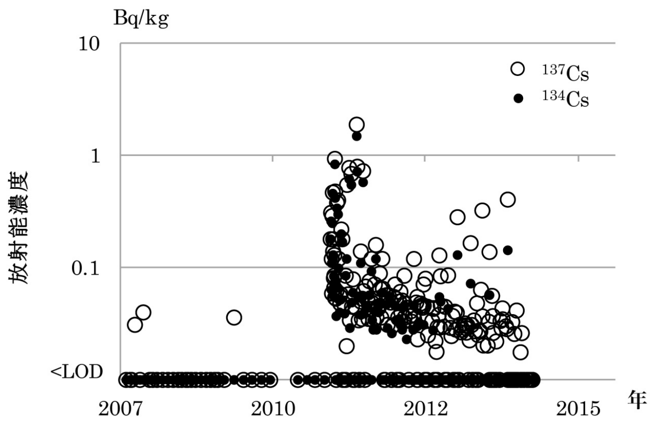


図２ 灰化法による牛乳中の放射能濃度の推移
LOD（検出限界値）：約0.03Bq/kg

3．マリネリ法と灰化法の測定結果の比較

福島第一原発事故では，図３に示すように，牛乳中の^{137}Cs濃度について短時間測定のマリネリ法（7,500秒）と灰化法による測定値には非常に高い正の相関（R^2＝0.9863，R=0.9931）が認められた．また，短時間測定のマリネリ法による測定値が灰化法に比べて若干高くなることは，結果として高めに被ばく線量評価することになり，より安全側に見積もっていると言うことができる．また，厚生労働省は検出限界値を基準値の１/５以下としており，基準値の検出限界値で要求されるレベル（10Bq/kg）に対し，マリネリ法では，その１/50程度まで測定できた．無処理かつ短時間（7,500秒）で測定可能なマリネリ法は，緊急時において非常に有用な測定法であることを再確認した．

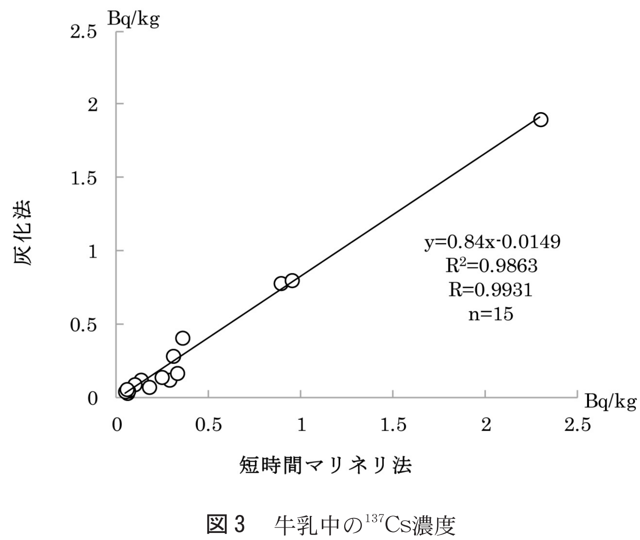


図３ 牛乳中の^{137}Cs濃度

図３における短時間マリネリ法の^{137}Cs濃度が約１Bq/kgを上回る３試料の濃度では近似直線上にあるのに対し，それより低い大部分の試料については相関係数が0.8232と，やや下回った．^{137}Cs濃度レベルが低くなるほど両方法での濃度にずれが生ずることがわかった．放射能分析では，濃度レベルが低いほど放射能計数率に対する計数誤差が大きくなり，真値の存在する範囲の幅が広がり，得られる濃度はある範囲に分散する．この結果はそれを裏付けていた．

セシウムと同族のカリウム（アルカリ元素）の同位体で，天然の放射性核種である^{40}Kは，^{137}Csと同じくベータ線，ガンマ線を放出する．また広く自然界に存在し，食品にも多く含まれていることが知られており，牛乳中にも50Bq/kg程度が存在している[11]．当所では^{40}Kについても牛乳中の濃度レベルを調べた．

^{40}Kのマリネリ法と灰化法で求めた濃度の関係を図４に示す．^{40}Kはすべての牛乳試料で定量できたため，ばらつきはあるが，ほぼ50Bq/kgに収束していた．両者間の濃度がずれている試料においても，そのずれは計数誤差の範囲内に含まれ，ほぼ一致すると評価できた．

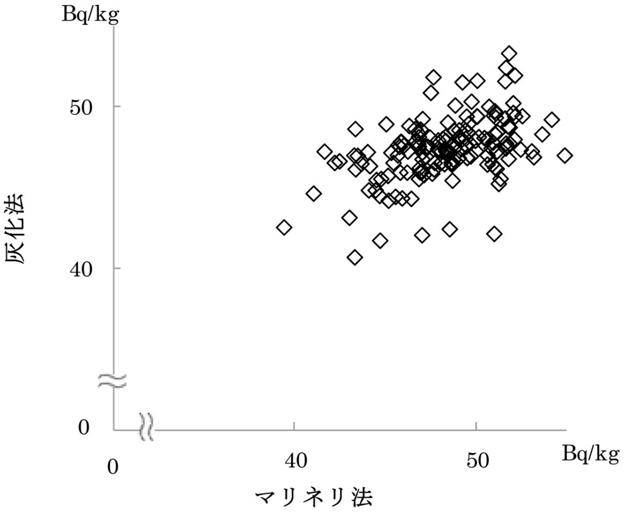


図４　牛乳中の^{40}K濃度

４．1978年からの牛乳の放射能濃度の推移

1978年から2015年３月までの牛乳中の放射能濃度を図５に示す．なお，1978年当初は灰化法でのみ測定を実施し，マリネリ法を開始した2007年以降はマリネリ法で測定後の牛乳を灰化法で測定している．また検出限界値は，表１に示すとおり測定法及び核種により異なるが，それぞれの核種の長期間にわたる変動をわかりやすくするため，検査結果を一つの図に示した（図５）．当所で牛乳の測定を開始した1978年１月には，^{137}Csが0.17Bq/kg検出された．高城らが示すように[12]，1960年代前半まで米国並びに旧ソ連邦等により大気中核実験が頻繁に行われていた．また日本に距離的に近い隣国の中華人民共和国は，1965年以降に大気中核実験を頻繁に行っていたため，当時は環境放射能のレベルが高かった．その後，大気圏内核実験が1980年に禁止され，牛乳中の^{137}Cs濃度は徐々に減少傾向を示し，検出限界値未満～約0.03Bq/kgで推移した．1986年４月のチェルノブイリ原発事故により，^{131}Iは急激に上昇し，その後，短期間で減少し，同年６月に検出されたのを最後に検出限界値未満となった．^{134}Cs，^{137}Csについては，事故直後は^{134}Csは検出されなかったが，同年５月17日にそれぞれ最高値の1.1，2.3Bq/kg検出された．その後，徐々に減少し，^{134}Csは1987年12月を最後に検出限界値未満となった．半減期が約30年と長い^{137}Csは，その後，減少傾向にあるものの長期間にわたり，微量（0.013～0.074Bq/kg）ながら検出されてきた．これは，成層圏まで到達している核実験のフォールアウトが対流圏に継続的に降下していることに起因する．2011年の福島第一原発事故では，図５に示すように，放射能濃度はチェルノブイリ原発事故と同様の推移を示した．現在，^{137}Csは行政検査では検出限界値未満が続いているが，灰化すると，今なお微量ながら^{137}Csが検出されている．その放射能濃度は，福島第一原発事故前の濃度と同じレベル（0.02Bq/kg程度）にまで減少している．長期間にわたる測定結果から，現在の放射能濃度はチェルノブイリ原発事故前の濃度より低く福島第一原発事故以前と同じ濃度レベルに戻り，推移していることがわかった．

まとめ

当所では福島第一原発事故以前から長期にわたり牛乳の詳細な放射能調査を実施している．事故発生直後からは検査件数を大幅に増加し，迅速に牛乳の検査を実施してきた．

福島原発事故から４年が経過し，現在に至るまで放射性セシウム濃度は基準値を大きく下回っている．半減期が約２年の^{134}Csは，2013年３月12日に検出された後は検出限界未満となっている．

灰化法による測定時間を長くした詳細な調査で，より低いレベルの放射性セシウム濃度を確認し，過去の放射能濃度と比較したところ，その濃度レベルは福島第一原発事故前まで減少しており，安全性が十分に確保されていることが明確になった．

また，行政検査に用いているマリネリ法による短時間での測定による放射性セシウムの濃度は，詳細な灰化法による濃度と良く一致，もしくは若干高い傾向にあり，短時間でのマリネリ法が緊急時に有効な方法であること

