

秋田県健康環境センター年報

第 6 号

平成 22 年度

ANNUAL REPORT

OF

AKITA RESEARCH CENTER FOR PUBLIC HEALTH AND ENVIRONMENT

No. 6 2010

秋田県健康環境センター

は じ め に

平成23年3月11日に発生した東日本大震災におきまして、岩手・宮城・福島を中心とした太平洋沿岸地域は1000年に1度ともいわれる津波により、多数の尊い命と地域の生活基盤が同時に失われました。ここに謹んで哀悼の意を表しますとともに、被災者の皆さまに心からお見舞いを申し上げます。

震災後には東京電力福島第一原子力発電所から膨大な量の放射性物質が広範囲に拡散する事故が発生し、長期にわたる健康や環境への影響が懸念されております。このため放射性物質の測定・監視を担っております我々地方衛生・環境研究所の社会的使命もますます大きくなるものと思っております。

当センターでは、震災による停電は発生したものの大きな被害はなく、直ちに緊急体制へと移行し、モニタリングポストに加えサーベイメータによる空間放射線量の監視を強化いたしました。また、降下物や飲料水の放射性物質測定の頻度を高めたほか、関係機関と連携を取りながら食品や農畜産物等の検査と迅速な結果の提供を行い、県民の皆さまの安全・安心の確保につとめております。

一方、平成23年3月には、当センターの今後10年間の基本方針と方向性を定めたセンター中長期計画の改定を行いました。この中で県民生活の安全・安心の実現に向け、「健康の保持及び増進」、「感染症、食中毒及び化学物質による健康被害の防止」、「環境の保全」の3つを基本方針と定め、職員一同がこれらに関する調査研究と試験検査に取り組んでおります。

本報では、主に平成22年度の調査研究及び業務実績についてとりまとめ御報告いたしており、本書を通じて多くの県民の皆さまに当センターの活動への理解と関心を高めていただきたいと考えております。

今後とも県民の皆さまの暖かい御支援、御協力をお願いいたします。

平成23年11月

秋田県健康環境センター所長
井 島 辰 也

目 次

I 健康環境センターの概要

1. 沿革	1
2. 庁舎の概要	1
3. 組織	1
4. 職員名簿	2
5. 業務内容	3
6. 主要機器	4

II 業務実績

1. 試験検査実績	5
2. 研修・学会等	9
3. 研究業務実績	14

III 調査研究報告

・ 高血圧対策のための食パターン分析	25
・ 市販鶏肉からの CTX-M 基質拡張型 β ラクタマーゼ (ESBL) 遺伝子保有株の分離と分離株の解析	33
・ 秋田県内の医療機関における CTX-M 基質拡張型 β ラクタマーゼ (ESBL) 遺伝子保有株の分離状況	40
・ 秋田県内の 1 医療機関で分離された多剤耐性 <i>Achromobacter xylosoxidans</i> の分子疫学的性状と Class I intedron の解析	46
・ 秋田県における非定型の下痢原性大腸菌の分離状況と <i>astA</i> 保有大腸菌 (EAST1EC) における病原因子保有状況	51
・ 新生児マス・スクリーニング検査における精密検査依頼事例結果について (平成 21 年度・22 年度)	54
・ パンソルビン・トラップ法による食品中のノロウイルス検査法の構築	59
・ 秋田県における Oral sex 経験者の <i>N.gonorrhoeae</i> および <i>C.trachomatis</i> の検出状況	70
・ 新規制物質 1,4-ジオキサンの固相抽出及びヘッドスペース分析法の検討	77
・ 玉川酸性水中和処理におけるシュベルトマナイト様化合物形成による重金属回収挙動	81

IV 発表業績

1. 学会発表	87
2. 他誌掲載論文	96

I 健康環境センターの概要

1. 沿革

年月	事項
明治35. 7 明治末期	衛生試験所を秋田市牛島町に設立。 庁舎を秋田市土手長町に移転。
昭和28. 1	衛生研究所に改称。
39. 4	衛生科学研究所に改称。
39. 6	庁舎を秋田市古川堀反町（現千秋明徳町）に新築移転。
45. 7	公害技術センターを秋田市茨島の工業試験場内に設立。
48. 7	庁舎を秋田市八橋に新築移転。
56. 4	環境技術センターに改称。
61. 8	庁舎を秋田市千秋久保田町に新築移転。
平成12. 4	環境センターに改称。 秋田市山王の県庁第二庁舎に総務班及び監視・情報班を置く。
14. 3	八橋分室敷地内にダイオキシン類分析棟を新築。
18. 4	衛生科学研究所と環境センターを組織統合し、健康環境センターとして発足。 千秋庁舎に企画管理室及び保健衛生部を、八橋庁舎に環境部を設置。
21. 4	八橋庁舎の環境部を千秋庁舎に移転し、庁舎を統合。保健衛生部の理化学部門と環境部の化学物質部門を統合した理化学班を環境・理化学部内に設置。組織を企画管理室、保健衛生部及び環境・理化学部とする。
22. 4	保健所の試験検査課を統合。保健衛生部の微生物班を細菌班とウイルス班に分離し、健康科学班を健康科学・管理班に名称変更。環境・理化学部を理化学部と環境保全部に分離。理化学部には、理化学班を分割して食品理化学班と環境理化学班を設置。環境保全部には環境調査班を名称変更した環境保全部を設置。

2. 庁舎の概要

- 1) 所在地 秋田市千秋久保田町 6 番 6 号
- 2) 敷地 867.75 m²（建物建床面積）
- 3) 建物 鉄筋コンクリート造 5 階建 延床面積 4,553.52 m²

3. 組織

（平成 23 年 4 月 1 日現在）



総職員数 51 名（正職員 44 名，専門員 1 名，非常勤職員 2 名，臨時職員 4 名）

4. 職員名簿

(平成23年4月1日現在)

	職 名	氏 名
	所 長	井 島 辰 也
企 画 管 理 室	室 長	石 郷 岡 晋
総 務 ・ 企 画 班	主 幹 (兼) 班 長	泉 公 夫
	主 任 研 究 員	田 村 高 志
	主 査	黒 政 太
	主 査	櫻 庭 遊
	主 任	高 橋 育 子
	研 究 員	柴 田 ちひろ
	技 能 主 任	佐 藤 博 之
保 健 衛 生 部	部 長	齊 藤 志 保 子
健 康 科 学 ・ 管 理 班	上 席 研 究 員 (兼) 班 長	高 山 憲 男
	上 席 研 究 員	岩 谷 金 仁
	上 席 研 究 員	栗 盛 寿 美 子
	主 任 研 究 員	田 中 貴 子
	研 究 員	村 山 力 則
細 菌 班	上 席 研 究 員 (兼) 班 長	千 葉 真 知 子
	上 席 研 究 員	和 田 恵 理 子
	主 任 研 究 員	八 柳 潤
	主 任 研 究 員	熊 谷 優 子
	研 究 員	高 橋 志 保 之
	研 究 員	高 今 野 貴 之
ウ イ ル ス 班	上 席 研 究 員 (兼) 班 長	安 部 真 理 子
	主 任 研 究 員	斎 藤 博 之
	研 究 員	秋 野 和 華 子
	研 究 員	佐 藤 寛 子
	研 究 員	藤 谷 陽 子
理 化 学 部	部 長	高 嶋 司
食 品 理 化 学 班	上 席 研 究 員 (兼) 班 長	松 田 恵 理 子
	上 席 研 究 員	佐 藤 晴 美
	専 門 員	鈴 木 雄 二
	研 究 員	松 渕 亜 希 子
	研 究 員	菅 原 剛
	技 師	天 明 さ お り
環 境 理 化 学 班	上 席 研 究 員 (兼) 班 長	山 田 雅 春
	主 任 研 究 員	小 林 貴 司
	研 究 員	玉 田 将 文
	研 究 員	小 川 千 春
環 境 保 全 部	部 長	佐 藤 信 也
環 境 保 全 班	上 席 研 究 員 (兼) 班 長	藤 島 直 司
	主 任 研 究 員	鈴 木 忠 之
	主 任 研 究 員	石 垣 修
	主 任 研 究 員	清 水 匠
	主 任 研 究 員	成 田 修 司
	研 究 員	高 橋 英 之
	研 究 員	佐 々 木 純 恵

5. 業務内容

(平成23年4月1日現在)

企画管理室	総務・企画班	<ul style="list-style-type: none"> ・人事、服務及び福利厚生に関する業務 ・予算・決算に関する業務 ・検体の受付及び手数料の徴収に関する業務 ・物品の購入、出納及び保管に関する業務 ・庁舎管理に関する業務 ・公印・文書管理に関する業務 ・研究の企画・管理に関する業務 ・センターの中長期計画に関する業務 ・広報に関する業務 ・研修指導に関する業務
保健衛生部	健康科学・管理班	<ul style="list-style-type: none"> ・感染症情報センター業務 ・感染症情報に基づく調査研究 ・結核登録者情報調査に関する業務 ・花粉症予防対策業務及び調査研究 ・生活習慣病予防対策業務及び調査研究 ・健康・栄養調査業務 ・公衆衛生情報 ・健康危機管理情報 ・検査業務管理 ・精度管理
	細菌班	<ul style="list-style-type: none"> ・細菌感染症に関する試験検査及び調査研究 ・細菌性食中毒に関する試験検査及び調査研究 ・医薬品等に関する細菌検査 ・収去食品及び環境検体等に関する細菌検査
	ウイルス班	<ul style="list-style-type: none"> ・ウイルス感染症に関する試験検査及び調査研究 ・ウイルス性食中毒に関する調査研究及び試験検査 ・性感染症等に関する試験検査及び調査研究 ・ツツガムシ病に関する血清診断及び調査研究 ・新生児マス・スクリーニング検査及び調査研究
理化学部	食品理化学班	<ul style="list-style-type: none"> ・食品の理化学検査 ・食品の安全性に関する調査研究 ・有害家庭用品試買検査 ・医薬品等に関する理化学検査 ・環境放射能調査
	環境理化学班	<ul style="list-style-type: none"> ・工場・事業場排水中の化学物質の検査 ・廃棄物に関する化学物質の検査 ・環境中の化学物質に関する調査研究
環境保全部	環境保全班	<ul style="list-style-type: none"> ・公共用水域水質調査 ・工場・事業場排水基準検査 ・工場・事業場ばい煙排出基準検査 ・廃棄物関係検査 ・生活衛生関係検査 ・大気汚染常時監視 ・航空機騒音調査 ・酸性雨調査 ・アスベスト環境調査 ・環境保全に関する調査研究

6. 主要機器

(平成23年4月1日現在)

機 器 名	規 格
電子顕微鏡	日本電子 JEM-1010
偏光ゼーマン原子吸光光度計	日立製作所 Z-5000
原子吸光分光光度計	バリアン・テクトロン AA-220FS
原子吸光分光光度計	バリアン・テクノロジー AA-280FS
ICP発光分光分析装置	サーモフィシャー iCAP6300Duo
ノルマルヘキサン自動抽出装置	ラボテック HX-1000-8
分離用超遠心機	日立工機 CP70MX
ガスクロマトグラフ質量分析計	島津 QP5000
ガスクロマトグラフ質量分析計	島津 QP5050A
ガスクロマトグラフ質量分析計システム	日本電子社 JMS-700Dほか
ガスクロマトグラフ質量分析計	アジレント・テクノロジー 6890N/5973N
超臨界流体抽出装置	ISCO SFX220
ガスクロマトグラフ質量分析計	島津 GCMS-QP2010 Plus
キャピラリーガスクロマトグラフ	ヒューレットパッカー HP6890
ガスクロマトグラフ	アジレント・テクノロジー 6890N
FID付ガスクロマトグラフ	アジレント・テクノロジー 7890A
FPD・ECD付ガスクロマトグラフ	アジレント・テクノロジー 7890A
ガスクロマトグラフタンデム型質量分析計	サーモフィシャー TSQ QuantumGC
高速液体クロマトグラフ	日立製作所 L-7000
高速液体クロマトグラフ	日立製作所 L-7000
高速液体クロマトグラフ	日本ウォーターズ 2695
高速液体クロマトグラフ	日本ウォーターズ 996アライアンスシステム
高速液体クロマトグラフ	アジレント・テクノロジー DAD・FLD検出器付 1200シリーズ
液体クロマトグラフィー	日立 D-7000
イオンクロマトグラフ	日本ダイオネクス DX-120
イオンクロマトグラフ	日本ダイオネクス DX-320
高速溶媒抽出装置	DIONEX社 ASE-200
高速溶媒抽出装置	DIONEX社 ASE-300
大量注入溶媒除去システム	SGE社 SCLV
液体クロマトグラフタンデム質量分析計	ABサイエックス API4000
オートアナライザー	日立メディコ 7020
オートアナライザー	ビーエルテック QuAAtro 2-HR
Ge半導体検出器付波高分析装置	セイコーEG&G GEM20P, MCA7700
PCRプロダクト検出定量システム	アプライドバイオシステムズ ABI PRISM 7000
遺伝子増幅装置	日本ロシュ ライトサイクラーシステム3
自動核酸精製装置	日本ロシュ MagNA Pure LC2.0
先天性甲状腺機能低下症等スクリーニングシステム	BSD600
低バックグラウンド放射能自動測定装置	アロカ LBC-4201B
モニタリングポスト	アロカ MAR-22
大型高圧蒸気滅菌装置	平山製作所 HK-530E
大気汚染常時監視テレメータシステム	NEC他
マイクロウェーブ分解装置	マイルストーンゼネラル ETHOS900