が再確認できた．^{40}Kでは計数誤差範囲内で一致していた．

今後も長期的な観点から放射能調査を継続し，食品の安全と安心につながる情報を提供していく必要がある．

（平成27年8月1日受理）

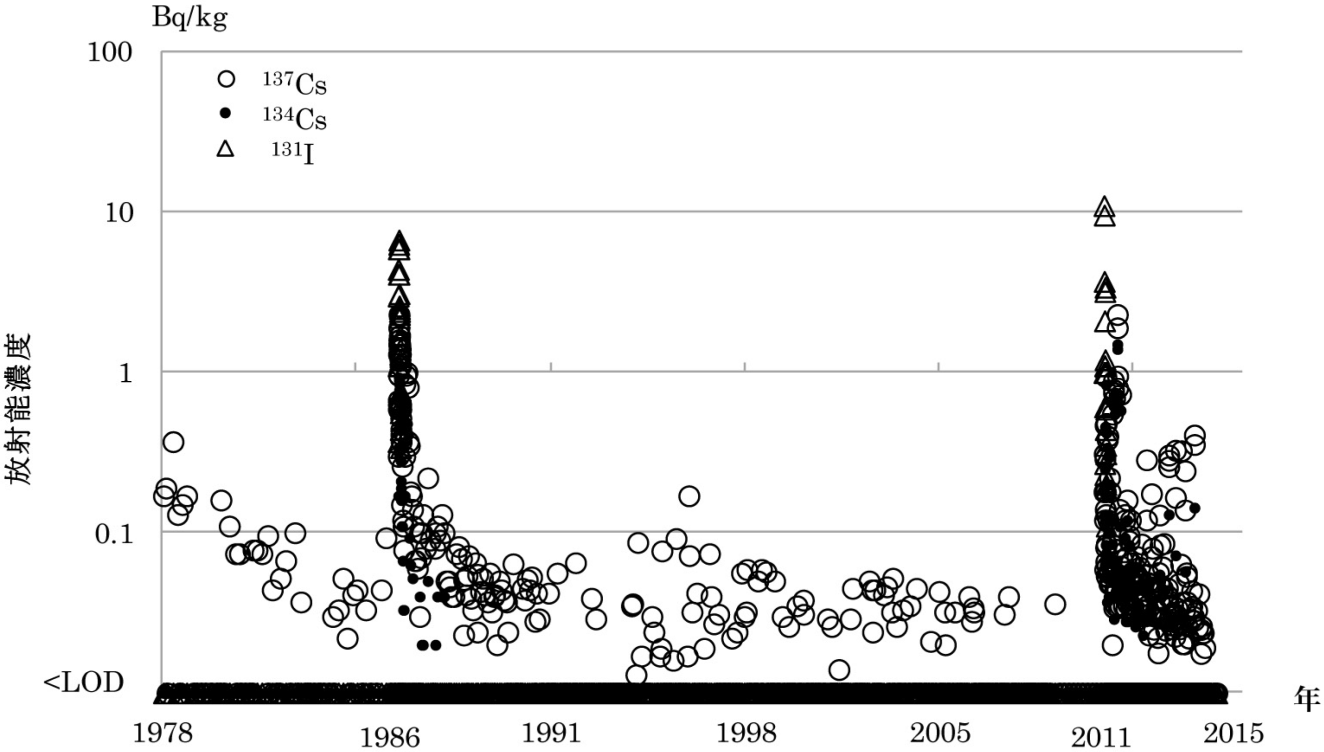


図5　牛乳中の放射能濃度の推移

LOD（検出限界値）：表1参照

文　献

1）厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知：放射能汚染された食品の取り扱いについて，食安発0317第3号（平成23年3月17日）

2）厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知：乳及び乳製品の成分規格等に関する省令の一部を改正する省令，乳及び乳製品の成分規格等に関する省令別表の二の（一）の（1）の規定に基づき厚生労働大臣が定める放射性物質を定める件及び食品，添加物等の企画基準の一部を改正する件について，食安発第0315第1号（平成24年3月15日）

3）林孝子，酒井康宏，飯島育代，桑原千雅子：神奈川県における食品の放射能調査（平成23年3月～平成25年度）.神奈川衛研報告，**44**，20-24（2014）

4）科学技術庁：セシウム137分析法（1963）

5）科学技術庁：放射性ヨウ素分析法（1977）

6）文部科学省：文科省放射能測定法シリーズ24（1992）

7）厚生労働省医薬局食品保健部監視安全課：緊急時における食品の放射能測定マニュアル（2002）

8）厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知：食品中の放射性物質の試験法について，食安発0315第4号（平成24年3月15日）

9）神奈川県衛生研究所：神奈川県における放射能調査報告書－2014－（2015）

10）農林水産省消費・安全局長，生産局長，林野庁長官，水産庁長官通知：放射性セシウムを含む肥料・土壌改良資材・培土及び飼料の暫定許容値の設定について，23消安第2444号，23生産第3442号，23林政産第99号，23水推進第418号（平成24年3月23日）

11）食品安全委員会：食品中の放射性物質の健康影響について，平成24年1月
〈http://www.fsc.go.jp/sonota/emerg/radio_hyoka_kaisetu.pdf〉

12）高城裕之，飯島育代，小山包博：生活環境中の放射線および放射性物質の水準2．神奈川県における環境放射線（能），神奈川衛研報告，**22**，22-28（1992）

資料

神奈川県域での結核接触者健康診断におけるQFT検査の実施状況

大屋日登美，稲田貴嗣，古川一郎，浅井良夫，相川勝弘，黒木俊郎

Implementation of QFT testing among tuberculosis contacts in Kanagawa Prefecture

Hitomi OHYA, Takatsugu INADA, Ichiro FURUKAWA, Yoshio ASAI, Katsuhiro AIKAWA and Toshiro KUROKI

神奈川県における2012年の新登録結核患者は1,395人，罹患率は15.4（10万対）で，減少傾向にあるものの，いまだ都道府県別では高い状況が続いている．結核感染診断法としてInterferon-gamma release assay (IGRA) が開発され，現在国内ではクォンティフェロン®TB-ゴールド：QFT-3G（以下QFTとする）とT-スポット®.TB (T-SPOT) が使用されている[1]．これらは，従来のツベルクリン反応検査よりも信頼性が高く，結核予防対策上の有用性が期待されており，「結核に関する特定感染症予防指針2011年５月改正」においても，IGRAを積極的に活用することが重要であるとされている．当所では，各保健福祉事務所の結核接触者健康診断（健診）に対応するため，2005年からQFT検査を実施しており[2-4]，今回は2012年からの３年間における神奈川県域（横浜市・川崎市・相模原市・横須賀市及び藤沢市を除く）でのQFT検査の実施状況について報告する．

2012年から2014年に結核接触者健診として各保健福祉事務所で採血された血液3,853検体について当所でQFT検査を実施した．

神奈川県域では，2012年に233事例1,156検体，2013年に222事例1,151検体，2014年に254事例1,546検体の検査依頼があり，検査数が年々増加している．３年間の検査結果は，陽性が386検体（10.0%），判定保留が337検体（8.7%），陰性が3,103検体（80.5%），判定不可が27検体（0.7%）であった（表１）．３年間の動向については，陽性，判定保留，陰性，判定不可ともに同程度の割合で推移していた．

次にQFT陽性者の年齢・性別について年次推移を示した（表２）．QFT陽性者は，全体の約１割を占めている．性別では年次別で2013年と2014年の男女比に差は見られなかったが，2012年は男性の比率が高かった（χ^2検定，P＜0.01）．平均年齢については，2012年

表１　結核接触者健診におけるQFT検査結果（2012～2014年）

年	事例数	検体数	陽性		判定保留		陰性		判定不可	
			検体数	(%)	検体数	(%)	検体数	(%)	検体数	(%)
2012	233	1,156	126	(10.9)	95	(8.2)	930	(80.4)	5	(0.4)
2013	222	1,151	99	(8.6)	100	(8.7)	944	(82.0)	8	(0.7)
2014	254	1,546	161	(10.4)	142	(9.2)	1,229	(79.5)	14	(0.9)
合計	709	3,853	386	(10.0)	337	(8.7)	3,103	(80.5)	27	(0.7)

表２　QFT陽性者の年齢・性別（2012～2014年）

年	陽性数	性別				年齢		
		男性	(%)	女性	(%)	平均年齢	最小値	最大値
2012	126	82	(65.1)	44	(34.9)	50.0	7	88
2013	99	50	(50.5)	49	(49.5)	49.6	21	92
2014	161	74	(46.0)	87	(54.0)	65.3	16	100
合計	386	206	(53.4)	180	(46.6)	55.0	7	100

神奈川県衛生研究所　微生物部
〒253-0087　茅ヶ崎市下町屋1-3-1

（50.0歳）と2013年（49.6歳）は同程度であったにも関わらず2014年は，65.3歳と高くなっていた．このことは，例年に比べ2014年に高齢者福祉施設における接触者健診が多かったことに起因する．2014年の検査検体数1,546検体中643検体（41.6%）が高齢者福祉施設（19施設）の接触者健診であった．このうち，No.17の事例の感染源患者が高齢者福祉施設の職員であったため施設利用者の接触者がその他に分類されている．高齢福祉施設に関連する事例においては，その他に区分される接触者が最も多く，次いで，医療従事者，家族，職場同僚，友人等であった（表３）．また，2014年の高齢者福祉施設における検体数とQFT検査結果を示した（表４）．2014年の結核接触者健診での陽性率は10.0%であったが，高齢者福祉施設での陽性率は11.8%と若干高く，中でもその他（施設利用者等）における陽性率が高く19.0%であった．

表３　高齢者福祉施設（19施設）における事例別検体数（2014年）

No.	検体数	対象区分				
		その他（施設利用者等）*	医療従事者	友人等	家族	職場同僚
1	28	0	7	17	4	0
2	35	0	35	0	0	0
3	7	0	5	0	2	0
4	21	0	16	0	5	0
5	10	0	4	0	6	0
6	25	12	13	0	0	0
7	100	85	13	0	2	0
8	24	0	21	0	3	0
9	41	22	15	0	4	0
10	29	16	13	0	0	0
11	14	0	13	0	1	0
12	60	25	32	0	3	0
13	12	6	5	0	1	0
14	26	14	11	0	1	0
15	24	16	5	0	3	0
16	36	8	28	0	0	0
17	102	81	0	0	1	20
18	19	0	12	0	7	0
19	30	10	20	0	0	0
計	643	295	268	17	43	20

＊施設利用者，入所者，これらとの接触者を含む

表４　高齢者福祉施設における対象区分別の検体数およびQFT検査結果（2014年）

対象区分	検体数	陽性	（%）	判定保留	（%）	陰性	（%）	判定不可	（%）
その他（施設利用者等）*	295	56	（19.0）	42	（14.2）	191	（64.7）	6	（2.0）
医療従事者	268	14	（5.2）	19	（7.1）	233	（86.9）	2	（0.7）
友人等	17	1	（5.9）	7	（41.2）	9	（52.9）	0	（0）
家族	43	3	（7.0）	6	（14.0）	34	（79.1）	0	（0）
職場同僚	20	2	（10.0）	0	（0）	18	（90.0）	0	（0）
計	643	76	（11.8）	74	（11.5）	485	（75.4）	8	（1.2）

＊施設利用者，入所者，これらとの接触者を含む

2012年から2014年の３年間における被験者と結核患者の接触場所別の事例数を図１に，１事例あたりの検体数を図２に示した．2014年の接触場所別事例数はのべ313事例でその内訳は，前年同様に家庭が最も多く168事例，以下その他67事例の内訳はディサービス利用者，通所利用者，不明等であり，職場43事例，医療機関34事例，学校１事例の順であった．2014年の１事例あたりの検体数は，学校が42.0検体と最も多く，次いで医療機関9.1検体，職場6.6検体，その他6.7検体，家庭は2.7検体の順であった．学校の１事例あたりの検体数は前年（17.0検体）の２倍以上であった．

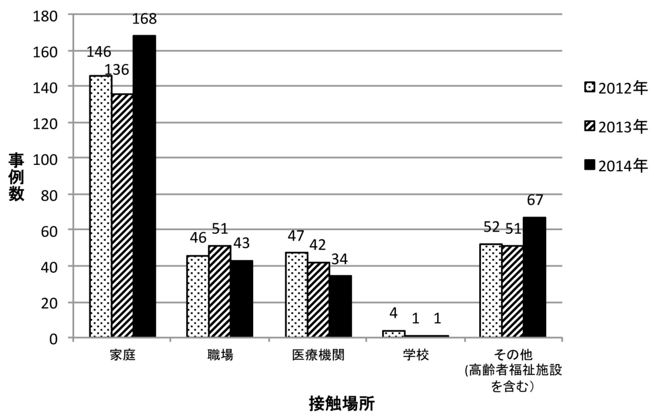


図１　被験者と接触場所別の事例数（2012～2014年）

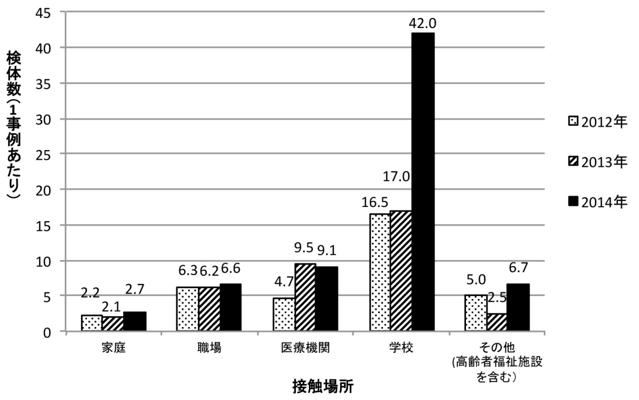


図２　１事例あたりの検体数（2012～2014年）

QFT陽性者における接触場所別の割合を図３に示した．2014年の陽性者は161例で，このうち76例（47.2%）が高齢福祉施設での接触であり，接触場所は，その他（高齢者福祉施設を含む）が44.7％で最も高く，次いで家庭27.3％，職場19.9%，医療機関8.1％，学校０％であった．３年間を通して家庭内接触が最も高く，家庭内では患者との接触が濃厚であるためと考えられた．

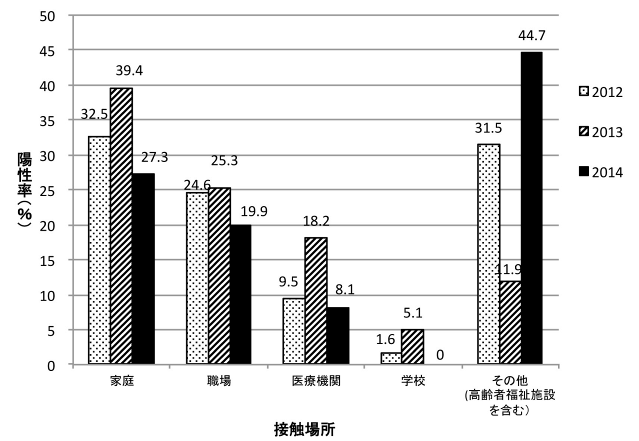


図３　QFT陽性者における接触場所の割合（2012～2014年）

高齢者福祉施設での接触では年ごとにばらつきは大きいが，2014年は高齢者福祉施設での接触者健診が多かったため比率が高くなったものと思われた．また，学校では１事例あたりの検査数は多いが陽性数は少なく，他の接触場所に比べ陽性率は低い．

結核予防対策の一つとして，接触者健診にQFT検査を導入し，接触者の結核感染の有無を診断する資料とすることで結核の蔓延防止に役立てている．今後，さらに多くのデータを蓄積し，結核対策へ貢献できるよう取り組み続けていくことが重要であると考える．

最後に，感染源情報や接触者情報の収集，さらに検体輸送等にご尽力いただきました神奈川県保健福祉部 健康危機管理課，各保健福祉事務所保健予防課ならびに神奈川県感染症情報センターの皆様に深謝いたします．

（平成27年８月１日受理）

文　献

１）日本結核病学会予防委員会: インターフェロンγ遊離試験使用指針，結核，**89**，717-725 (2014)
２）大屋日登美，岡崎則男，高橋智恵子，渡辺祐子，尾上洋一，新川隆康ほか:結核接触者健診における新しい感染診断法クォンティフェロン®TB-2G の利用について，神奈川衛生研報告 ，**37**，6-8 (2007)
３）大屋日登美，岡崎則男，樋口一恵，原田登之:特集 抗酸菌をとりまく状況の変化と対応,5．結核感染の新しい診断法， Medical Technology， **36**(2)， 148-152 (2008)
４）高橋智恵子，近内美乃里，大屋日登美，伊達佳美，渡辺祐子，岡崎則男:神奈川県域の結核接触者健康診断におけるQFT検査を用いた結核感染診断（平成17～21年度），神奈川衛研報告，**40**，33-35 (2010)

神奈川県衛生研究所研究報告　No. 45 (2015)
Bull. Kanagawa Ins. of P.H.

資料

神奈川県における腸管出血性大腸菌の検出状況（平成26年度）

古川一郎，石原ともえ，渡辺祐子

Occurrence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in Kanagawa Prefecture (April, 2014-March, 2015)

Ichiro FURUKAWA, Tomoe ISHIHARA and Yuko WATANABE

腸管出血性大腸菌（enterohemorrhagic *Escherichia coli*：以下，EHECと略す）感染症は，「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」（平成10年10月２日法律第114号）で三類感染症に分類され，EHEC感染症の患者と診断した医師は，保健所を経由して都道府県知事に届け出なければならない[1)]．さらに，分離された菌株はそれぞれの地方衛生研究所（以下，地研と略す）に提供されることになっている．地研は集められた菌株について生化学的性状，血清型，毒素型等を確認したのち，「病原性大腸菌O-157の検体提供依頼について」（平成８年６月19日付，衛食第160号）および「飲食店における腸管出血性大腸菌食中毒対策について」（平成19年５月14日付，食安監発第0514001）に基づき，国立感染症研究所（以下，感染研と略す）細菌第一部に菌株を送付している．感染研は，全国から送付された菌株について分子疫学的調査を実施し，全国レベルの大規模な集団発生や散発的集団発生を探知することにより感染の拡大防止に努めている．2014年度から，感染研では分子疫学的調査の手法としてパルスフィールド・ゲル電気泳動（以下，PFGEと略す）に代わり，O157等のEHECの主要な血清型についてMultilocus variable-number tandem-repeat analysis（以下，MLVAと略す）を用いた解析が実施され，各自治体へ結果報告されている．

本報では，平成26年４月から平成27年３月の間に横浜市，川崎市，横須賀市および相模原市を除く神奈川県内（以下，県域と略す）で分離され，当所に送付されたEHEC菌株についてPFGE解析および薬剤感受性試験を行うとともに，迅速性からO157のスクリーニング法として用いられるIS-printing system（以下，IS法と略す）をヒト由来のO157について実施したので，これらの結果を報告する．