Ⅱ 業務実績

1. 試験検査実績

1.1 保健衛生部行政依頼検査

(件数)

項目	年度		平成20	平成21	平成22
細菌・ウイルス等の試験検査	感染症発生动向調査病原体別検査数	ウイルス分離検査	541	459	638
		細菌検査	722	719	854
	感染症流行予測調査	インフルエンザ感染源調査	100	100	100
		日本脳炎感染源調査	70	70	70
	食中毒等検査	ノロウイルス検査	270	357	240
		細菌検査	275	810	1,065
	HIV抗体検査		10	7	6
	HIV抗体確認検査		2	4	6
	性器クラミジア抗体検査		266	199	192
	梅毒抗体検査		268	202	190
	B型肝炎抗原検査		344	334	155
	C型肝炎抗体検査		345	338	154
	C型肝炎 PCR		1	0	0
	麻疹抗体価検査		9	0	47
	麻疹PCR		4	4	17
	新型インフルエンザ		4	372	56
	新型インフルエンザタミフル耐性検査*		—	—	16
	3類感染症に係わる病原微生物検査		778	714	1,108
	地研レファレンスセンター業務	カンピロ血清型別	15	6	0
		ジフテリア・百日咳・ボツリヌス	102	55	45
	結核菌RFLP検査, VNTR検査		5	7	5
	つつが虫病血清検査		93	67	110
	その他微生物学的検査		774	93	15
	食品衛生に係る検査	食品収去検査*	—	—	1,089
		食中毒菌汚染実態調査	79	100	100
		精度管理	2	1	1
生活衛生に係る検査	公衆浴場水, 遊泳プール水の大腸菌検査*	—	—	32	
	貸しおしぼり検査*	—	—	32	
	公衆浴場等レジオネラ属菌検査	63	61	59	
水質汚濁対策	公共用水域水質環境調査*	—	—	222	
	八郎湖水質保全調査*	—	—	79	
	工場・事業場排水基準検査*	—	—	281	
廃棄物対策	産業廃棄物等基準検査*	—	—	21	
マス・スクリーニング	先天性代謝異常, 内分泌疾患	8,188	7,999	7,741	
医薬品等監視指導業務に係る検査	医薬品, 医薬部外品, 医療機器(細菌)	4	9	8	
合 計			13,334	13,087	14,754

* 新型インフルエンザタミフル耐性検査, 食品収去検査, 公衆浴場水・遊泳プール水の大腸菌検査, 貸しおしぼり検査, 公共用水域水質環境調査, 八郎湖水質保全調査, 工場・事業場排水基準検査, 産業廃棄物等基準検査については, 平成22年度から新たに項目を起こした。

1.2 保健衛生部一般依頼検査

(件数)

項目	年度	平成20	平成21	平成22	
感染症発生動向調査に関わる検査	秋田市保健所依頼分(再掲)	80	83	215	
細菌・ウイルス等の試験検査	ウイルス分離検査	36	35	0	
	食中毒関係等ノロウイルス検査	118	139	4	
	ノロウイルス検査(カキ)	68	0	0	
	新型インフルエンザ*1	—	257	13	
	新型インフルエンザタミフル耐性検査*2	—	—	1	
	細菌培養同定検査	69	3	1	
	細菌遺伝子解析検査	1	0	3	
	血液製剤無菌試験	真菌否定検査	17	34	18
		細菌否定検査	17	34	18
HIV抗体確認検査*1	—	1	0		
合 計		406	585	273	

*1 新型インフルエンザ, HIV抗体確認検査については, 平成21年度から新たに項目を起こした。

*2 新型インフルエンザタミフル耐性検査については, 平成22年度から新たに項目を起こした。

1.3 情報提供業務

(件数)

項目	年度	平成20	平成21	平成22		
基幹・地方感染症情報センター (感染症発生動向調査依頼業務)	患者情報	週報	収集	468	477	468
			報告	52	53	52
			還元	52	53	52
			解析	52	53	52
			提供	468	477	468
	患者情報	月報	収集	108	108	108
			報告	12	12	12
			還元	12	12	12
			解析	12	12	12
			提供	108	108	108
	病原体情報		収集	275	697	350
			報告	275	697	350
			還元	275	697	350
			解析	275	697	350
	解析評価委員会資料提供		6	6	6	
	結核登録者情報調査依頼業務	患者情報	月報	収集	108	108
報告				12	12	12
還元				12	12	12
患者情報		年報	収集	9	9	9
			報告	1	1	1
			還元(前年分)	1	1	1
花粉症予防対策依頼業務	スギ花粉予報作成提供		83	73	53	
	スギ花粉測定数		98	73	206	
	スギ雄花芽調査数		20	15	15	
	花粉症患者調査票数		83	72	85	
合 計		2,877	4,535	3,252		

1.4 理化学部行政依頼検査

(件数)

項 目	年 度		平成 20	平成 21	平成 22
食品監視業務に係る検査	残留抗生物質・残留合成抗菌剤検査		120	150	540
	残留農薬実態検査		11,834	8,381	7,379
	食品収去検査（食品添加物等）*		—	—	808
	精度管理		15	15	16
医薬品等監視指導業務に係る検査	医薬品，医薬部外品，医療機器（理化学）		2	2	2
家庭用品試買検査	有害物質		36	86	61
地熱開発地域環境調査	温泉分析		403	300	252
環境放射能水準調査	空間線量		377	365	365
	全ベータ線		140	150	156
	核種分析		95	79	84
	分析確認		55	55	55
福島原子力発電所事故に伴う緊急環境放射能調査*	空間線量		—	—	460
	核種分析	降下物	—	—	14
		蛇口水	—	—	17
水質汚濁対策	環境調査	公共用水域水質調査	0	0	62
		地下水調査	0	14	121
		緊急調査	0	0	179
	工場排水基準検査		89	90	111
化学物質対策	化学物質環境調査		131	136	140
廃棄物対策	産業廃棄物等基準検査		334	360	364
	能代産業廃棄物処理センター環境保全対策	能代地区周辺環境調査	374	436	489
		能代産業廃棄物処理センター関連調査	1,296	1,710	3,456
合 計			15,301	12,329	15,131

* 食品収去検査（食品添加物等），福島原子力発電所事故に伴う緊急環境放射能調査については，平成 22 年度から新たに項目を起こした。

1.5 環境保全部行政依頼検査

(件数)

項 目	年 度		平成20	平成21	平成22
大気汚染対策	大気汚染常時監視 ^{*1}	一般環境大気測定局	50 (371,518)	55 (382,634)	55 (463,449)
		自動車排出ガス測定局	15 (103,001)	15 (103,977)	15 (118,250)
		工場局	74 (228,681)	74 (219,850)	74 (462,620)
	工場・事業場排出基準検査		28	29	29
	酸性雨調査	酸性雨実態調査	1,380	1,450	1,420
	アスベスト対策	石綿飛散調査	62	61	59
	水質汚濁対策	環境調査	公共用水域水質調査	3,740	3,975
地下水調査			19	7	137
緊急調査			0	0	24
工場・事業場排水基準検査		工場排水	0	0	2,514
		水浴場水 ^{*2}	—	—	475
八郎湖水質保全対策調査		底質調査	36	36	36
		緊急調査	0	166	0
玉川酸性水影響調査		776	533	216	
十和田湖水質保全対策調査		十和田湖水質生態系調査	384	360	240
	十和田湖流入河川調査	93	45	0	
生活衛生に係る検査	遊泳用プール水質検査 ^{*2}		—	—	40
	公衆浴場水質検査 ^{*2}		—	—	64
	食肉衛生検査所自主検査 ^{*2}		—	—	20
騒音対策	航空機騒音調査		722	735	735
廃棄物対策	産業廃棄物等基準検査		0	0	508
	能代産業廃棄物処理センター関連調査		0	0	1,179
	緊急調査 ^{*2}		—	—	387
合 計 (大気汚染常時監視を除く)			7,240	7,397	12,099

*1 大気汚染常時監視は、測定対象項目数（実測データ数）を表す。

*2 水浴場水、遊泳用プール水質検査、公衆浴場水質検査、食肉衛生検査所自主検査、廃棄物対策緊急調査については、平成22年度から新たに項目を起こした。

2. 研修・学会等

2.1 研修等参加

年 月 日	研 修 名	参 加 者	開催地
22.05.10～11	石綿位相差顕微鏡法研修（第1回）	佐々木純恵	埼玉県
22.05.12～21	平成22年度VOCs分析研修（水質）	小川千春	埼玉県
22.05.24～28	平成22年度環境放射能分析研修	菅原剛	千葉県
22.06.02～04	平成22年度食品安全行政講習会	天明さおり	東京都
22.06.29	環境大気中におけるアスベスト測定法セミナー	佐々木純恵	東京都
22.07.08～09	平成22年度先天性代謝異常症等検査技術者研修会	千葉真知子	東京都
22.08.06	食品衛生検査施設信頼性確保部門責任者研修会	佐藤信也 松渕亜希子	東京都
22.08.18～19	第23回東北食中毒研究会全体会議・研修会	齊藤志保子 八柳 潤	宮城県
22.08.21～22	日本水環境学会東北支部第6回環境基礎講座	和田佳久 成田修司 高橋英之 佐々木純恵	秋田市
22.09.09～10	第51回食品衛生・環境衛生監視員研修会	成田修司	青森県
22.09.24	平成22年度食品添加物研修会	佐藤晴美	東京都
22.09.29	水中1,4ジオキサンの新基準の動向と低コスト除去処理技術	小林貴司	東京都
22.10.14～15	平成22年度地方衛生研究所全国協議会北海道・東北・新潟支部衛生化学研究部会総会	菅 雅春 珍田尚俊	新潟県
22.10.18～29	平成22年度特定機器分析研修Ⅱ（LC/MS）（第2回）	天明さおり	埼玉県
22.10.30～31	平成22年度先天性代謝異常・内分泌疾患マス・スクリーニング基礎理論研修会	千葉真知子	東京都
22.11.01～02	平成22年度地方衛生研究所全国協議会北海道・東北・新潟支部公衆衛生情報研究部会総会	高階光榮 村山力則	岩手県
22.11.01～02	平成22年度地方衛生研究所全国協議会北海道・東北・新潟支部微生物研究部会総会・研修会	佐藤寛子 高橋志保	岩手県
22.12.09～10	平成22年度地域保健総合推進事業 北海道・東北・新潟ブロック専門家会議（微生物部門）－麻疹排除に向けて－	千葉真知子	岩手県
23.01.21	第56回日本水環境学会セミナー	成田修司 小川千春	東京都
23.01.24～02.04	水道クリプトスポリジウム試験法に係る技術研修	高橋志保	埼玉県
23.01.26	無機分析基礎セミナー	高橋英之	宮城県
23.02.22	2011 JEOL 食品分析セミナー	松田恵理子 松渕亜希子	東京都
23.02.24～25	希少感染症診断技術研修会	熊谷優子 佐藤寛子 今野貴之	東京都
23.02.25	平成22年度指定毒物分析研修会	天明さおり	東京都
23.02.25	元素分析基礎セミナー2011	佐々木純恵	神奈川県
23.03.05	日本マス・スクリーニング学会技術部会第29回研修会	安部真理子	広島県
23.03.05	八郎湖の水質改善と地域連携	藤島直司	秋田市

2.2 学会等出席

年 月 日	学 会 名	出 席 者 (○は演題発表者)	開催地
22.05.13～15	第99回食品衛生学会学術講演会	松田恵理子	東京都
22.05.25～26	衛生微生物技術協議会第31回研究会	齊藤志保子 八柳 潤 斎藤博之 佐藤寛子	鹿児島県
22.05.28～30	平成22年度日本農薬学会第35回大会	天明さおり	北海道
22.06.11～13	第18回ダニとインターフェースに関するセミナー	○佐藤寛子	新潟県
22.06.21～23	第19回環境化学討論会	玉田将文	愛知県
22.07.23	第59回東北公衆衛生学会	高山憲男 ○佐藤寛子 ○柴田ちひろ	山形県
22.08.19～20	第64回日本細菌学会東北支部総会	○今野貴之	宮城県
22.09.10～12	第19回日本ダニ学会	○佐藤寛子	宮城県
22.09.15～17	第100回食品衛生学会学術講演会	菅 雅春 松田恵理子 珍田尚俊	熊本県
22.10.02～03	第56回日本寄生虫学会・日本衛生動物学会北日本支部合同大会	○佐藤寛子	北海道
22.10.04～05	第33回農薬残留分析研究会	松田恵理子 天明さおり	千葉県
22.10.07	第8回秋田県公衆衛生学会学術大会	佐々木健二 ○岩谷金仁 ○田中貴子	秋田市
22.10.21～22	第59回日本感染症学会東日本地方会学術集会	○佐藤寛子 ○今野貴之	東京都
22.10.27～29	第69回日本公衆衛生学会総会	高山憲男 岩谷金仁	東京都
22.11.06	第22回ウイルス性下痢症研究会	斎藤博之	徳島県
22.11.07～09	第58回日本ウイルス学会	○斎藤博之	徳島県
22.11.11～12	第31回日本食品微生物学会学術総会	齊藤志保子 和田恵理子 ○斎藤博之 今野貴之	滋賀県
22.11.11～12	第47回全国衛生化学技術協議会年会	佐藤晴美 松渕亜希子	兵庫県
22.11.18～19	第32回全国地域保健師学術研究会	○田中貴子	富山県
22.11.25～26	第44回腸炎ビブリオシンポジウム	齊藤志保子 和田恵理子 八柳 潤 熊谷優子 高橋志保 今野貴之	秋田市
22.12.11～12	日本性感染症学会第23回学術大会	○佐藤寛子 ○柴田ちひろ	福岡県