平成26年度のEHEC菌株の受領状況とその内訳は，県域の医療機関や保健福祉事務所から当所に送付されたヒト由来61株，当所地域調査部において患者家族，集団事例関連の保菌者および食材から分離された13株，食肉衛生検査所から送付されたウシ由来３株を含めた合計77株であった．血清型およびVero毒素(VT)型の違いによる内訳は，O157(VT1&2) 36株，O157(VT2) 24株，O157(VT1) １株，O26(VT1) ７株，O26(VT2) １株，O103(VT1) ３株，O121(VT2) ３株，O111(VT1&2) １株，O146(VT1) １株であった（表１）．菌株が分離

表１　搬入あるいは管轄施設別の菌株受領状況

施　設	O157			O26		O103	O121	O111	O146	菌株数
	VT1&2	VT1	VT2	VT1	VT2	VT1	VT2	VT1&2	VT1	
厚木保健福祉事務所	5		10				2		1	18
同上　大和センター	4		1	2						7
平塚保健福祉事務所	11		2							13
同上　秦野センター						1				1
茅ヶ崎保健福祉事務所	3		4	1			1			9
小田原保健福祉事務所				4	1					5
鎌倉保健福祉事務所	1		2					1		4
食肉衛生検査所		1	2							3
藤沢市保健所	12		3			2				17
計	36	1	24	7	1	3	3	1	1	77

神奈川県衛生研究所　微生物部
〒253-0087　茅ヶ崎市下町屋1-3-1

された患者および保菌者のうち，記録があるものについて，性別および年齢構成を比較した（表２）．年齢の範囲および人数は，男性が０～76歳で30人，女性が０～75歳で42人，年齢の平均は男性26.2歳に対し，女性は36.2歳であった．

PFGEは，制限酵素として*Xba*Ⅰを使用し，6V/cm，パルスタイム2.2 - 54.2秒，12℃の条件で19時間行った．泳動の結果はBioNumerics（Applied Maths社）を用いてクラスター解析を行い，デンドログラムを作成した．

O157については，IS-printing system（TOYOBO）を用いて解析し，付属の説明書に従ってPCR法を実施した後，32箇所の遺伝子の有無により菌株の識別を試みた．

2014年度はO157(VT1&2)の広域的な感染が疑われる事例が確認され，これらの分離株を含め61株のO157が搬入された．特に分離株数の多いO157(VT1&2)およびO157(VT2)について，PFGEパターンを基にデンドログ

表２　患者・保菌者の年齢構成および性別

年齢層	男性	女性	計
0 - 5	5	2	7
6-10	6	5	11
11-20	6	8	14
21-30	2	5	7
31-40	3	5	8
41-50	3	3	6
51-60	0	2	2
61-70	3	8	11
>70	2	4	6
計	30	42	72

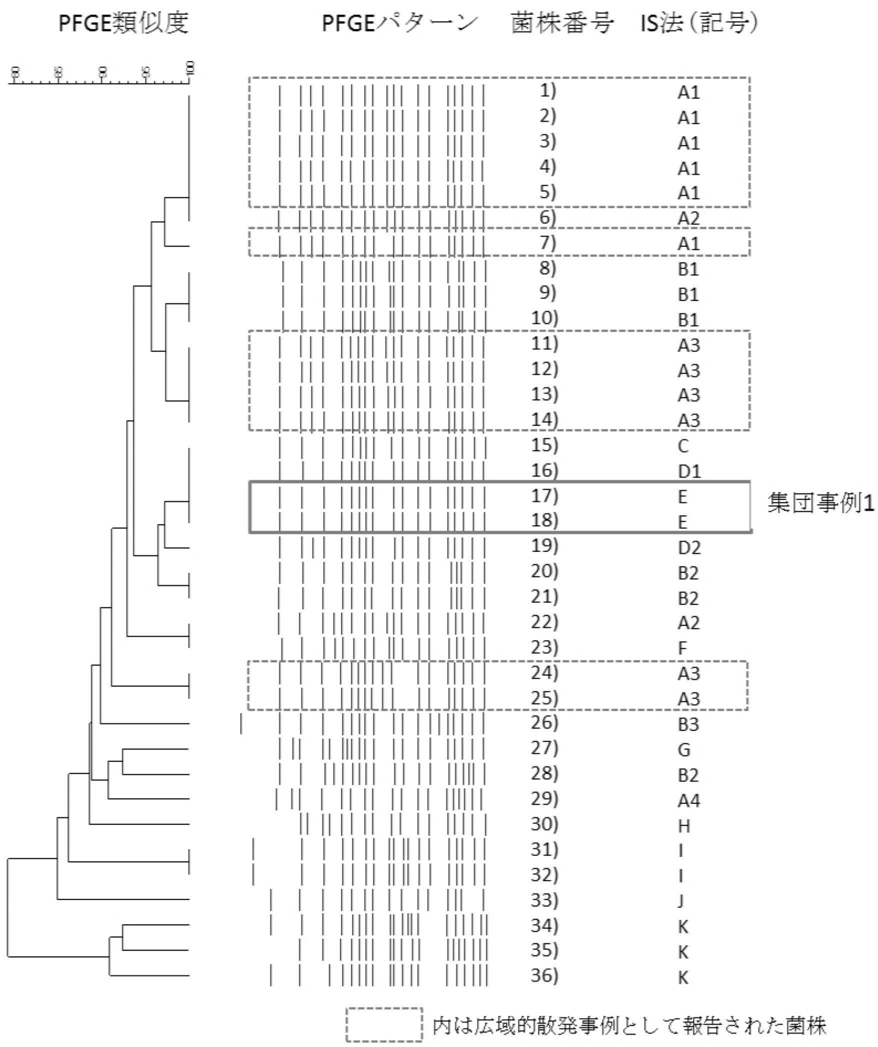


図１　EHEC O157（VT1&2）の遺伝子解析結果

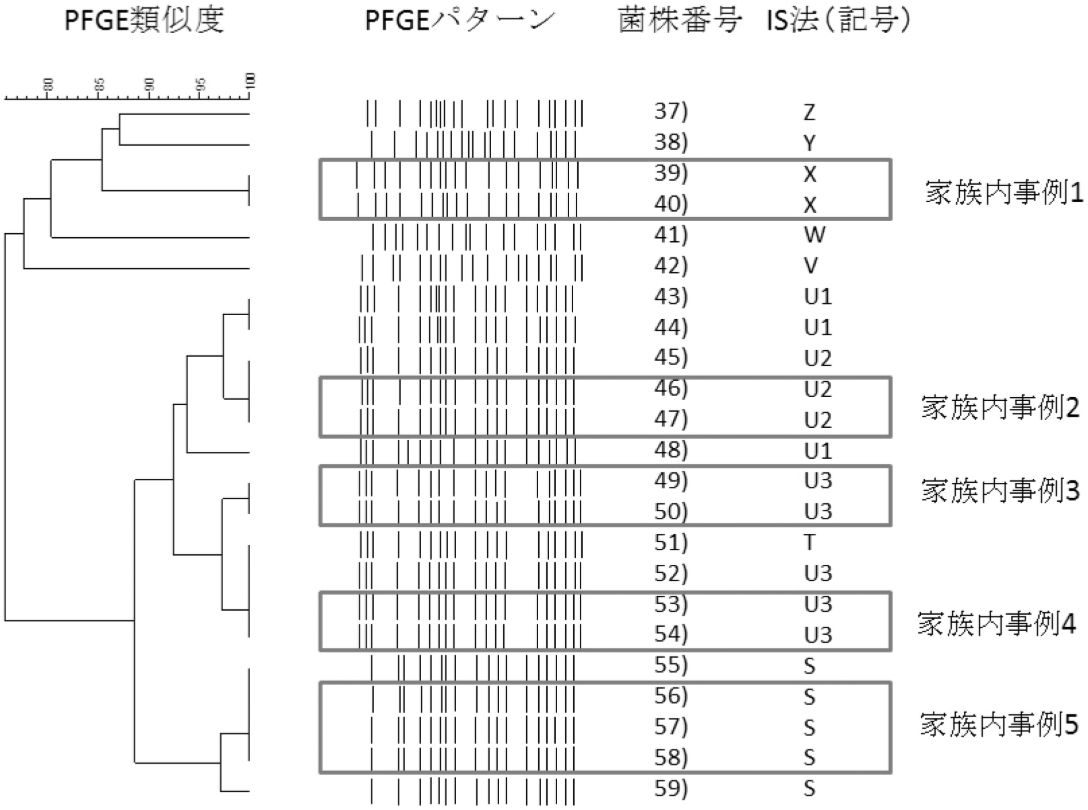


図２　EHEC O157（VT2）の遺伝子解析結果

ラムを作成し，IS法の結果を記号で表記した（図１，図２）．O157(VT1&2)の広域的散発事例株については，感染源および感染経路の調査を目的とした情報共有を図るため，感染研から各自治体の関係機関に対し，当該菌株のIS法のデータが周知され，各自治体はこれらのデータも参考に分離株の比較検討を行った．当所で行ったIS法でA1およびA1とは１箇所のみパターンが異なるA3となった２つのパターンの広域的散発事例株は，県域および藤沢市分離株で12株確認されたが，いずれの菌株も疫学的な関連は認められなかった．この他に，IS法でA3とは別にA1と１箇所のみパターンが異なるA2を示した菌株No.６およびNo.22は，広域的散発事例株である菌株No.１～No.５とPFGEパターンが一致および90%以上の類似性を示し，さらに，菌株No.８～10はこれらの菌株とPFGEパターンが95%の高い類似性を示すなど，いずれも疫学的関連は認められなかったが県域および藤沢市における広域的散発事例株と思われた．菌株No.17およびNo.18は，他の自治体における食中毒事例関連株であり，食中毒事例株とIS法のパターンは一致していた．IS法は，遺伝子の有無により記号化されたデータが得られ，実験室間でのデータ比較が容易なことから，今回の広域的散発事例ではIS法のデータが有効に活用された．