23.01.20～21	第24回公衆衛生情報研究協議会総会・研究会	高階光榮 村山力則	愛知県
23.02.18	第26回日本環境感染学会総会	佐々木ひとみ	神奈川県
23.03.03～04	平成22年度地域保健総合推進事業発表会	村山力則	東京都
23.03.04	平成22年度全国結核対策推進会議	田中貴子	東京都
23.03.11	平成22年度放射能分析確認調査技術検討会	珍田尚俊 菅原 剛	東京都

2.3 健康環境センター主催研究発表会

開催日：平成22年6月14日（月）

開催場所：秋田県総合保健センター

	演 題 名	発表者
1	腸炎ビブリオの生鮮魚介類汚染状況とTDH陽性株の解析	八柳 潤
2	秋田県における下痢原性大腸菌分離状況とastA保有大腸菌の病原因子プロファイル	今野貴之
3	秋田県内における新型インフルエンザ（A/H1N1）流行状況について ーサーベイランスから得られた情報を基にー	村山力則
4	新型インフルエンザ（A/H1N1）発生に関連する初期対応の総括とウイルス学的サーベイランスに関する研究	斎藤博之
5	新生児マス・スクリーニング検査における平成21年度精密検査依頼事例について	安部真理子
6	秋田県内のスギ花粉飛散数測定調査結果(1999～2009年) について	高山憲男
7	γ線スペクトロメトリーを用いた環境放射能調査結果	珍田尚俊
8	八郎湖高濃度リン湧出地帯の自然湧出量とその発生源地下水の流向・流速調査	成田修司

2.4 その他の口頭発表

年月日	発表会名・演題名	発表者	開催地
22.11.13	あきた産学官連携フォーラム2010・第4回北東北地域イノベーションフォーラム ・秋田県における環境放射能水準調査 ・リン回収技術の八郎湖高濃度リン湧出水への応用	珍田尚俊 成田修司	秋田市
23.01.21	平成22年度保健環境業務研究発表会 ・秋田県におけるオキシダントの高濃度事例について ・2007/2008シーズンから2009/2010シーズンにおける感染性胃腸炎集団発生の疫学的解析 ・非定型的下痢原性大腸菌の紹介と県内散发下痢症患者からの分離状況 ・尿道炎患者の咽頭における性器クラミジアおよび淋菌の保有状況とうがい液の有用性の検討 ・秋田県における男性尿路・性器感染症患者の尿中HPV検出状況	児玉仁 佐々木ひとみ 今野貴之 佐藤寛子 柴田ちひろ	潟上市
23.01.31	平成22年度十和田湖環境保全会議 ・十和田湖の水質の現状について	高橋英之	小坂町

2.5 講師派遣等

2.5.1 技術支援

実施日	主な内容	講師氏名	対象	参加者数
22.04.01～09.30	水質検査研修	藤島直司	総合保健事業団職員	1
22.07.27～28	腸管ウイルス検査の技術指導	斎藤博之	秋田市保健所職員	3
22.09.09～12	新型薬剤耐性菌解析機能強化について	八柳 潤	地方衛生研究所細菌検査担当者	27
22.12.02～03	生カキ、拭取りからのノロウイルス検査の技術指導	斎藤博之	秋田市保健所職員	3
合 計				34

2.5.2 出前講座

講座名	講師氏名	実施回数	延べ参加者数
(No.42) 感染症の発生状況について	村山力則	1回	15名
(No.43) 油断できない結核	田中貴子	1回	39名
(No.45) ウイルス性食中毒について	斎藤博之	1回	25名
(No.46) ウイルス性感染症について	斎藤博之	2回	70名
	佐藤寛子	1回	30名
合 計		6回	179名

2.5.3 その他講師派遣

主な内容	実施日	講師氏名	依頼元	参加者数
平成21年結核登録者情報について	22.05.24	田中貴子	健康推進課	20名
古典型つつが虫病発生、野外調査によるアカツツガムシの生息確認とKato型 <i>Orientia tsutsugamushi</i> の分離	22.05.26	佐藤寛子	衛生微生物協議会第31回事務局	60名
仕事と研究～私の楽しみ方～	22.05.29	佐藤寛子	秋田県臨床検査技師会	50名
第35回薬学生と語る会	22.08.10	八柳 潤	秋田県薬剤師会	48名
特殊災害の概説・基礎知識－放射性物質災害－	22.08.16	斎藤博之	秋田県消防学校	85名
秋田県の古典型つつが虫の発生例とその関連情報	22.09.11	佐藤寛子	第19回日本ダニ学会仙台大会運営委員会	83名
個体の反応【生体と微生物】	22.09.13	八柳 潤	秋田大学医学部	100名
危険性物質等に係わる基礎知識及び関係法令－細菌・ウイルス災害－	22.10.04	斎藤博之	秋田県消防学校	13名
感染性胃腸炎の発生状況と施設における対策強化について	22.10.18	斎藤博之	雄勝地域振興局福祉環境部	29名
学校や家庭で気を付けたい感染症とその予防について	22.10.21	斎藤博之	秋田市立城東中学校	600名
最近話題の耐性菌～NDM-1を中心に～	22.11.06	八柳 潤	秋田県臨床検査技師会	60名
ノロウイルスの現状と予防対策	22.12.01	斎藤博之	秋田地域振興局福祉環境部	150名
合 計				1298名

2.6 視察・見学等受入

参加者区分	平成20年度	平成21年度	平成22年度
小・中学生	1 (1)	0	0
インターンシップ	13 (2)	7 (2)	10 (2)
その他の学生	12 (1)	31 (3)	14 (1)
一般県民	0	15 (1)	0
業務関係者(医師臨床研修含む)	1 (1)	25 (5)	1 (1)
県外	0	0	3 (1)
国外	0	7 (1)	9 (2)
合計	27 (5)	85 (12)	37 (7)

注) 括弧内の数字は団体数

2.7 海外視察・研修派遣

派遣期間	派遣先	事業名	参加者	内容
22.10.11～17	中国吉林省	秋田県環日本海交流推進協議会 環境交流部会事業	和田佳久	<ul style="list-style-type: none"> 中国吉林省の環境保全対策に対する情報交換等 環境保全等に関する講演 「秋田県の環境・文化の紹介」

2.8 受賞・表彰等

受賞日	表彰名	受賞者	授与機関
H22.5.27	平成22年度全国環境研協議会北海道・東北支部長表彰	菅 雅春	全国環境研協議会北海道・東北支部

3. 研究業務実績

健康科学・管理班

高血圧対策のための食パターン分析に関する研究

(平成 21 年度～平成 22 年度)

研究概要

日本人の 3 大死因のうち、心疾患と脳血管疾患には高血圧が大きな危険因子として関与している。秋田県は、高血圧症有病者の割合が高く、健康秋田 21 計画では平成 24 年度までに高血圧症有病者を 10%以上減少することを目標に掲げている。本研究では、血圧と食パターンとの関連性を明らかにし、高血圧予防のための食生活改善方法を検討することを目的として、平成 22 年度は横手市増田地域の特定健診受診者を対象に、BDHQ(簡易型自記式食事歴法質問票: Brief-type self-administered Diet History Questionnaire)による食習慣調査を行った。解析は平成 21 年度の調査者を加え、20～74 歳までの男女 1,224 名を対象とした。

結果

日本高血圧学会の分類による「正常高値血圧」以上の者(要指導群)は、男性全体では 50.7%、女性全体では 33.6%であり、年代が上がるにつれて高率であった。血圧に影響するとされる食塩摂取量も年代が上がるにつれて多かった。

性別、年代別(20～39 歳と 40 歳以上)で検討したところ、どの区分においても食塩摂取量 10g 以上の者は、10g 未満の者に比べ「主菜」、「副菜」の摂取量が多く、特に魚と肉の煮物の摂取頻度が高かったが、「主食」の摂取量は少ない傾向にあった。さらに血圧区分別にみると女性の 40 歳以上で正常血圧群は要指導群に比べ「副菜」の摂取量が有意に高かった($p<0.05$)。BMI(肥満指数)は、女性の 20～39 歳を除き、要指導群の者は正常群に比べて高く、肥満改善が高血圧対策に有効であると思われた。

調査結果は健診の結果説明会において、対象者個々にあわせた疾病別資料を加えて個人に返却するとともに、関係機関に「横手市増田地域局における食習慣調査報告書」として報告し、保健指導に活用された。また、BDHQによる調

査は、対象者の負担が少なく簡便に食事状況を把握する方法であり、横手市では今後市全体を対象とした食事調査に導入する方向である。

詳細は本誌 P.25～32 に報告する。

細菌班

Penner 法および Lior 法によるカンピロバクター血清型別成績と薬剤耐性菌の検出状況(地方衛生研究所技術協議会カンピロバクターレファレンスセンター業務)

(平成元年度～)

研究概要

地方衛生研究所技術協議会のカンピロバクターレファレンスセンター支部として北海道・東北・新潟ブロックからのカンピロバクター分離株の血清型別依頼に対応している。また、県内の散発患者由来株を含め、分離株については、Penner 法と Lior 法による血清型別法の比較検討を行っている。さらに、薬剤耐性化の傾向を把握するため、分離株については、テトラサイクリン、エリスロマイシン、ナリジクス酸、ノルフロキサシン、オフロキサキン、シプロフロキサシンの 6 剤について、感受性試験を実施している。

平成 22 年度に関しては、他県からの血清型別依頼はなかったが、県内の散発下痢症患者由来の 55 株(*C. jejuni* 52 株, *C. coli* 3 株)について Penner 法と Lior 法の比較を行った。さらに、47 株(*C. jejuni* 44 株, *C. coli* 3 株)について感受性試験を実施した。また、同様にして厚生労働省からの依頼で行っている食品の汚染実態調査において鶏肉から分離された 12 株、および県内で発生した 2 件の集団食中毒事例に由来する 19 株についても検査を実施した。

結果

散発下痢症患者由来の *C. jejuni* 52 株のうち、Penner 法で単一の血清型に型別可能であったものは 35 株(67.3%)、Lior 法では 32 株(61.5%)であった。*C. coli* に関してはいずれの方法でも単一血清型には型別できなかった。

また、散発下痢症患者由来の *C. jejuni* 44 株中 21 株(47.7%)、*C. coli* 3 株中 1 株(33.3%)は

キノロン系薬剤に耐性を示した。また、*C. jejuni* では1株がエリスロマイシンに耐性を示した。*C. jejuni* におけるキノロン系薬剤への耐性は、例年30～40%程度であることから耐性化が進行していることが危惧された。また、鶏肉由来株でも同程度の耐性率がみられたことから、鶏はカンピロバクターの汚染源としてだけでなく、耐性菌制御の観点からも重要であることが示唆された。

LAMP法による百日咳迅速診断の実施状況と検査結果の概要（地方衛生研究所技術協議会百日咳・ジフテリア・ボツリヌスレファレンスセンター業務）

（平成15年度～）

研究概要

百日咳は、特有のけいれん性の咳発作を特徴とする急性気道感染症である。当センターは、県内の百日咳対策に資するために、地方衛生研究所技術協議会百日咳・ジフテリア・ボツリヌスレファレンスセンター業務の一環としてLAMP法による百日咳検査法を導入し、健康推進課と連携して県内の医療機関からの検査依頼に対応する体制を確立した。一方、平成22年5月以降、全国的に百日咳様臨床症状を呈する疾患が流行した。全国のレファレンスセンターにおける検査結果では、これらの患者は百日咳、マイコプラズマ共に陰性であった。このため、国立感染症研究所と連携して、これらの患者にどのような呼吸器系病原微生物が関与しているか、各種呼吸器系病原微生物検出用のリアルタイムPCR法を導入して検討した。

結果

平成20年8月22日から平成23年3月29日までに送付された192検体中、17検体がLAMP法で百日咳菌陽性であった。また、平成21年5月15日以降の82検体について、百日咳菌に加えてマイコプラズマ (*M. pneumoniae*) もLAMP法で検出を試み、1検体がマイコプラズマ陽性であった。

一方、他県で発生した百日咳様集団事例について原因微生物を検索した結果、RSV、HMPV、PIVは全て陰性であり、一部の集団事例に

Bocavirus やRhinovirus が関与しているとする知見が得られたが、原因微生物不明の事例が多数であった。一方、県内で発生した百日咳菌・マイコプラズマ陰性の散発患者の一部にBocavirus やRSV陽性者が認められた。平成22年6月に県内で発生した集団事例は百日咳菌、マイコプラズマ、RSV、HMPV、PIVが全て陰性であり、一部の患者からBocavirus が検出されたが、集団感染の原因と考えられる微生物を特定することはできなかった。

これらの結果は、百日咳様疾患に他種類の病原微生物が関与することを示唆しており、原因微生物不明の百日咳様疾患に関与する微生物を特定することが今後の課題である。レファレンスセンターでは今後、九州地方で発生した原因不明集団事例において病原微生物と考えられた *Bordetella pertussis* が関与する可能性について検討する予定である。