５つの家族内事例の分離株を含むO157(VT2) 23株のPFGEによる解析では，それぞれの事例においてPFGEパターンおよびIS法の結果はすべて一致していた（図２）．家族内事例３および４の分離株は，PFGEパターンの類似度が95%以上と高く，IS法の結果も一致していたが，疫学的な関連は認められなかった．さらに，家族内事例２，４および５において，各事例で分離された菌株の他に，疫学的な関連は認められないもののPFGEパターンが一致する菌株がそれぞれの事例で確認された．

食肉衛生検査所においてウシから分離されたO157(VT2) ２株およびO157(VT1) １株についてヒト由来株と比較した結果，PFGEおよびIS法でパターンが一致あるいは類似度の高い菌株は認められなかった．

O26(VT1) ７株，O103(VT1) ３株およびO121(VT2) ３株におけるPFGE解析では，家族内事例分離株はすべてPFGEパターンが一致し，その他は高い類似度を示す菌株は認められず，すべて散発事例由来であることが確認された．

次に，EHEC 77株について，アミノベンジルペニシ

表３　薬剤感受性試験結果（77株）

	耐性薬剤	血清型	菌株数
4剤	ABPC, SM, ST, TC	O157 VT1&2	1
3剤	ABPC, SM, ST	O157 VT1&2	1
		O121 VT2	1
2剤	ABPC,SM	O157 VT2	1
	SM,TC	O157 VT1&2	1
		O121 VT2	2
単剤	ABPC	O157 VT1&2	1
	CP	O157 VT1&2	1
	SM	O157 VT1&2	1
中間値	SM	O157 VT1&2	2
		O91 VT2	1
		O26 VT1	1
感受性			63
計			77

リン(ABPC)，セフォタキシム(CTX)，クロラムフェニコール(CP)，ホスホマイシン(FOM)，ゲンタマイシン(GM)，カナマイシン(KM)，ナリジクス酸(NA)，シプロフロキサシン(CPFX)，ストレプトマイシン(SM)，スルファメトキサゾール・トリメトプリム合剤(ST)およびテトラサイクリン(TC)の11薬剤についてCLSI（米国臨床検査標準化協会）法[2)]に準拠して薬剤感受性試験を実施した（表３）．その結果，ABPC，SM，ST，TCの４剤耐性は１株，ABPC，SM，STの３剤耐性は２株，ABPC，SMの２剤耐性は１株，SM，TCの２剤耐性は３株，ABPCの単剤耐性は１株，CPの単剤耐性は１株，SMの単剤耐性は１株認められ，77株中63株が供試した11薬剤に感受性であった．

今回，県域内外において広域的散発事例が確認され，各自治体間においても情報共有されたが，疫学的な関連は認められなかった．自治体間にまたがる広域的な散発事例では，実験室間において結果を比較し，分離株が集団事例に関連しているかどうかを判断する必要がある．IS法の適用はO157のみに限られるが，本法は迅速性に優れており，結果は記号化されたデータであるため実験室間でのO157分離株の比較が容易である．このことからO157の感染事例における菌株の解析には，IS法をスクリーニング検査として実施して関係機関と迅速に情報共有するとともに，識別能力に優れたPFGEを行うことにより遺伝子レベルでのO157 分離株間の関連を明確にすることが有用な手法であると思われた．

EHECの散発および集団事例に対しては迅速に探知して拡大を防止しなければならない．EHECの解析について感染研に導入されたMLVAは迅速性および再現性に優れており，当所においても導入を検討すべきと思われるが，シーケンサーを使用するなどといった検討課題があることから，識別能力に優れたPFGEは，遺伝子解析の有効な手段として今後も利用されると考える．

なお，この報告の一部は，厚生労働科学研究費補助金（広域における食品由来感染症を迅速に探知するために必要な情報に関する研究　新興･再興感染症研究事業）において実施した．

最後に，ご協力を頂きました各医療機関，医療検査機関，衛生研究所地域調査部および菌株搬入にご尽力いただきました各保健福祉事務所，食肉衛生検査所，食品衛生課，健康危機管理課ならびに藤沢市保健所の方々に深謝いたします．

（平成27年８月１日受理）

文　献

１）腸管出血性大腸菌感染症：病原微生物検出情報. 27, 149 (2006)

２）Clinical and laboratory standards institute; methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria; approved guideline, CLSI document M45-A1, Wayne, Pa., (2007)

神奈川県衛生研究所研究報告　No. 45 (2015)
Bull. Kanagawa Ins. of P.H.

資料

感染性胃腸炎患者からの原因ウイルス検出状況（平成26年度）

鈴木理恵子，高橋淳子，金城惠子，
近藤真規子，黒木俊郎

Surveillance of viral gastroenteritis in Kanagawa Prefecture (April, 2014－March, 2015)

Rieko SUZUKI, Junko TAKAHASHI, Keiko KINJO,
Makiko KONDO and Toshiro KUROKI

我々は，感染症予測監視事業の一環として，感染性胃腸炎の原因ウイルスを把握する目的で，神奈川県域（川崎市，横浜市，横須賀市，相模原市および藤沢市を除く）の各小児科定点医療機関から搬入された感染性胃腸炎患者の検体から原因ウイルスの検索を行っている．ウイルスを原因とする感染性胃腸炎は，例年冬期に多くの流行がみられ，冬期前半には乳幼児から成人に至るまで幅広い年齢層でノロウイルスによる胃腸炎，冬期後半を中心に乳幼児にみられるロタウイルスによる胃腸炎の流行が良く知られている．定点医療機関からの検体では，これらのウイルスの他にアデノウイルス，サポウイルス，アストロウイルス，C群ロタウイルスも検出されている．また，冬期以外でも幼稚園や小学校および老人福祉施設でノロウイルス，A群ロタウイルス，サポウイルスおよびC群ロタウイルスによる感染性胃腸炎の集団発生報告があることから，時期・年齢に関わらず複数のウイルスの検索を行っている．

平成26年４月から平成27年３月に感染性胃腸炎と診断された患者の便202検体について，ノロウイルス，サポウイルス，アストロウイルス，アデノウイルス，A群ロタウイルスおよびC群ロタウイルスの検索を行った．ウイルスの検出は，ノロウイルスには定量PCR，サポウイルス，アストロウイルス，アデノウイルス，A群ロタウイルスおよびC群ロタウイルスは RT-PCRによる遺伝子検出を行った．また，検出された各種ウイルスの一部について，ダイレクトシークエンス法を用いて塩基配列を決定し，系統樹解析（NJ法）による型別を実施した．

表１に年齢別ウイルス検出状況を示した．202検体中82検体から83株の原因ウイルスが検出され，その内訳は，ノロウイルス51株（61.4%），サポウイルス12株（14.5%），アストロウイルス11株（13.3%），アデノウイルス７株（8.4%）およびA群ロタウイルス２株（2.4%）であった．

年齢別検体数の内訳は，６歳以下は124検体，７歳～12歳は29検体，13歳～22歳は９検体，23歳～64歳は34検体，65歳以上は４検体，年齢不明は２検体で，６歳以下からの検体が最も多く61%を占めた．陽性検体数は，６歳以下で51検体，７歳～12歳は13検体，13歳～22歳は２検体，23歳～64歳は15検体，65歳以上は１検体の計82検体であった．検出されたウイルスは，６歳以下が５種類と最も多く，７歳～12歳では３種類,23歳～64歳では２種類，13歳～22歳および65歳以上では１種類であり，低年齢層で検出ウイルスの種類が多い傾向にあっ

表１　年齢別ウイルス検出状況（平成26年４月～平成27年３月）

	検体数	陽性検体数	検出ウイルス数(%)						合計(%)
			ノロウイルス	サポウイルス	アストロウイルス	アデノウイルス	A群ロタウイルス	C群ロタウイルス	
6歳以下	124	51	27	6	10	7	2	0	52 [1)]
7歳～12歳	29	13	10	2	1	0	0	0	13
13歳～22歳	9	2	2	0	0	0	0	0	2
23歳～64歳	34	15	12	3	0	0	0	0	15
65歳以上	4	1	0	1	0	0	0	0	1
不明	2	0	0	0	0	0	0	0	0
合計	202	82	51 (61.4)	12 (14.5)	11 (13.3)	7 (8.4)	2 (2.4)	0	83 (100.0)

1：複数ウイルス検出（ノロウイルスGⅡ，アストロウイルス）1例を含む

神奈川県衛生研究所　微生物部
〒253-0087　茅ヶ崎市下町屋1-3-1

た．ノロウイルスは65歳以上から，サポウイルスは13歳～22歳の年齢群からは検出されなかったが，幅広い年齢層から検出された．また，６歳以下の患者１名からノロウイルスgenogroup（以下，Ｇ）Ⅱとアストロウイルスが同時に検出された．