地方衛生研究所における薬剤耐性菌等に関する細菌学的、疫学的調査研究解析機能の強化に関する研究（厚生労働科学研究費補助金「新型薬剤耐性菌等に関する研究」）

（平成18年度～平成24年度）

研究概要

食中毒原因菌や感染症原因菌とは異なり、地方衛生研究所においては薬剤耐性菌の検査や研究を実施する機会がこれまでは少なく、検査・解析技術の機能強化が課題となっている。本研究は厚生労働科学研究として国立感染症研究所と連携して実施した事業であり、地方衛生研究所細菌検査担当者を対象として薬剤耐性菌の検査・解析技術研修を実施すると共に、薬剤耐性菌の耐性機構等に関する調査研究を実施した。

結果

地方衛生研究所細菌検査担当者27名を対象に、国立感染症研究所村山庁舎においてVRE、MRSA等の検査・解析技術の研修と、NDM-1等の講義を実施した。当センターはVREのvan遺伝子検出用PCRのデザイン、コラボによるPCRの精度確認、そして研修の実務を担当した。

一方、臨床的に注目されているCTX-M型ESBL（基質拡張型βラクタマーゼ）産生菌の感

染源に関する検討を実施した。秋田市内で購入した市販鶏肉 10 検体について CTX-M 型 ESBL 産生菌を検索した結果、CTX-M2 保有大腸菌 1 株と、CTX-M1 バリエーションを保有するクルイベラ属菌 (*K. cryocrescens*) 2 株を分離した。これら 2 株の染色体 DNA をクローニングし、CTX-M1 遺伝子周辺の遺伝子をシーケンス・解析した結果、これらの株では CTX-M 遺伝子の発現に関与する ISEcp1 遺伝子を保有しないこと、また、ISEcp1 遺伝子の認識部位とされる IRR が存在すること等の遺伝子的な特徴が明らかとなった。以上の結果は、秋田県において鶏肉が CTX-M 型遺伝子保有株に汚染されていることを初めて示すものであり、また、クルイベラ属細菌が CTX-M 型遺伝子の起源であるとの仮説を支持するものであった。一方、今回分離された 2 株の *K. cryocrescens* が保有していた CTX-M 遺伝子のシーケンスが、いずれもこれまでに報告のない新しい型であったことは、クルイベラ属菌の染色体が CTX-M 遺伝子のジーンプールとなっている可能性を示すものと考えられ、興味深い。最近、秋田県においても分子進化した CTX-M 遺伝子である CTX-M15 型 ESBL 産生菌が分離されており、鶏肉が CTX-M15 型 ESBL 産生菌の感染源となっている可能性について検討することが今後の課題である。

食中毒対応のための非定型的下痢原性大腸菌侵淫実態の解明

(平成 21 年度～平成 22 年度)

研究概要

下痢原性大腸菌は、病原性の違いにより腸管出血性大腸菌、腸管病原性大腸菌、腸管侵入性大腸菌、毒素原性大腸菌、腸管集合性大腸菌の 5 つに大別される。しかしながら、最近の研究により必ずしも上記の 5 つにあてはまらない下痢原性を持つ大腸菌の存在が示唆されている。これらの非定型な下痢原性大腸菌によって食中毒等が発生した場合には、原因不明となり適切な衛生改善指導や医療機関における治療法の選択等に支障をきたす可能性があることから問題となっている。

平成 22 年度は、昨年度に引き続き *astA* 保有

大腸菌に関して、病原因子の保有状況を調査した。また、平成 22 年に県内で分離された菌株 769 株を対象に分散接着性大腸菌および細胞剥脱性大腸菌の侵淫実態を調査した。

結果

平成 19 年から平成 21 年にかけて、秋田県内の医療機関から分与された散発下痢症患者由来の下痢原性大腸菌疑い株において確認された *astA* 保有大腸菌 35 株について、16 種類の病原因子 (*iha*, *lpfA*, *ldaG*, *pilS*, *shf*, *pic*, *pet*, *irp2*, *daa*, *afa*, *aah*, *aid*, *cdtB*, *pap*, *sfa* および *hlyA*) の保有状況を明らかにした。本調査研究により、35 株中 4 株で *iha*, 18 株で *lpfA*, 7 株で *pilS*, 2 株で *pic*, 24 株で *irp2*, 1 株で *aah*, 9 株で *pap*, 4 株で *sfa*, 3 株で *hlyA* が確認された。

分散接着性大腸菌および細胞剥脱性大腸菌に関しては、769 株のうち溶血性の確認された 55 株を対象に共通の病原因子である *hlyA* の検出を行い、28 株についてその保有を確認した。しかしながら、その 28 株については特徴的な病原因子である *daa*, *aid* および *cdtB* は検出されず、分散接着性大腸菌および細胞剥脱性大腸菌に該当する菌株は確認されなかった。

結核菌の塩基配列に基づいた分子疫学解析法と薬剤耐性の迅速検査法の確立

(平成 22 年度～平成 23 年度)

研究概要

平成 22 年度の秋田県における新登録結核患者のうち他者に感染させる危険性が高い喀痰塗抹陽性者は年間約 60 名で横ばい状態にあり、継続した対策が必要である。結核菌の分子疫学解析は、感染拡大防止の取り組みを支援する。結核菌の分子疫学的性状の解析手法としては RFLP 分析法が普及しているが、データの比較とデータベース化が困難であるという問題がある。一方、国内には結核治療の障害となる薬剤耐性結核菌が一定数存在している。本研究は、結核分子疫学解析技術である JATA12-VNTR 法を導入し、データベースを構築すること及び耐性遺伝子の DNA シーケンス変異を指標にした、薬剤耐性結核菌の迅速診断法を導入することを目的として実施した。

結果

結核菌の分子疫学的解析法として JATA12-VNTR 法を試行した。検体には RFLP 分析用に調製・保存しておいた DNA 溶液 56 検体を供試した。

リファンピシンに対する耐性の有無を迅速確実に判定するための遺伝子診断法について検討した。リファンピシン耐性に関与する rpoB 遺伝子内部の 81 bp hot spot の DNA シークエンスを決定するために、365 bp を増幅する rpo105 と rpoBPR7 プライマーを使用し、シークエンスプライマーに PR17 を使用した。検体には、保存 DNA 溶液 31 検体を供試した。

56 検体の DNA 溶液全てから JATA12-VNTR 法によりプロファイルを算定可能であった。しかし、locus の繰り返しナンバを電気泳動のみにより決定することには困難な場合もあった。なお、JATA12-VNTR 法は 4 時間以内に実施可能であり、RFLP 分析と比較すると著しく迅速である。

一方、31 株についてリファンピシン耐性遺伝子のシークエンスを決定したところ、既知の耐性変異を示す株は確認されなかった。臨床現場においてリファンピシン耐性の有無をできるだけ早く知ることは、薬剤耐性結核の拡散防止上も非常に重要である。今回実施した方法によると、リファンピシン耐性変異の有無を早い場合は翌日、遅くても数日以内に決定することが可能であり、従来の培養法では 2 週間程度の期間を要することと比較すると、著しく迅速であるといえる。

今後も県内分離株を供して JATA12-VNTR のデータと耐性遺伝子のシークエンスデータを継続して蓄積する必要がある。

ウイルス班

我が国におけるスクリーニング外部精度管理システムへのブラインドサンプル導入の検討（厚生労働科学研究費補助金「タンドムマス等の新技術を導入した新しい新生児マス・スクリーニング体制の確立に関する研究」）

（平成 19 年度～平成 22 年度）

研究概要

本研究は、効果的な外部精度管理のひとつとしてブラインドサンプル（BS）の導入が可能かどうか検討するため、（財）日本公衆衛生協会と国立成育医療研究センターが産婦人科医会了承のもとで実施している。従来送付されている外部精度管理検体とは異なり、不定期に BS が送付され、後日、その旨が知らされるシステムである。全国 45 検査施設中 13 施設が自主的に参加している。

結果

平成 22 年度は 2 回 BS が送付され、内訳は正常検体 1 件、フェニルアラニン異常値検体 1 件であり、2 件ともに期待値と一致した。BS 送付医療機関は 2 ヶ所以上設定することが望ましいとされているが、秋田県では秋田大学医学部附属病院小児科の 1 ヶ所のみである。検査以前に BS 検体と見抜いてしまう可能性については、この医療機関からの受付数は年間約 430 検体であり、そのうち BS は 2 件のみであったことから、検査時に BS と意識して検査されることはなかった。

患児の見逃しを予防するために BS の全国展開を目標とする本研究は、当初の目的に加えて全国のスクリーニング施設の実情把握や各施設における検査精度の保証、関係機関の連携強化の契機になったというメリットの報告があった。だが、現時点では、自治体や施設ごとの検査システムの違い等により、画一的 BS の導入には困難があるとの結論であった。

咽頭と性器からのクラミジアと淋菌の検出法の検討、及び地方における浸淫実態に関する研究（大同生命厚生事業団「地域保健福祉研究助成」事業）

（平成 21 年度～平成 22 年度）

研究概要

近年の性交渉の多様化と低年齢化により、性感染症が若年層を中心に急激に増えてきている。また、最近になって淋菌（NG）や性器クラミジア（CT）の咽頭感染が注目されているが、男女共に症状に乏しいため、これも性感染症拡大の一因とされている。しかし、感染症法に基

づく感染症発生動向調査の一項目である性感染症は、全数把握ではなく、特に地方においては定点観測病院の設定によっては偏りが大きい。このため、その統計は浸淫状況を適切に反映しているとは言い難く、さらに咽頭感染については調査対象に含まれていないため、現在、その実態は不明である。しかしながら、地方在住の若年者への性教育・性感染症予防教育の場においては、身近で活用しやすい教材となる地元のデータが必要と思われる。そのため、本研究は、NGとCTについて、性器及び咽頭感染の実態調査を行い、地方における性教育のための基礎的資料を作成することを目的とした。さらに、現在、咽頭の検体としては綿棒による擦過物が主に用いられているが、採取時に患者負担が少ないうがい液が日本性感染症学会等で注目され、推奨されている。本研究では、うがい液中の病原体をリアルタイムPCRにより定量解析し、その有用性についても検討した。

結果

男性における調査では、尿検体のNG陽性率が25.8%、CTが37.5%で重複例は12.5%であり、CTの陽性率が有意に高い結果となった。尿道炎の原因はNGが約30%、CTが30~40%であるとされており、今回の調査においても同様の傾向が認められた。一方、咽頭検体ではNGとCTの陽性率10.8%と5.8%に有意差は認められなかった。

次にOral sexとNG・CT感染の関連性については、尿検体ではOral sexを患者が行ったA群97例中の陽性率52.6%とパートナーが行ったB群18例中の陽性率50.0%に有意差は認められず、咽頭検体でも陽性率16.5%と16.7%に有意差は認められなかった。また、病原体別での比較でもA群とB群のNGとCTの陽性率に有意差は認められなかった。

女性における調査では、検査対象者数が男性よりも少数であったことに加え、妊婦健診者が71.6% (48/67) を占めていたことから、男性の結果と比較し、陽性率が全ての検体において低い結果であった。そのため、今回の調査結果のみでは判断できかねる部分もある。しかし、例数は少ないものの、陽性率が子宮頸管スワブではNGよりCTの方が高かったこと、咽頭検体ではCTよりNGの方が高かったことは大都市

圏と同じ傾向であった。

咽頭からの検体採取法の比較では、うがい液は咽頭スワブよりも検出数が多く、陽性検体の平均コピー数はうがい液が咽頭スワブよりも 10^3 copies/ml高かった。このことから、患者の負担軽減の面からも、うがい液を検体として利用の方が有用であると考えられた。

詳細は本誌 p.70~76 に報告する。

リケッチアを中心としたダニ媒介性細菌感染症に関係するダニ類の実態調査（厚生労働科学研究費補助金「リケッチアを中心としたダニ媒介性細菌感染症の総合的対策に関する研究」）

（平成21年度～平成23年度）

研究概要

アカツツガムは近年絶滅したと推察されていたが、2008年8月、大仙市大曲で本県においては15年ぶりとなるアカツツガムシ媒介性つつが虫病患者が発生した。これを受け、翌2009年から感染推定地含む当該地域の雄物川流域を調査したところ、アカツツガムシの生息を確認し、捕獲した野鼠脾臓から病原体であるKato型*Orientia tsutsugamush* (Ot)を分離した。また、アカツツガムシは毎年8月に全国的に有名なイベントが開催される河川敷公園でも確認された。このイベント会場での感染が疑われるつつが虫病患者が1993年までに19名届出されている。そのため、つつが虫病に馴染みのない地方からの観光客を健康被害から守るため、つつが虫病啓発活動を行った。さらに、大仙市からの要望により薬剤によるツツガムシ防除試験を実施した。また、過去に大曲の他、雄勝地方の雄物川流域でもアカツツガムシ媒介性つつが虫病患者が多数届出されていることから、現在の実態把握を目的に調査を実施した。加えて2009年、商業検査機関が実施しているOt標準3抗原による検査ではつつが虫病と判定できないShimokoshi型Ot感染例が、湯沢市で確認された。このことから、医療機関へ検査に関する啓発とまだ明らかにされていないベクターの把握を目的に感染推定地点の調査を予備的に実施した。