表２　発病月別ウイルス検出状況

年　月	検出ウイルス数										合計
	ノロウイルス		サポウイルス				アストロウイルス	アデノウイルス	A群ロタウイルス	C群ロタウイルス	
	GⅠ 1)	GⅡ 2)	GⅠ 1)	GⅡ 2)	GⅣ 3)	GⅤ 4)					
平成26年　4月	0	5	0	0	0	0	2	0	0	0	7
5月	0	15 5)	0	1	0	0	3 5)	2	1	0	22
6月	0	4	1	0	0	1	4	1	0	0	11
7月	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	2
8月	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9月	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
10月	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	2
11月	0	3	0	1	0	1	0	0	0	0	5
12月	0	7	0	0	3	1	0	1	0	0	12
平成27年　1月	0	11	1	0	0	0	0	0	0	0	12
2月	0	4	0	0	1	0	1	0	0	0	6
3月	0	2	0	0	0	0	0	1	0	0	3
小計	0	51	2	2	4	4					
合計	51		12				11	7	2	0	83

1：genogroupⅠ
2：genogroupⅡ
3：genogroupⅣ
4：genogroupⅤ
5：複数ウイルス検出例

月別のウイルス検出状況を表２に示した．83株のウイルスのほとんどは春期および冬期に検出され，８月には検出されなかった．

ウイルスごとの検出状況をみると，ノロウイルスは例年の検出状況と同様に，平成26年４月から６月の春期、平成26年11月から平成27年３月の冬期に多数検出され，７月から10月は検出されなかった．ノロウイルスが検出された51検体の遺伝子型はすべてＧⅡで，ノロウイルスに汚染された貝類等に起因する食中毒事例に多いＧⅠとＧⅡの同時検出例はみられなかった．ノロウイルスＧⅡのうち無作為に選んだ20株について遺伝子型別を実施した結果，ＧⅡ.4変異型が12株，ＧⅡ.6が４株，ＧⅡ.17が２株,ＧⅡ.2およびＧⅡ.13が１株ずつ検出された．平成24年９月から平成25年８月に全国で流行したＧⅡ.4変異型は，昨年の本調査では平成25年９月以降，減少傾向であったが，平成26年11月からは再び増加傾向であった．

サポウイルスは平成26年５月から７月，11月から平成27年２月に計12株検出された． 遺伝子群別(genogruop：以下Ｇ）を実施したところ，ＧⅣおよびＧⅤが４株ずつ，ＧⅠおよびＧⅡが２株ずつで，ＧⅢは検出されなかった．

サポウイルスのCapsid領域の系統樹を図１に示した．サポウイルスの遺伝子群はＧⅠからＧⅤの５種類あり，ＧⅠおよびＧⅡは１型から７型に分類される．系統樹解析の結果，今回検出されたＧⅣ４株とＧⅤ４株はそれぞれ同じクラスターを形成し，ＧⅠ.2が２株，ＧⅡ.1およびＧⅡ.3が１株ずつであった．神奈川県域において，平成23年度から25年度の流行の主流はＧⅠであったが，平成26年度にはＧⅠは減少し，ＧⅣおよびＧⅤが多く検出された．平成23年度より実施しているサポウイルスの遺伝子群別でＧⅤが検出されたのは初めてであった．

アストロウイルスは，平成26年４月に２株，５月に３株，６月に４株，10月および平成27年２月に１株，計11株が検出され，遺伝子型は全て１型であった．

アデノウイルスの７株は，すべて６歳以下の患者から検出され，いずれも下痢症の原因となる41型であった．

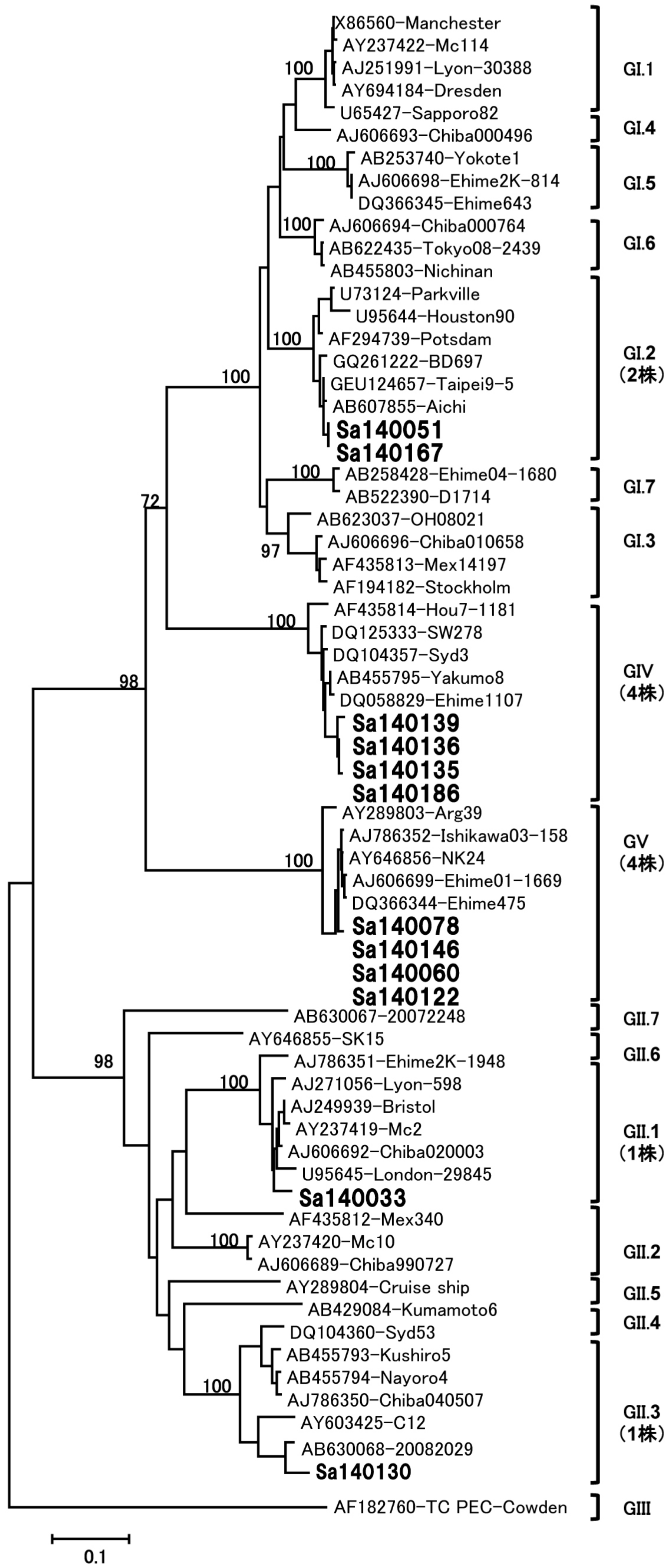
Ａ群ロタウイルスは，例年10株程度検出されていたが，平成26年度は２株に減少した．Ａ群ロタウイルスは１歳未満の乳幼児に多くみられる疾患であるが，平成23年から平成24年にＡ群ロタウイルスワクチンの接種がはじま

り，対象者へのワクチン接種が定着してきていることが減少の要因として考えられる.

平成23年度以降，ノロウイルス，サポウイルス，アストロウイルスについて系統樹解析（NJ法）による型別を実施し，流行ウイルスの遺伝子学的特徴を調査している.感染経路の推定には，系統樹解析による型別が有効なことから，今後も継続して実施する予定である．また，引き続き本調査を継続するにあたり，定点医療機関への検査結果の迅速な還元や病原微生物検出情報等により広く情報の提供に努めていきたい.

最後に，検体および患者情報の収集にご協力いただきました各小児科定点医療機関の先生方および本事業にご尽力いただきました県健康危機管理課の方々に深謝いたします.

（平成27年８月１日受理）



*: Sa140xxx はサポウイルス検出検体番号

図１　サポウィルスのCapsid領域の系統樹（384bp）

資料

神奈川県域におけるインフルエンザの流行状況（2014/2015シーズン）

渡邉寿美，佐野貴子，伊達佳美，
近藤真規子，黒木俊郎

Epidemic of influenza in Kanagawa Prefecture (2014/2015 season)

Sumi WATANABE, Takako SANO, Yoshimi DATE,
Makiko KONDO and Toshiro KUROKI

神奈川県域（横浜市，川崎市，相模原市および横須賀市を除く神奈川県内，以下県域）における季節性インフルエンザ（AH1pdm09，AH3，B）の動向を把握するため，通年で季節性インフルエンザ調査を行っている．また，AH5，AH7等の鳥インフルエンザのヒト感染事例が報告されている地域からの帰国者等，鳥インフルエンザ感染が疑われる患者に対しては，季節性インフルエンザの他に鳥インフルエンザのAH5とAH7も組み込んだ病原体検査対応を行っている．2014/2015シーズン（以下本シーズン）におけるインフルエンザウイルスの動向を報告する．

本シーズンの患者報告数は，2014年47週(11/17～23）に流行開始の目安となる定点あたり患者報告数1.0人を超えた後，50週(12/８～14)に注意報レベルの10.0人を，52週（12/22～28）に警報レベルの30.0人を超えた．2015年３週（１/12～18）には注意報レベルに下がったが，５週（１/26～２/１）までは横ばい状態が続いた．その後は減少して14週（３/30～４/５）の患者報告数は1.05人となっており，流行は終息に向かっていると思われた．なお，患者発生のピークは2014年52週の35.01人であった．本シーズンのインフルエンザ患者報告数は，例年よりも３週間程度速く始まり，終息も３週間程度速かった（図１）．

ウイルス調査は，2014年36週（９/１～７）～2015年14週の間にウイルスサーベイランス（県域の病原体定点調査）と入院サーベイランス（県域のインフルエンザと診断された入院症例）および集団かぜ調査（県域保健所管内の初発事例）で採取された検体を対象に行った．ウイルスサーベイランスの検体は276例，入院サーベイランスの検体は35例（散発14例および４集団21例），集団かぜの検体は10集団40例，計351例であった．検査はリアルタイムRT-PCR法による遺伝子検出とMDCK細胞によるウイルス分離を行った（一部の検体についてはウイルス分離のみを実施した）．遺伝子検出はインフルエンザウイルスのHA遺伝子を対象とし，AH1pdm09，AH3，Bの型別を行った．また，ウイルス分離株は，国立感染症研究所から配付された標準抗血清とモルモット血球を用いた血球凝集抑制反応を実施し，AH1pdm09，AH3，Bビクトリア系統，B山形系統に型別した．さらに，一部のAH1pdm09分離株についてはNA遺伝子のオセルタミビル耐性マーカー（H275Y変異）を調査した．

インフルエンザウイルスの検出状況を図１に示した．９月の新学期が始まると間もなく初発集団かぜの発生があり，この集団からはAH1pdm09が検出された．また，定点医療機関の検体からは９月～10月にかけてAH3が検出されており，本シーズンは，AH1pdm09とAH3との混合流行になると思われた．11月に入るとAH3の検出数が増加し，集団かぜ調査でも８集団からAH3が検出された．１月以降は，AH1pdm09とBも散発的に検出されるようになったが，流行の主流はAH3であった．検出されたインフルエンザウイルスは290例で，その内訳は，AH3が264例（91％）で最も多く，Bが16例（６％），AH1pdm09が10例（３％）であった（図２）．インフルエンザウイルス検出例のうちウイルスが分離できたのは130例で，AH3が117株，AH1pdm09が７株，Bが６株であった．B分離株はすべて山形系統株であった．また，AH1pdm09分離株についてNA遺伝子のオセルタミビル耐性マーカーを調査したが，耐性変異株は検出されなかった．

インフルエンザウイルス検出者の年齢構成は，10～14歳が最も多く21％，次いで30～39歳が14％，５～９歳が13％，70歳以上が11％となっており，他の年齢群は５～９％であった（図３）．検出型別の年齢構成を見てみると，検出数の 91％を占めるAH3検出者は，図３に示した全体の年齢構成とほぼ一致していた．AH1pdm09検出者は10例中８例が小児（７～12歳）であった．B検出者は１～ 64歳までの幅広い年齢群で構成されていた．

神奈川県衛生研究所　微生物部
〒253-0087　茅ヶ崎市下町屋1-3-1

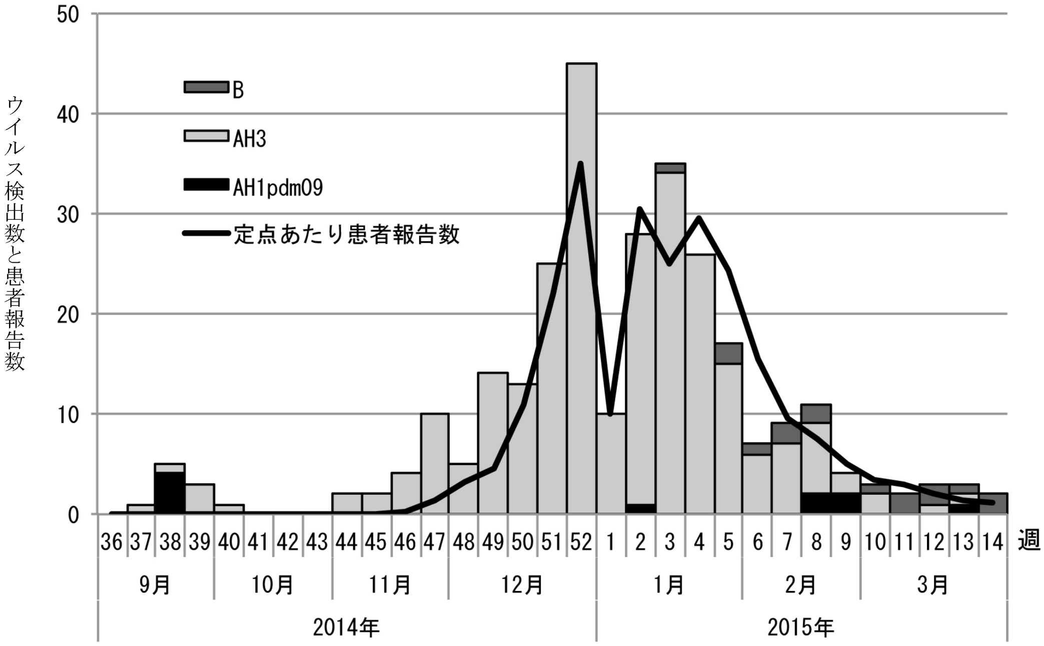


図1 インフルエンザウイルス検出数と患者報告数の推移

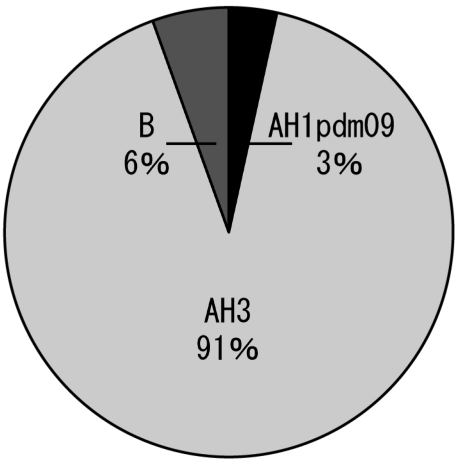


図2 インフルエンザウイルス検出割合

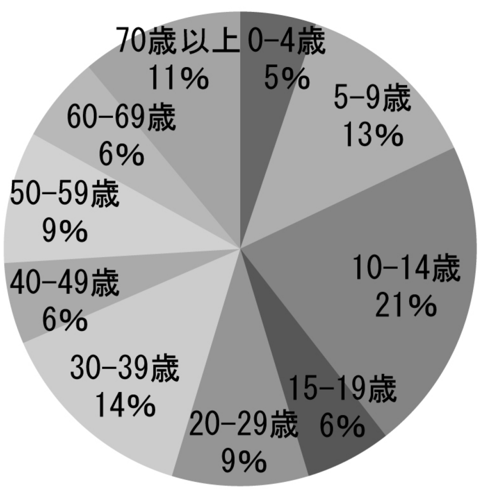


図3 インフルエンザウイルス検出者の年齢構成

入院症例は35例あり，散発の入院事例が14例（インフルエンザ脳症疑い2例を含む），院内感染事例が3集団16例，高齢者施設での集団発生例に伴う入院例1集団5例であった．鼻咽頭拭い液についてインフルエンザウイルスの検出を行ったところ，25例からAH3が検出され，10例は不検出であった．患者発生時期は，定点あたり患者報告数が20.0人を超えていた2014年51週～2015年5週に集中していた．入院患者の年齢構成は，散発例は小児が3例（0～7歳），成人が11例（39～93歳，うち70歳以上が9例）であった（表1）．集団発生のうち院内感染1は精神科での発生で患者は18～26歳の若年者であったが，院内感染2および3の患者は42～92歳で，13例中9例が70歳以上であった．高齢者施設の患者は85～95歳であった（表2）．

最後になりましたが，検体採取および患者情報の収集にご協力いただきました医療機関の先生方および検体搬送にご尽力いただきました県域保健所職員の皆様に深謝いたします．

（平成27年8月1日受理）

表１　入院症例（散発）のインフルエンザウイルス検査成績

症例	検体採取週	年齢	臨床症状	インフルエンザウイルス検出
1	2014年51週	90歳	発熱（40.2℃）	AH3
2	51週	7歳	発熱	AH3
3	2015年 2週	3歳	発熱、脳炎、脳症	不検出
4	2週	39歳	発熱（38℃）、意識障害、脳症	AH3
5	2週	74歳	発熱（39℃）、上気道炎	不検出
6	3週	0歳	発熱、下気道炎	AH3
7	3週	60歳	発熱（38.9℃）、上気道炎	AH3
8	3週	93歳	発熱（39.1℃）	AH3
9	3週	76歳	発熱（39℃）、心不全	AH3
10	3週	86歳	発熱（39.2℃）	不検出
11	4週	89歳	発熱（37.5℃）、肺炎	AH3
12	5週	81歳	発熱（38.8℃）	AH3
13	5週	78歳	発熱（38.4℃）	AH3
14	8週	74歳	発熱（38.1℃）、上気道炎	不検出