結果

大曲のイベント会場における啓発は、イベント案内パンフレットおよびホームページ、大仙市ホームページにそれぞれつつが虫病に関する情報を提供することとした。さらに、須藤恒久秋田大学名誉教授の協力により、県健康推進課発行のつつが虫病のしおりへ夏季のつつが虫病の記載、加えて日本医師会、秋田県および秋田市医師会の会報に夏季のつつが虫病が再燃したことの警告文が掲載された。また、河川敷公園周辺の調査では、地表面にアカツツガムシが確認できたものの、21年度よりははるかに少数であった。しかし、少ないながらもアカツツガムシは10月上旬まで確認された。アカツツガムシが昨年よりも少数であったのは、22年度は記録的な猛暑であったため、ツツガムシの活動が前年とは異なった様相であった可能性も考えられた。また、調査期間中に横手市雄物川町で9月29日に発症したKato型Ot感染例が新たに確認された。Kato型の症例としては最も遅い発症月日であったが、今回、10月上旬までアカツツガムシの生息が確認できたことから、今後も注視する必要がある。さらに、今回の調査ではアカツツガムシの他、フトゲツツガムシの生息が確認された。この種の活動期は春秋が活動期であるが、本県では夏季にKarp型の抗体が有意に高いつつが虫病患者が確認されており、夏季活動性のフトゲツツガムシとの関連が考えられる。以上のことから、本県では積雪のある冬季を除く3シーズンに渡ってつつが虫感染の危険性があることが再確認され、啓発と警告を継続することが重要であると思われた。

Shimokoshi型Ot感染例の感染推定地における調査は野鼠捕獲を中心に実施した。捕獲したアカネズミ27匹、ハタネズミ1匹に寄生していたツツガムシ種はヒゲツツガムシ196、フトゲツツガムシ78、フジツツガムシ25、アラトツツガムシ6であった。血清抗体は7匹が陽性で、その内2匹が高いShimokoshi型の抗体価を保有しており、Shimokoshi型Otを媒介するツツガムシの存在の裏付けとなった。また、アカネズミ1匹の脾臓からKarp型Otを分離し、当該地における有毒ツツガムシの生息も明らかとなった。

新型インフルエンザウイルスのタミフル耐性鑑別法の開発とその応用

(平成22年度～平成23年度)

研究概要

インフルエンザの治療薬であるタミフル(リン酸オセルタミビル)は、世界の在庫の7割を我が国が保有している。そのため、耐性ウイルスの出現状況のモニタリングが国からの依頼で各都道府県において行われている。具体的には新型インフルエンザウイルスのノイラミニダーゼ遺伝子上のH275Y変異(C→Tへの一塩基置換)を耐性マーカーとして検出することが求められており、本研究の目的はこの一塩基置換を簡便に調べる方法を開発することである。また応用として、他の型のインフルエンザへの適用(A香港型のE119V変異、及びR292K変異)も目指している。具体的な方法として、上記の変異部位を境界とした、オリゴヌクレオチドを合成し、それらをDNA Ligaseで結合させるLCR(Ligase Chain Reaction)を基本原理とした反応系を開発した。結合反応が成立するためには、合成オリゴヌクレオチドの末端が抽出したインフルエンザウイルスの塩基配列とペアになることが必要である。従って、一塩基置換によって末端がミスマッチになると結合が起らないため、反応生成物を電気泳動で分析することで変異の有無を判定できる。

結果

平成22年度に新型インフルエンザウイルスが検出された71検体について本法を試みたところ、H275Y変異が認められたもの1検体、変異のあるウイルスと無いウイルスが混ざっていたもの1検体が見つかった。これらの2検体に含まれるウイルスのノイラミニダーゼ遺伝子の配列を決定したところ、本研究で開発した方法によって正しく鑑別されていることが証明された。特に2種類が混合している検体においては、遺伝子配列を直接決定するやり方では分析機器のピークが重なって判定が困難になる場合があるため、本法の方が有利となる。

A香港型については46検体を調べたが耐性マーカーに相当する変異を有するウイルスは検出されず、全てタミフル感受性のウイルスであった。

食品中のウイルス検査実施に向けてのパンソルビン・トラップ法の汎用化（厚生労働科学研究費補助金「食品中の病原ウイルスのリスク管理に関する研究」）

（平成 22 年度～平成 24 年度）

研究概要

平成 21 年度まで実施された厚生労働科学研究事業において、ノロウイルス GII/4 型とそれに対するウサギ抗血清を用いた汚染回収モデルにより、固形・液状・練り物・油物など、どのような食品でもウイルス検査が可能となる、パンソルビン・トラップ法を開発した。22 年度の研究事業では、下痢症ウイルス全般に対応した方法とするため、添加する抗体について検討を加えた。添加抗体の供給源として、感染者血清、ヒトプール血清（市販品）、及びガンマグロブリン製剤（市販品）を用い、ノロウイルス、サポウイルス、A 型肝炎ウイルス、アデノウイルス 41 型の回収効率を比較した。市販ヒトプール血清は 10 種類の製造ロットについて検討した。また、ガンマグロブリン製剤は国内製 2 種類（「化血研」、及び「日本製薬」）、外国製 2 種類（「Bharglob」、及び「Gammagard」）について検討した。

結果

ノロウイルス GII/4 型のように大規模な流行がみられるウイルスについては、どのような供給源由来の抗体であっても、回収効率は 30～50%で安定していたが、流行が少ないウイルスに対してはヒトプール血清のロット間差が認められた。ヒトプール血清は 10～20 人の血清を混合して販売されているが、抗体保有量の個体差を平準化するには至っていないと考えられた。ガンマグロブリン製剤については、1 万人単位の血漿プールから製造されるためこのような個体差を考慮する必要は無く、特に外国製品は売血制度のもとで製造されていることから抗体保有量も多いと予想される。本研究で用いたガンマグロブリン製剤の中で、「Gammagard」（米 Baxter 社製）が各種ウイルスに対してバランスの良い反応性を示した。結果として、ノロウイルスでは 12 遺伝子型（GII/2, GII/3, GII/4, GII/5, GII/6, GII/12, GII/13, GII/18, GI/3, GI/4, GI/8, GI/9）、サポウイルスでは 4 種類全ての型、他

に A 型肝炎とアデノウイルス 41 型において有効であることを確認した。一方で、患者の回復期血清を利用することで限定的な局面における流行事例に対応できることが示唆された。このことは、流通食品が汚染された場合などに原因を突き止めて、必要に応じて回収命令を出すなどの対応を可能にするものと考えられた。

食品理化学班

健康危機管理に対応した食品中の化学物質検査体制の基盤強化に関する研究

（平成 21 年度～平成 23 年度）

研究概要

中国製冷凍餃子による中毒事件をはじめとする食の安全を脅かす事件が相次ぎ、県民の食への不安が増大している。健康危機管理上、食中毒の原因である未知の化学物質を迅速かつ的確に特定できる体制を整備することが急務である。加えて、ポジティブリスト制の施行に伴い、基準が設定された農薬項目数が大幅に増大したことから、残留農薬分析の検査体制の強化が課題となった。食品中の残留農薬等を効率的かつ、迅速に分析するためには、一斉分析法の検討が不可欠であり、さらに、食の安全を脅かす事態に対応するためには精度を確保した分析体制の整備を図っていかなければならない。そのうえで分析可能項目数と分析可能な作物数の増加を目指す。一方で、広域的な食品への毒物混入事件などでは、正確な情報の入手と共有化が鍵を握ることになるため、北東北 3 県で残留農薬等について、情報交換してリストを作成し、緊急時の協力体制を構築する。

結果

冷凍餃子の残留農薬一斉分析法の検討を実施した。4 種の C18 固相カラムの溶離条件を検討した後、最適なカラムを用いて添加回収試験を実施した。294 農薬を試料あたり 10 ng/g, 50 ng/g となるように添加し、添加回収試験をおこなった（繰り返し試験数=3）。平均回収率 70～120%、添加濃度により相対標準偏差（RSD）が 15% 及び 25%を良好な回収率と評価すると、10 ng/g 添加では 294 農薬中 253 農薬で、50 ng/g 添加では 294 農薬中 262 農薬で良好な回収結果が得ら

れた。脂肪を多く含む冷凍餃子においても、C18固相カラムで脱脂することにより、一律基準（10 ng/g）レベルで迅速かつ高精度の残留農薬一斉分析が可能となった。

鶏肉、豚肉、牛肉、さけ、エビ、鶏肝臓、牛乳、鶏卵、ウナギ蒲焼について、99種の動物用医薬品の一斉分析法を検討した。除タンパクし、Oasis HLBで抽出後、Monospin TiOでリン脂質を精製する操作を加えることにより、いずれの食品でも、良好な回収結果が得られる項目が増加した。

特用林産物の秋田ブランド化並びに機能性と安全性に関する研究（森林技術センターとの共同研究）

（平成21年度～平成23年度）

研究概要

松くい虫による松枯れ病を防止するために、秋田県内の松林ではネオニコチノイド系農薬のアセタミプリド、チアクロプリドが散布されている。これらの農薬は、自然に分解されるように設計されているが、環境中での挙動に関する調査は少ない。特に、松林に生育するキノコや山菜など特用林産物への影響についての調査は皆無である。そこで、松林中の土壌やキノコについて農薬残留量の変動を調査し、環境や特用林産物について安全性の確認を行う。

結果

平成21、22年の6～11月の期間、日本海沿岸の松林5地点の土壌に含まれる農薬残留量を調査した。試料採取は、林中が落葉で被覆されている状況を考慮し、深さ別（被覆物、表土～5 cm、5～7 cm土壌）で3分画し、5地点混合方式で行った。測定の結果、アセタミプリド、チアクロプリドともに、土壌に含まれる割合は被覆物の1～2%程度であり、散布された農薬の大部分は被覆物中に残留していた。チアクロプリドが散布されたにかほ市金浦での被覆物中チアクロプリド濃度は、6月下旬の散布直後から7月中旬にかけて最大値1000 ng/g-dryを示し、7月下旬から減少傾向となり、11月には56～150 ng/g-dryまで減少した。また、チアクロプリドの分解物であるアミド体は、チアクロプリドよ

り少し遅れ、7月中旬から下旬にかけて最大値940～970 ng/g-dryを示した。アミド体も7月下旬から減少傾向となるが、11月には150～570 ng/g-dryであり、一冬を越した平成22年6月の農薬散布直前においても、270 ng/g-dryの濃度を示しており、チアクロプリドに比べアミド体のほうが、環境中への残留性がやや高いようであった。アセタミプリドが散布された秋田市飯島での被覆物中アセタミプリド濃度は、散布2日後に最大値1100 ng/g-dryを示し、以後緩やかに減少し、9月下旬には10 ng/g-dryまで減少した。チアクロプリドに比べアセタミプリドは、環境中への残留性は低い傾向であった。

平成21、22年の調査期間、松林で採取されたキノコについても、農薬残留量の調査を行っている。これについては、安全性の評価を含めて、平成23年度に解析を行う予定である。

環境理化学班

緊急時の危機管理に活用する迅速・簡便な有害化学物質の分析法の改良・開発に関する研究（秋田県立大学との共同研究）

（平成20年度～平成22年度）

研究概要

本研究の目的は、有害化学物質による食品や環境等の汚染事故が発生した緊急時において、その汚染状況を既存の分析法よりも迅速・簡便に把握可能な分析法を構築することである。今回、当センターで既に確立されている分析技術（試料前処理時の抽出・精製および測定技術）に対し、新たな測定技術として①生物検定法、および②TLC/DART-TOFMS法を組み合わせることで、より迅速・簡便な分析法を検討し、その実用性の評価を行った。

結果

① 生物検定法

土壌試料中ダイオキシン類に対して、生物検定法の検討を行った。試料の抽出には、ダイオキシン類の迅速な前処理法として確立している高速溶媒抽出法を用いた。生物検定法と公定法（精密機器分析法）で算出した毒性等価換算濃度を比較した結果、環境指針値（250 pg-TEQ/g）

レベルの土壌試料では、2倍程度の差に収まり、スクリーニング技術として本法の有効性が示された。また、公定法では測定から毒性等量の算出まで約1週間要していたが、本法では約半日となり、大幅に時間を短縮することができた。

②TLC/DART-TOFMS (薄層クロマトグラフ/リアルタイム直接分析-飛行時間型質量分析) 法

食品および環境試料中の5種類の有機リン農薬(メタミドホス, アセフェート, フェニトロチオン, EPN, ダイアジノン)をモデル化合物として、TLC/DART-TOFMS法の検討を行った。試料の抽出には高速溶媒抽出法、精製技術には新たにTLCを導入した。TLC/DART-TOFMS法と既法での添加回収率を比較した結果、メタミドホスを除いて100±20%以内でほぼ一致した。さらに、公定法では測定から評価値の算出まで約2日を要していたが、本法では約30分となり、大幅に時間を短縮することができた。また、本法は既存のGC/MS/MS法とほぼ同等の結果を得られた。

当センターで確立された抽出・精製技術と新たな測定法を組み合わせることによって、既法と同程度の精度を維持しつつ、分析時間を大幅に短縮できたことから、緊急時の危機管理に活用する分析法としての有効性が示された。

環境保全班

玉川源泉の酸度上昇にも対応した実証的中和処理技術の開発とその対策がもたらす水質改善効果

(平成22年度～平成24年度)