表２　入院症例（集団）のインフルエンザウイルス検査成績

症例	検体採取週	年齢	臨床症状	インフルエンザウイルス検出	
1	2014年 51週	20歳	発熱（39.8℃）、頭痛、咳、倦怠感	不検出	院内感染1
2	51週	18歳	発熱（39.1℃）	AH3	院内感染1
3	51週	26歳	発熱（39.2℃）	AH3	院内感染1
4	52週	63歳	発熱（39℃）	AH3	院内感染2
5	52週	80歳	発熱（39.2℃）	AH3	院内感染2
6	52週	89歳	発熱（40.1℃）	AH3	院内感染2
7	52週	78歳	発熱（39.8℃）、上気道炎	AH3	院内感染2
8	52週	42歳	発熱（38.5℃）、関節痛	不検出	院内感染2
9	52週	76歳	発熱（38℃）、上気道炎	AH3	院内感染2
10	52週	63歳	発熱（38.7℃）、上気道炎	AH3	院内感染2
11	52週	82歳	発熱（37.3℃）	AH3	院内感染2
12	52週	92歳	発熱、上気道炎	不検出	高齢者施設集団感染
13	52週	93歳	発熱、上気道炎	AH3	高齢者施設集団感染
14	52週	85歳	発熱、上気道炎	AH3	高齢者施設集団感染
15	52週	87歳	発熱、上気道炎	不検出	高齢者施設集団感染
16	52週	95歳	発熱、上気道炎	AH3	高齢者施設集団感染
17	2015年 4週	86歳	発熱（38.5℃）、上気道炎、下気道炎	不検出	院内感染3
18	4週	72歳	発熱（38.7℃）	AH3	院内感染3
19	4週	62歳	発熱（38.3℃）	AH3	院内感染3
20	4週	92歳	上気道炎	AH3	院内感染3
21	4週	73歳	無症状	不検出	院内感染3

他誌掲載論文抄録

（平成26年４月～平成27年３月）

新たな保健医療計画による地域医療連携の推進

岡部英男（神奈川衛研），神奈川県病院学会，33，27-32 (2014)

わが国の少子高齢化社会のなかで，国では平成24年２月17日に「社会保障・税一体改革大綱」を閣議決定した．内容は医療サービス提供体制についての制度改革で，具体的には急性期をはじめとする医療機能の強化，病院・病床機能の役割分担と連携の推進，居宅等における医療（在宅医療）の充実である．

医療計画策定の指針として，１．医療機能の分化・連携を推進するため，医療計画の実効性を高めるよう，二次医療圏を中心に疾病・事業を効果的に機能させる　２．在宅医療について，達成すべき目標，医療連携体制を構築する　３．精神疾患を既存の４疾病（がん，脳卒中，急性心筋梗塞，糖尿病）に追加して，医療連携体制を構築することになった．

これを受けて，神奈川県では第６次の保健医療計画（平成25年４月～平成31年３月）を策定した．事業別の医療体制の整備・充実として，総合的な救急医療，精神科救急医療，小児医療，周産期医療，災害時医療，在宅医療の連携の構築．疾患別としては，がん，脳卒中，急性心筋梗塞，糖尿病，精神科疾患（認知症を含む）医療連携の構築である．平成25年４月に策定した「神奈川県医療グランドデザイン」を基に，関係機関や関係団体との連携協力体制を構築し，県民の健康寿命の延伸にも力を尽くしたい．

健康寿命の延伸を目指して　―神奈川県での取組み―

岡部英男（神奈川衛研），予防医学，56，19-28 (2014)

神奈川県では健康寿命を延伸し，日本一を目指してさまざまな取り組みを開始している．厚生労働省の「健康日本21（第二次）」に基づき，「かながわ健康プラン21（第二次）」を策定し，県は，健康づくり運動を市町村や関係団体と連携し積極的に推進している．その中で健康寿命の延伸は主要な取組みの一つであり，昨年度には「健康寿命日本一戦略会議」を設置し，関係分野の専門家による討論を開始した．

戦略会議の議論の中から，健康寿命の延伸のため，栄養，運動，社会参加の重要性を取り上げ，県や市町村と連携した施策を推進している．

健康寿命の延伸のためには，自助，共助，公助が大切である．そして，健康寿命の延伸を目指して，国や神奈川県の取り組みの基本となる医学的側面や健康づくり施策，持続可能な社会保障施策，そして具体的な施策として，栄養，運動，社会参加について述べた．地域社会の再生を目指して今後とも地域の特性に合わせて積極的な支援を行っていく．

Outbreak of *Streptococcus pneumoniae* serotype 3 pneumonia in extremely elderly people in a nursing home unit in Kanagawa, Japan, 2013
（2013年の神奈川県の高齢者施設の高齢者で発生した肺炎球菌血清型３による肺炎の集団発生）

黒木俊郎（神奈川衛研），石田正之（寒川病院），古川一郎，大屋日登美，渡辺祐子（神奈川衛研），近内美乃里，相原雄幸（茅ヶ崎保健福祉事務所），常彬，大石和徳，大西真（感染研），鈴木基，有吉紅也，森本浩之輔（長崎大熱帯研）J. Am. Geriatrics Soc., 62(6), 1197-98 (2014)

国内の高齢者施設において肺炎が集団で発生した．31人の入所者のうち10人（32%）が１ヶ月の間に肺炎を発症した．患者の年齢の中間値は87.5歳で，いずれの患者も肺炎球菌ワクチンを接種していなかった．喀痰の培養から肺炎球菌血清型３が検出された．

Intercontinental dispersal of HIV-1 subtype B associated with transmission among men who have sex with men in Japan
（世界的に流行しているHIV-1サブタイプBと日本のMSM間で流行しているサブタイプBとの関連）

武部豊，草川茂，俣野哲郎（国立感染研），内藤雄樹（情報・システム研究機構ライフサイエンス総合データベースセンター），Jayna Raghwani，Oliver G. Pybus（University of Oxford），Esther Fearnhill，David Dunn（MRC Clinical Trials Unit at UCL），Jean L. Mbisa（Public Health England），Hongyi Zhang（Addenbrooke's Hospital）[g] Andrew J.

Leigh Brown (University of Edinburgh), 佐野貴子, 近藤真規子 (神奈川衛研), on behalf of the UK Collaborative Groupon HIV Drug Resistance, Journal of Virology, **88**(17), 9864-76 (2014)

我々は東アジアのMSM間で流行しているHIV-1サブタイプBのいくつかの特有なクラスターを同定した．これらクラスターと世界の流行株との相互関係をLosAlamosおよび英国データベースを用いて解析した．英国で分離された13株，中国３株，米国，カナダ，ドイツ，台湾それぞれ１株ずつ，計20株は，日本においてMSMの３分の一が形成するクラスター（JP.MSM.B-1）に属し，その中で英国の10株とドイツおよび米国の１株ずつ，計12株がサブグループ（Global(UK)-JP.MSM.B-1）を形成していた．日本におけるHIV-1サブタイプBは，疫学的情報により1980年代初めごろ欧米から流入したと考えられているが，JP.MSM.B-1バリアントは1989年ごろ播種，その後国内で拡大し，さらには1999年ごろから世界的に拡がったと推定された．英国での分離株の一部が，アジア特有のクラスターに属することが明らかになり，これらの結果はアジアでの流行株が世界規模で分散する兆しを示唆していると考えられ，世界規模でのHIV流行監視と対策の必要性が示された．

Hopanoid hydrocarbons and perylene in Lake Biwa (Japan) sediment: Environmental control on their abundance and molecular composition
（琵琶湖堆積物中のホパノイド炭化水素とペリレン：含有量と分子組成と環境との関連）

石渡良志（都立大），上村仁（神奈川衛研），山本修一（創価大），Organic Geochemistry, **76**, 194-203 (2014)

琵琶湖の柱状堆積物中のホパノイド炭化水素とペリレンの鉛直分布を調査し，過去12万年の湖周辺の古環境情報との関連を考察した．Moretene濃度は湖水の溶存酸素量の指標として有用であることがわかった．Hopaneの異性体比，ペリレン濃度，全有機炭素濃度は土壌の酸性度や気温，湿度の指標として有用であることがわかった．

Safety prediction of topically exposed biocides using permeability coeffcients and the desquamation rate at the stratum corneum
（皮膚透過性、角層落屑率を用いたバイオサイドの経皮暴露後の安全性評価）

杉野雅浩，鈴木貴雅，中田圭一，杉林堅次（城西大学），辻　清美（神奈川衛研），徳永裕司，神野透人（国立衛研），J. Toxicol. Sci., **39**, 475-485 (2014)

一般家庭内で使用されているバイオサイド（p-クレゾール，ダイアジノンおよびレスメトリン）の経皮暴露の安全性評価について，皮膚透過係数と角層落屑速度の比較により検討した．*In vitro* 皮膚浸透実験により経皮吸収性を検討した結果，ダイアジノンとレスメスリンの皮膚透過係数は皮膚の角層落屑速度より小さい値を示したことから，ダイアジノンとレスメスリンの皮膚実質層を介した透過は無視できる程度であることが判明した．他方，p-クレゾールの皮膚透過係数は角層落屑速度より大きい値を示し，皮膚透過性は高いことがわかった．今回記述した方法は化学物質の経皮暴露毒性予測には有用な方法であった．

Bulletin of Kanagawa Prefectural Institute of Public Health（Bull. Kanagawa Ins. of P.H.）is an official periodical on reseach works at Kanagawa Prefectural Institute of Public Health and is publishued, as a rule, annually. All communications relating to the publication should be addressed to the Editorial Board.

Editorial Board
KANAGAWA PREFECTURAL INSTITUTE OF PUBLIC HEALTH
1 — 3 — 1 Shimomachiya, Chigasaki 253-0087
JAPAN

Bulletin
of
Kanagawa Prefectural Institute of Public Health
No.45 (September, 2015)

CONTENTS

KANAGAWA PREFECTURAL INSTITUTE OF PUBLIC HEALTH
1－3－1 Shimomachiya, Chigasaki 253-0087
JAPAN