研究概要

近年、玉川源泉の酸度上昇に伴い、中和処理施設周辺の玉川上流部の渋黒川で観測されているpH低下の原因は、潜在的酸性成分を含む源泉の混入した強酸性水が渋黒川に流入することで生じていることを当センターが行った平成20年度～21年度の研究で明らかにしてきた。そこで本研究では、中和処理施設周辺の酸性水に対して、酸度上昇時においても、効率的に酸性を弱め、田沢湖における中和事業の水質管理目標pH6を達成するための中和技術の開発を目指

す。具体的な内容の一つは、廃棄物であるホタテ貝の貝殻等を原料とし、中和効率の高い中和材の開発とそれらをフィールドへ適用する技術開発、もう一つは、pH改善を目的とした中和・酸性水対策に伴う、玉川上流部におけるAs等の重金属の動態調査を実施し、副次的な水質改善効果について検証を行うこととしている。これと関連して、秋田県立大学の宮田准教授のグループと研究課題名「玉川温泉下流域の金属元素動態に係わる微生物群集の機能解析(平成22年度)」について、共同研究を行った。

平成22年度は、源泉及び中和処理放流水等の調査を実施し、中和処理による水質改善効果の検討を行った。また、廃棄物である貝殻等を原料とした中和効率の高い中和材の開発とそれらを玉川上流部の酸性水に適用する場合のシステムについての検討も行った。

結果

上記の調査を行っている過程で、中和処理施設放流口にはヒ素等の吸着材として知られているシュベルトマナイト様化合物が生成・堆積していることが秋田大学との共同研究で明らかになった。その結果、源泉中にはヒ素(3 mg/L)が存在するが、上記のシュベルトマナイト様化合物に吸着除去されることによって、中和処理水では同元素は不検出となった。この結果は、pHを改善することを目的とした中和処理の副次的効果といえる。また、中和効率の高い中和材の開発では、貝殻中の炭酸カルシウムを酸化カルシウムに転換することを狙い、950～1000℃で条件をいくつか設定し、焼成を行った。その結果、玉川上流部の酸性水(1L)に対して1gの中和材を投入することで、pHを本研究の目標であるpH3程度まで、わずか数十秒で到達させることができる中和材の開発に成功した。この中和材を現地フィールドに適用させるため、中和材を粉砕して水と混合し、乳化状にすることにより中和を高効率化し、それを酸性河川に混入させ中和を行うシステムを考案した。

秋田県立大との共同研究では、中和処理施設下流の五十曲(pH3)の河川底質から検出された細菌群と、より酸性の強い上流地点の湯川(pH2)の河川底質から検出された細菌群では、その組成が大きく異なることが明らかとなった。

湖沼生態系の持続的管理手法の開発に関する研究

(平成 22 年度～平成 24 年度)

研究概要

(独) 国立環境研究所の地方公共団体環境研究機関等との共同研究課題募集に応募したもので、同研究所、岡山県環境保健センター、名古屋市環境科学研究所の共同研究であり、神戸大学の研究者をアドバイザーとしている。生態系操作は、1980 年代に欧米を中心に応用されるようになり、我が国でも'00～'03 年に長野県の白樺湖で行われた試験における透明度の改善が花里孝幸により報告され、近年では諏訪湖においてもアオコ対策の一つとして検討されるなど、新たな技術として注目されるようになってきた。しかし、これを実際に応用しようとするとき、生態系へ

の慎重な配慮とともに、湖の利水などの利害関係者との合意形成が必要と予測され、そのためには、十分な根拠に基づく予測により見通しを示すことのできる技術確立が望まれる。本研究では、この技術確立を目的として、次のような目標を設定して研究している。

1. 内部生産の把握手法の確立
2. 生態系内の種の競争関係の定量化手法確立
3. 生態系と水質の関係の定量化手法の確立

結果

平成 22 年度は、生態系内の種間関係の定量化に必要な数理モデルに関する基礎的な情報収集を行うとともに、モデル化手法の整理を行い、解析ツールとしての Scilab などの数理演算アプリケーションソフトに関する実践的な情報共有を行った。

Ⅲ 調查研究報告

高血圧対策のための食パターン分析

栗盛寿美子 田中貴子 高山裕子*¹ 佐々木ひとみ*² 村山力則 岩谷金仁
 高山憲男 高階光栄*² 佐々木恵子*³ 高橋由美子*³ 佐々木リサ子*³ 後藤ひとみ*³

血圧と食パターンとの関連性を明らかにし、高血圧予防のための食生活改善方法を検討することを目的に、平成 21～22 年度に BDHQ (簡易型自記式食事歴法質問票: Brief-type self-administered Diet History Questionnaire) による食習慣調査を行い、結果を解析した。

血圧区別では、魚介類、調味料・香辛料の摂取量や食事バランスガイド料理区分の「主食」、「副菜」の摂取量などに差が見られた。また、血圧に影響するとされる食塩摂取量は年代が上がるにつれて高く、食塩摂取量 10 g 以上の者と 10 g 未満の者では食事バランスガイド料理区分のとり方に差が見られた。さらに、要指導群が正常群に比べて BMI (肥満指数) が有意に高く、高血圧対策を進めるためには肥満改善の食事指導が有効であることが、今回の解析からも明らかであった。

1. はじめに

日本人の 3 大死因のうち、心疾患と脳血管疾患には高血圧が大きな危険因子として関与している。秋田県は高血圧症有病者の割合が高く、健康秋田 21 計画では、平成 24 年度までに高血圧症有病者を 10% 以上減少することを目標に掲げている¹⁾。本調査では、血圧と食パターンとの関連性を明らかにし、高血圧予防のための食生活改善方法を検討することを目的に、平成 21～22 年度に、BDHQ (簡易型自記式食事歴法質問票: Brief-type self-administered Diet History Questionnaire) による食習慣調査を行い、解析した。

血圧は、平成 21 年度は自記式、平成 22 年度は特定健診の結果を用い、平成 22 年度は血圧治療の有無も調査項目に加えた。

質問票は、平成 21 年度は各事業所あてに郵送し、担当者が後日回収した。平成 22 年度は横手市増田地域局の特定健診において健診前に対象者に配布し、健診当日に会場で調査員が内容を確認した上で回収した。

個人データは、食事摂取基準 2005 年版に対応した BDHQ 専用の栄養価計算プログラムに入力し、INBOX にアップした。OUTBOX に現れた栄養価計算結果を出力し、各人の結果を得た。

2. 方法

2.1 対象

食習慣調査は、平成 21 年度と 22 年度に実施し、1,274 名を対象とした。

平成 21 年度は、県南地域の 11 事業所に勤務する 20～80 歳代の男女 495 名、平成 22 年度は横手市増田地域の特定健診受診者 779 名を対象として実施した。

2.2 方法

調査対象者に対して、BDHQ による食習慣調査を行った。質問項目は食品の摂取頻度や食べ方等 80 項目である。身長・体重は自記式とした。

2.3 統計解析

食習慣調査実施者のうち、20～74 歳の者を解析対象とした。また、BDHQ 開発者からの情報提供「BDHQ の過少過大申告: 除外基準」²⁾により、BDHQ から計算されたエネルギー摂取量がレベル I の EER の 0.5 倍未満の者 15 名と、レベル III の EER の 1.5 倍以上の者 29 名の計 44 名を除外し、男性 662 名、女性 562 名、計 1,224 名について解析した。解析対象者の内訳は表 1 のとおりである。

結果の統計解析にはマイクロソフトエクセルと統計解析パッケージ SPSS (ver13.0; SPSS Inc., Chicago, ILL) を使用した。

*¹ 聖霊女子短期大学, *² 元健康環境センター, *³ 横手市増田地域局

3. 結果

性別、年代別の栄養素等摂取状況（粗データ）は表 2 のとおりである。エネルギー摂取量、血圧に影響するとされる食塩摂取量（食塩相当量）は、年代が上がるにつれて多くなっていた。

食品群別摂取量については表 3 に示した。肉類、嗜好飲料を除き、どの食品群も男女ともに年代が上がるにつれて摂取量が多くなる傾向にあった。

血圧との関連では、日本高血圧学会の分類による血圧区分で「至適血圧（収縮期血圧 < 120mmHg かつ拡張期血圧 < 80mmHg）」と「正常血圧（収縮期血圧 < 130mmHg かつ拡張期血圧 < 85mmHg）」群を「正常群」、それより高い「正常高値血圧（収縮期血圧 130～139mmHg または拡張期血圧 85～89mmHg）」「I 度高血圧（収縮期血圧 140～159mmHg または拡張期血圧 90～99mmHg）」「II 度高血圧（収縮期血圧 160～179mmHg または拡張期血圧 100～109mmHg）」

「III 度高血圧（収縮期血圧 180mmHg 以上または拡張期血圧 110mmHg 以上）」群を「要指導群」とし、2 区分で解析した。男性では、「正常群」の平均年齢は 51.2±11.9 歳、BMI は 22.9±2.8、食塩摂取量は 12.3±3.4 g、「要指導群」では、平均年齢は 56.5±11.9 歳、BMI は 24.0±3.1、食塩摂取量は 12.9±3.6 g で、「正常群」と「要指導群」では、年齢と BMI で有意差が見られたが（ $p < 0.01$ ）、食塩摂取量では有意差は見られなかった。女性では、「正常群」の平均年齢は 51.6±12.6 歳、BMI は 21.9±2.9、食塩摂取量は 10.9±3.1 g、「要指導群」では、平均年齢は 61.0±9.9 歳、BMI は 23.7±3.3、食塩摂取量は 11.6±3.0 g で、いずれも有意差が見られた（ $p < 0.01$ ）（表 4）。

同じく表 4 にあるとおり、食品群別摂取量においては、男性では「要指導群」が「正常群」に比べ、「魚介類（ $p < 0.05$ ）」、「調味料・香辛料（ $p < 0.01$ ）」の摂取量が有意に多かった。女性では「要指導群」が「正常群」に比べ、「穀類（ $p < 0.01$ ）」「砂糖・甘味料（ $p < 0.05$ ）」「魚介類（ $p < 0.05$ ）」「調味料・香辛料（ $p < 0.01$ ）」の摂取量が有意に多く、「肉類」の摂取量は有意に少なかった（ $p < 0.05$ ）。食事バランスガイド料理項目³⁾では、男性では「要指導群」が「正常群」に比べ、「主食」の摂取量が有意に少なく（ $p < 0.01$ ）、女性では「要指導群」が「正常

群」に比べ、「副菜」の摂取量が有意に少なかった（ $p < 0.05$ ）。

血圧との関連が深いとされる食塩摂取量について、性、年齢区分により関連をみたところ、20～39 歳男性の「主食」を除き、食塩摂取量 10 g 以上の者（以下、10 g 以上群）は、10 g 未満の者（以下 10 g 未満群）に比べ、「主食」、「副菜」、「菓子類」の摂取量が有意に多く（ $p < 0.01$ ）、「主食」の摂取量は有意に少なかった（ $p < 0.01$ ）（表 5）。

肉類、魚類の調理法では、20～39 歳では男女ともに 10 g 以上群と 10 g 未満群に差は見られなかったものの、40～74 歳では煮物の摂取頻度が高かった（ $p < 0.01$ ）（表 6）。

因子分析による食パターンの抽出も試みたが、明らかな特徴は見いだせなかった。

4. 考察

高血圧予防の食事介入試験では、飽和脂肪酸、コレステロール、総脂肪が低く、果実、野菜、低脂肪乳製品をたくさん食べている人の血圧は低いことを見だし、さらに食塩を減らすことが血圧を下げることにつながるとしている「DASH プロジェクト研究」⁴⁾と、沖縄野菜を豊富に取り入れた沖縄食は高血圧の予防に有効であるとした「チャンプルースタディ」⁵⁾が知られている。本調査でも、「正常群」と「要指導群」では、女性で食塩摂取量に有意な差が見られ、さらに男性では「主食」、女性では「副菜（野菜を主としたおかず）」の摂取量に差が見られた。「食塩摂取量」は、エネルギー摂取量との相関がみられるとの報告もあり⁶⁾、「要指導群」は「正常群」に比べて BMI が有意に高いことから、肥満改善と減塩を合わせた食生活が高血圧対策に有効であると推察された。

健康秋田 21 計画によると、秋田県の高血圧症有病者の割合は、男性では 60.7%、女性では 45.4%、70 歳以上では男女ともに 70%を超えているとされている。しかし、本調査では平成 21 年度対象者には血圧治療状況の確認をしなかったこともあり、解析に用いたデータ上対象者に高血圧者の割合は低く、血圧を 2 群として集計した。また、コホート調査と違い、対象者の調査時点の血圧と食習慣から直接的な因果関係を探る今回の調査には限界があると思われた。さらに、

本調査には頻度調査を取り入れたが、頻度調査では、高齢層が若年層に比べ食品の摂取頻度が高い傾向にあり、高齢層の栄養摂取量が高くなっていた。「要指導群」と「正常群」に見られた差は、年齢の差の影響を受けている部分もあるものと思われ、計算値としての量そのものでの評価や食事のパターン化には限界があると思われた。

5. まとめ

BDHQ による調査は、対象者の負担が少なく簡便に食事傾向を把握する方法としては優れており、横手市では今後市全体を対象とした食事調査に導入する方向である。しかし、今回の調査から高血圧に直接関連すると思われる食パターンを見つけることには限界があった。

簡便な食習慣調査から高血圧に関連すると思われる食パターンを抽出するためには、年齢や治療状況を考慮した、さらに多数の調査対象が必要である。

秋田県民の長年の健康課題である高血圧に関連する食パターンについて、平成23年度に実施される県民健康・栄養調査から得られる詳細な

データと併せ、肥満対策とも絡めながら今後さらに検討を続けていくこととしている。

参考文献

- 1) 秋田県健康福祉部健康推進課：健康秋田 21計画（改定版），2008.
- 2) フードガイド（仮称）検討会：「フードガイド（仮称）検討会報告書
- 3) Sasaki S: Ministry of Health, Welfare, and Labor, 2004, 10-44.
- 4) U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES: Your Guide To Lowering Your Blood Pressure With DASH, NIH Publication No. 06-4082.
- 5) 等々力英美：沖縄の伝統食が高血圧予防に有効である可能性－チャンプルースタディ，第30回日本高血圧学会，2007，10，25-27
- 6) 高山裕子，張勇，佐藤智子，村山力則，原田誠三郎，古井美和子，高山憲男：秋田県における成人の食塩摂取に関する検討，秋田県健康環境センター年報，3，2007，18-23.

表1 解析対象

	平成21年度(人)			平成22年度(人)			合計(人 %)					
	男性	女性	計	男性	女性	計	男性		女性		合計	
20～29歳	23	24	47	0	0	0	23	3.5	24	4.3	47	3.8
30～39歳	69	56	125	1	1	2	70	10.6	57	10.1	127	10.4
40～49歳	93	55	148	46	28	74	139	21.0	83	14.8	222	18.1
50～59歳	84	38	122	99	121	220	183	27.6	159	28.3	342	27.9
60～69歳	12	5	17	175	182	357	187	28.2	187	33.3	374	30.6
70～74歳	3	8	11	57	44	101	60	9.1	52	9.3	112	9.2
総数	284	186	470	378	376	754	662	100.0	562	100.0	1,224	100.0

表 2 栄養素等摂取状況 (男性)

	男 性											
	20～29歳		30～39歳		40～49歳		50～59歳		60～69歳		70～74歳	
	n = 23人		n = 70		n = 139		n = 183		n = 187		n = 60	
	平均	±SD	平均	±SD	平均	±SD	平均	±SD	平均	±SD	平均	±SD
エネルギー(kcal)	2065	588	1998	475	2144	588	2242	660	2321	618	2365	572
たんぱく質(g)	66.5	22.2	65.4	18.4	71.9	24.4	76.2	26.8	82.3	28.0	92.4	31.2
動物性たんぱく質(g)	37.3	14.5	35.3	13.1	38.2	18.1	39.5	19.6	42.8	21.5	52.0	25.4
植物性たんぱく質(g)	29.2	11.1	30.1	8.3	33.7	10.9	36.7	11.8	39.6	11.7	40.4	11.1
脂質(g)	55.7	17.6	53.4	17.8	54.2	19.0	55.9	21.2	61.3	21.8	67.6	23.6
動物性脂質(g)	23.7	8.2	22.5	8.5	22.8	10.6	22.6	10.8	24.1	11.4	28.2	14.1
植物性脂質(g)	32.0	11.6	30.8	11.4	31.4	11.5	33.3	13.1	37.2	13.7	39.3	13.4
炭水化物(g)	276.3	106.0	266.3	77.7	287.4	95.4	300.2	99.3	306.1	89.7	299.0	82.3
灰分(g)	17.6	5.2	18.2	4.4	19.2	5.6	20.5	6.4	22.0	6.3	24.2	6.6
ナトリウム(mg)	4382	1265	4375	1023	4673	1335	4953	1429	5238	1375	5728	1522
カリウム(mg)	2154	711	2351	731	2396	833	2594	1040	2860	1083	3140	1022
カルシウム(mg)	393	158	456	160	471	206	544	244	609	249	718	262
マグネシウム(mg)	234	73	250	68	268	86	292	102	315	102	344	102
リン(mg)	954	311	989	270	1062	363	1137	409	1230	414	1383	454
鉄(mg)	6.8	2.5	7.2	2.4	7.9	2.8	8.7	3.2	9.8	3.5	10.9	3.5
亜鉛(mg)	8.1	2.8	7.9	2.1	8.8	2.9	9.2	3.0	9.7	3.0	10.3	2.9
銅(mg)	1.12	0.46	1.15	0.31	1.29	0.42	1.42	0.47	1.54	0.46	1.59	0.43
マンガン(mg)	3.33	1.48	3.23	0.96	3.72	1.36	3.93	1.40	4.26	1.30	4.37	1.27
レチノール(μg)	361	242	363	246	459	695	426	394	548	569	591	425
βカロテン当量(μg)	2438	1584	3009	2212	2681	1744	3110	2211	3637	2611	4021	2520
レチノール当量(μg)	568	305	617	339	685	732	688	487	854	643	929	514
ビタミンD(μg)	9.6	6.7	11.6	7.3	12.6	9.2	15.0	10.0	17.8	10.5	24.3	16.4
αトコフェロール(mg)	7.0	2.5	7.1	2.7	7.0	2.7	7.6	3.3	8.4	3.3	9.2	3.3
ビタミンK(μg)	249	105	272	137	308	162	361	198	455	226	491	208
ビタミンB1(mg)	0.70	0.23	0.70	0.23	0.74	0.27	0.77	0.29	0.83	0.30	0.90	0.30
ビタミンB2(mg)	1.11	0.37	1.16	0.34	1.24	0.45	1.32	0.51	1.50	0.54	1.67	0.55
ナイアシン(mg)	17.7	5.2	17.2	5.2	18.5	6.6	18.2	7.1	19.0	7.5	21.9	9.3
ビタミンB6(mg)	1.17	0.36	1.22	0.39	1.28	0.46	1.35	0.54	1.49	0.56	1.68	0.61
ビタミンB12(μg)	7.6	4.2	8.5	4.3	9.5	5.5	10.7	6.6	12.1	7.2	15.9	10.1
葉酸(μg)	278	100	306	110	323	128	352	156	410	169	446	152
パントテン酸(mg)	5.86	1.85	5.93	1.62	6.42	2.17	6.76	2.43	7.59	2.55	8.20	2.41
ビタミンC(mg)	81.9	38.1	95.2	45.4	91.7	47.2	102.7	59.7	117.0	63.0	130.0	52.7
飽和脂肪酸(g)	13.26	4.41	13.11	4.88	12.89	5.00	13.05	5.36	14.24	5.82	15.82	6.31
一価不飽和脂肪酸(g)	20.93	6.85	19.40	6.58	19.63	7.06	19.64	7.55	21.32	7.81	23.46	8.45
多価不飽和脂肪酸(g)	14.93	5.17	14.23	4.81	14.97	5.22	16.13	6.20	17.78	6.15	19.17	6.14
コレステロール(mg)	348	152	363	134	358	167	370	168	393	184	450	173
水溶性食物繊維(g)	2.2	0.8	2.6	1.2	2.6	1.2	2.9	1.4	3.5	1.5	3.7	1.4
不溶性食物繊維(g)	7.1	2.8	7.8	2.8	8.3	3.0	9.1	3.7	10.4	3.9	11.0	3.6
総食物繊維(g)	9.6	3.6	10.7	4.1	11.3	4.3	12.5	5.2	14.4	5.6	15.3	5.2
食塩相当量(g)	11.0	3.2	11.0	2.6	11.8	3.4	12.5	3.6	13.2	3.5	14.4	3.8

平均±SD(標準偏差)

粗データ

表 2 栄養素等摂取状況 (女性)

	女 性											
	20～29歳 n =24		30～39歳 n =57		40～49歳 n =83		50～59歳 n =159		60～69歳 n =187		70～74歳 n =52	
	平均	±SD	平均	±SD	平均	±SD	平均	±SD	平均	±SD	平均	±SD
エネルギー(kcal)	1717	555	1643	449	1829	421	1725	432	1860	480	1934	464
たんぱく質(g)	66.1	31.3	61.4	22.6	68.1	19.7	66.6	19.0	76.8	26.4	81.0	21.6
動物性たんぱく質(g)	39.7	26.0	34.0	15.1	37.4	15.1	35.0	14.0	42.0	21.6	46.0	17.0
植物性たんぱく質(g)	26.5	7.8	27.4	9.8	30.7	7.4	31.6	9.4	34.8	10.1	35.0	8.3
脂質(g)	56.4	24.1	53.9	18.8	58.5	16.6	53.6	16.7	58.9	18.1	61.1	16.6
動物性脂質(g)	24.4	12.6	21.9	8.3	23.6	8.9	20.2	8.4	22.5	9.7	23.8	8.8
植物性脂質(g)	32.0	12.7	32.0	12.5	35.0	10.1	33.5	11.3	36.4	11.8	37.2	10.4
炭水化物(g)	222.1	63.6	212.1	62.1	241.7	58.1	231.5	63.5	246.0	69.6	256.8	67.1
灰分(g)	16.7	6.4	16.3	5.5	17.8	4.5	18.4	4.5	21.1	6.0	21.9	4.8
ナトリウム(mg)	3795	1327	3698	1192	4045	979	4235	989	4833	1313	4937	1037
カリウム(mg)	2376	1138	2291	871	2468	784	2511	781	2895	993	3075	847
カルシウム(mg)	471	238	480	235	531	192	526	185	653	280	691	194
マグネシウム(mg)	228	95	231	88	253	72	262	75	301	96	313	75
リン(mg)	972	439	932	362	1027	295	1002	290	1174	421	1247	330
鉄(mg)	7.4	3.5	6.9	2.6	7.8	2.4	8.2	2.5	9.5	3.1	9.8	2.4
亜鉛(mg)	7.9	3.6	7.2	2.4	8.1	2.1	7.7	2.1	8.5	2.5	9.0	2.3
銅(mg)	1.07	0.37	1.04	0.37	1.17	0.30	1.21	0.33	1.36	0.38	1.42	0.33
マンガン(mg)	3.11	1.28	2.82	0.92	3.34	0.96	3.53	1.09	3.82	1.06	4.03	0.98
レチノール(μg)	369	310	316	218	354	229	359	433	412	436	422	290
βカロテン当量(μg)	3291	3464	2909	1494	3341	1881	3655	1998	4485	2604	4735	2436
レチノール当量(μg)	647	564	561	285	636	300	666	493	789	540	820	365
ビタミンD(μg)	11.9	10.0	11.3	9.6	12.5	6.9	14.3	8.0	19.8	14.4	21.3	10.3
αトコフェロール(mg)	7.5	3.5	7.0	2.7	7.7	2.5	7.5	2.4	8.6	3.1	9.2	2.6
ビタミンK(μg)	272	185	271	138	326	171	363	167	460	206	427	170
ビタミンB1(mg)	0.75	0.39	0.71	0.26	0.74	0.21	0.73	0.22	0.82	0.27	0.88	0.23
ビタミンB2(mg)	1.19	0.52	1.13	0.38	1.27	0.40	1.24	0.39	1.45	0.47	1.50	0.39
ナイアシン(mg)	16.0	9.3	15.2	5.3	16.5	5.5	16.5	5.2	18.0	7.0	18.6	5.7
ビタミンB6(mg)	1.21	0.62	1.12	0.39	1.20	0.40	1.21	0.39	1.39	0.50	1.50	0.43
ビタミンB12(μg)	8.4	5.4	7.9	4.3	8.9	4.6	9.7	5.2	11.9	7.7	12.6	6.1
葉酸(μg)	314	181	288	114	329	126	351	129	417	159	433	122
パントテン酸(mg)	5.97	2.70	5.58	1.88	6.22	1.87	5.97	1.82	6.98	2.18	7.31	1.94
ビタミンC(mg)	111.9	68.7	99.5	45.0	104.6	48.9	110.7	47.6	133.2	60.2	152.0	58.2
飽和脂肪酸(g)	14.53	5.95	13.75	4.84	14.74	4.76	12.71	4.64	13.65	4.52	14.05	4.30
一価不飽和脂肪酸(g)	20.76	9.74	19.39	6.72	20.94	6.09	18.91	5.95	20.44	6.40	21.31	6.16
多価不飽和脂肪酸(g)	14.12	5.75	14.02	5.43	15.50	4.52	15.17	4.79	16.95	5.23	17.59	4.38
コレステロール(mg)	389	188	327	144	368	145	314	122	367	163	395	160
水溶性食物繊維(g)	2.7	1.3	2.6	1.1	2.8	1.0	2.9	1.1	3.5	1.4	3.7	1.2
不溶性食物繊維(g)	7.7	3.6	7.6	3.0	8.2	2.7	8.9	2.9	10.4	3.6	10.9	3.3
総食物繊維(g)	10.7	5.0	10.6	4.3	11.3	3.9	12.2	4.1	14.5	5.2	15.2	4.7
食塩相当量(g)	9.6	3.3	9.3	3.0	10.2	2.5	10.7	2.5	12.2	3.3	12.4	2.6

平均±SD(標準偏差)

粗データ

表3 食品群別摂取量

男 性	20～29歳		30～39歳		40～49歳		50～59歳		60～69歳		70～74歳	
	n=23		n=70		n=139		n=183		n=187		n=60	
	平均	±SD										
穀類	514.7	276.6	478.4	173.6	551.9	220.3	562.9	213.0	552.2	196.1	499.9	162.1
いも類	32.2	27.6	43.3	31.7	40.7	41.6	48.3	45.4	59.1	53.3	62.9	45.3
砂糖・甘味料	6.2	5.4	5.8	5.0	6.0	5.4	6.3	5.4	6.5	4.3	6.2	5.6
豆類	71.4	45.9	79.5	50.5	95.6	59.5	126.4	74.6	135.5	69.7	146.1	67.2
緑黄色野菜	60.5	38.6	82.0	62.1	70.7	47.5	81.3	60.9	95.5	68.4	106.2	65.3
その他の野菜	125.2	55.5	140.9	77.3	138.6	71.9	147.1	90.1	169.0	102.2	186.7	94.5
果実類	43.9	52.2	52.3	56.3	47.0	57.7	58.0	59.0	61.8	65.2	68.2	52.7
魚介類	65.0	39.5	70.5	42.7	78.9	48.7	94.8	64.1	107.0	69.5	134.4	86.0
肉類	90.3	28.3	65.2	30.8	75.6	52.1	60.0	34.8	59.0	42.9	67.3	53.8
卵類	38.0	25.2	42.4	22.9	37.7	25.5	39.0	25.7	38.9	27.5	41.1	21.9
乳類	72.5	79.1	88.4	77.3	80.7	88.3	96.7	99.3	110.8	107.3	127.5	103.3
油脂類	25.1	11.2	21.8	8.9	21.5	9.0	21.6	9.9	23.2	10.0	24.5	10.1
菓子類	27.3	23.5	35.0	28.0	37.0	33.8	36.7	33.2	48.0	41.0	64.0	55.6
嗜好飲料	1106.2	592.6	1006.5	486.4	1000.5	462.7	941.7	443.8	879.4	382.0	877.6	433.2
調味料・香辛料	7.0	1.5	6.7	1.7	6.8	1.8	7.1	1.9	7.5	1.9	7.7	2.0

単位：g

女 性	20～29歳		30～39歳		40～49歳		50～59歳		60～69歳		70～74歳	
	n=24		n=57		n=83		n=159		n=187		n=52	
	平均	±SD										
穀類	425.8	228.0	407.4	170.8	493.0	204.7	471.6	200.1	469.2	184.8	451.7	153.1
いも類	53.9	36.7	44.6	35.2	46.5	31.0	49.8	37.2	55.5	40.8	68.9	51.1
砂糖・甘味料	5.5	5.3	4.2	3.3	5.1	4.4	4.9	3.8	5.5	3.6	5.4	3.3
豆類	76.8	36.8	94.7	71.9	101.2	50.6	118.7	66.6	131.5	60.8	130.2	54.0
緑黄色野菜	90.1	80.0	71.7	35.7	82.4	48.6	92.4	52.9	113.4	67.0	117.5	61.7
その他の野菜	149.9	124.1	145.5	77.2	153.2	79.6	160.6	81.7	187.6	93.8	196.8	82.2
果実類	79.4	74.1	91.0	69.7	63.5	52.8	71.1	63.5	86.5	72.8	122.5	83.9
魚介類	71.4	48.0	68.5	46.0	75.9	40.8	83.5	45.7	110.0	73.2	118.7	56.1
肉類	86.8	80.4	63.0	28.0	65.8	36.2	54.6	36.2	49.5	34.2	56.0	30.1
卵類	39.3	19.8	30.7	19.0	37.6	21.3	28.0	18.0	31.3	21.0	33.1	22.3
乳類	97.9	80.3	118.0	88.4	129.6	97.6	95.2	77.4	124.9	95.8	138.7	70.5
油脂類	21.4	10.4	20.8	8.1	22.9	8.5	21.1	7.8	22.6	8.0	24.2	7.2
菓子類	57.4	34.6	56.9	50.9	57.7	37.6	57.7	43.8	60.8	48.7	61.8	38.0
嗜好飲料	619.4	389.4	628.8	315.4	718.5	336.1	705.2	331.1	657.4	306.6	606.7	255.6
調味料・香辛料	5.6	1.5	5.4	1.3	5.8	1.3	6.0	1.3	6.6	1.5	6.6	1.3

単位：g

表 4 食品群別摂取量及び食事バランスガイド料理区分と血圧との関連

	男 性			女 性		
	正常群 ^{a)} n=326	要指導群 ^{b)} n=336	P	正常群 ^{a)} n=373	要指導群 ^{b)} n=189	P
年齢(歳)	51.2 (±11.9)	56.5 (±11.9)	**	51.6 (±12.6)	61.0 (±9.9)	**
BMI(体重kg/(身長m) ²)	22.9 (±2.8)	24.0 (±3.1)	**	21.9 (±2.9)	23.7 (±3.3)	**
最高血圧(mmHg)	116.0 (±8.2)	138.0 (±10.3)	**	113.4 (±10.0)	137.1 (±9.1)	**
最低血圧(mmHg)	69.8 (±7.4)	80.4 (±10.1)	**	65.6 (±7.6)	77.4 (±9.2)	**
食塩摂取量(g)	12.3 (±3.4)	12.9 (±3.6)	ns	10.9 (±3.1)	11.6 (±3.0)	**
食品群別摂取量(g) ^{c)}						
穀類	547.5 (±205.4)	535.2 (±207.9)	ns	362.6 (±123.5)	396.7 (±120.4)	**
いも類	47.8 (±44.5)	52.2 (±47.7)	ns	52.2 (±37.7)	53.4 (±42.9)	ns
砂糖・甘味料	6.6 (±5.6)	5.9 (±4.6)	ns	4.9 (±3.6)	5.6 (±4.2)	*
豆類	114.5 (±69.0)	120.2 (±71.3)	ns	113.9 (±62.4)	123.7 (±63.7)	ns
緑黄色野菜	83.3 (±64.8)	86.0 (±58.7)	ns	98.5 (±59.1)	97.2 (±62.4)	ns
その他の野菜	147.8 (±88.9)	159.4 (±91.0)	ns	169.5 (±91.7)	170.5 (±84.3)	ns
果実類	57.2 (±65.3)	56.0 (±54.3)	ns	79.3 (±64.0)	88.1 (±81.4)	ns
魚介類	89.4 (±57.3)	100.2 (±71.3)	*	88.2 (±56.3)	100.8 (±64.6)	*
肉類	66.0 (±39.6)	64.5 (±46.7)	ns	59.7 (±41.7)	51.4 (±30.1)	*
卵類	39.9 (±25.5)	38.6 (±25.8)	ns	31.8 (±20.3)	31.7 (±20.7)	ns
乳類	94.9 (±98.2)	101.8 (±98.5)	ns	115.4 (±88.3)	119.0 (±90.8)	ns
油脂類	22.3 (±9.7)	22.5 (±9.9)	ns	22.4 (±8.6)	21.7 (±7.3)	ns
菓子類	42.4 (±38.8)	41.4 (±38.3)	ns	60.3 (±44.5)	56.4 (±45.1)	ns
嗜好飲料	970.0 (±446.2)	917.1 (±444.5)	ns	683.2 (±325.7)	646.2 (±311.5)	ns
調味料・香辛料	7.0 (±1.8)	7.4 (±1.9)	**	6.0 (±1.5)	6.4 (±1.5)	**
食事バランスガイド料理区分(つ(SV)) ^{d)}						
主食	5.51 (±1.64)	5.17 (±1.61)	**	3.64 (±1.05)	3.72 (±1.09)	ns
副菜	4.53 (±2.25)	4.64 (±2.15)	ns	5.07 (±2.02)	4.07 (±1.73)	*
主菜	8.21 (±2.79)	8.31 (±3.03)	ns	7.67 (±2.33)	7.54 (±2.36)	ns
乳・乳製品	1.10 (±1.28)	1.14 (±1.21)	ns	1.32 (±1.04)	1.31 (±1.04)	ns
果物	0.99 (±1.11)	0.92 (±0.87)	ns	1.13 (±0.93)	1.06 (±0.86)	ns

平均値(±標準偏差)

独立したサンプルの検定 * : P<0.05, ** : P<0.01, ns : 有意差なし

a) 正常群 : 日本高血圧学会分類による「至適血圧」「正常血圧」

b) 要指導群 : 日本高血圧学会分類による「正常高値血圧」「Ⅰ度高血圧」「Ⅱ度高血圧」「Ⅲ度高血圧」

c) 各食品の摂取頻度を重量に換算し、食品群にまとめたもの

d) 厚生労働省・農林水産省決定食事バランスガイドによる標準的な給与量の数。
単位は、ひとつ、ふたつの「つ(SV)」。SVはServingsの略。

表 5 食塩摂取量別にみた「食事バランスガイド料理区分」の摂取状況

男 性						
食塩摂取量	20～39歳			40～74歳		
	10g以上群 n=59	10g未満群 n=34	P	10g以上群 n=432	10g未満群 n=137	P
料理区分	つ (SV) ^{a)}			つ (SV) ^{a)}		
主食	5.51±1.59	5.90±1.48	ns	5.04±1.57	6.08±1.60	**
副菜	5.44±2.38	4.30±1.94	*	4.83±2.21	3.50±1.72	**
主菜	8.77±2.94	7.75±2.57	ns	8.67±2.87	6.88±2.69	**
乳・乳製品	1.02±1.01	1.26±1.65	ns	1.15±1.16	1.04±1.46	ns
果物	1.24±1.12	1.17±1.82	ns	0.94±0.88	0.83±0.96	ns
菓子・嗜好飲料 (酒類)	2.03±2.25	1.77±1.83	ns	2.21±2.06	2.05±1.96	ns
菓子・嗜好飲料 (菓子類)	2.39±1.52	1.65±1.48	*	2.27±1.74	1.31±1.18	**

女 性						
食塩摂取量	20～39歳			40～74歳		
	10g以上群 n=27	10g未満群 n=54	P	10g以上群 n=313	10g未満群 n=168	P
料理区分	つ (SV) ^{a)}			つ (SV) ^{a)}		
主食	3.37±1.15	3.87±1.19	ns	3.40±0.90	4.14±1.12	**
副菜	5.58±2.32	4.39±1.63	**	5.28±1.94	4.41±1.80	**
主菜	8.79±2.19	6.97±2.14	**	7.99±2.31	6.97±2.28	**
乳・乳製品	1.57±1.16	1.30±1.15	ns	1.31±0.99	1.29±1.08	ns
果物	1.51±1.01	1.28±1.01	ns	1.11±0.88	0.98±0.90	ns
菓子・嗜好飲料 (酒類)	0.30±0.61	0.62±1.02	ns	0.32±0.68	0.24±0.50	ns
菓子・嗜好飲料 (菓子類)	3.20±2.16	2.23±1.37	**	2.72±1.76	1.85±1.50	**

独立したサンプルの検定 * : P<0.05, ** : P<0.01, ns : 有意差なし

a) つ (SV) : 標準的な給与量の数。ひとつ、ふたつの「つ」、SVはServingsの略。

表 6 食塩摂取量 10 g 以上群が 10 g 未満群に比べ摂取頻度の高かった調理法 (肉類・魚類)

	男 性	女 性
20～39歳	— ^{a)}	— ^{a)}
40～74歳	○煮魚・鍋物・汁物・みそ汁 (p<0.01) ○肉を使った和風の煮物・鍋物 ・どんぶり物・汁物・みそ汁 (p<0.01)	○煮魚・鍋物・汁物・みそ汁 (p<0.01) ○天ぷら・揚げ魚 (p<0.01) ○肉を使った和風の煮物・鍋物 ・どんぶり物・汁物・みそ (p<0.01)

Pearsonのカイ2乗検定

a) — : 摂取頻度が高い調理法は認められなかった

市販鶏肉からの CTX-M 基質拡張型 β -ラクタマーゼ (ESBL) 遺伝子保有株 の分離と分離株の解析

八柳 潤 今野貴之 齊藤志保子

CTX-M 遺伝子は *Kluyvera* 属菌の染色体遺伝子に由来すると考えられているが、*Kluyvera* 属菌の Reservoir に関する報告はほとんどみあたらない。我々は、市販鶏肉を対象として CTX-M 遺伝子を保有する *Kluyvera* 属菌の検出を試みた。秋田市内のスーパーで購入した鶏肉 16 検体を供試し、CTX-M2 Group 遺伝子陽性 *E. coli* 1 株と、これまでに報告されていない CTX-M1 Group 遺伝子を保有する *K. cryocrescens* 2 株を分離した。分離された *K. cryocrescens* 2 株の CTX-M 遺伝子の周辺には、CTX-M 遺伝子の転移に関与するとされる *ISEcp1* により認識され得る遺伝子構造が存在していた。我々の成績は *Kluyvera* 属菌が CTX-M 遺伝子自体のジーンプールとなっている可能性を示すと共に、鶏の腸管が CTX-M 遺伝子保有大腸菌などの発生に関与する可能性を示唆するものと考えられた。今後も鶏が保有する *Kluyvera* 属菌とプラスミド性 CTX-M 遺伝子を保有する腸内細菌の遺伝子を解析し、CTX-M 遺伝子の起源に関する知見を集積する必要がある。

1. 緒言

CTX-M 基質拡張型 β -ラクタマーゼ (ESBL) は、近年、国内外共に ESBL の主流となっている¹⁾。*Escherichia coli* や *Proteus mirabilis* などの腸内細菌科に属する臨床分離株において、CTX-M 遺伝子は 7 Kb から 160 Kb の伝達性プラスミド上にコードされている¹⁾。この CTX-M 遺伝子は、*K. gerogiana*, *K. ascorbata*, *K. cryocrescens* などの *Kluyvera* 属菌の染色体遺伝子に由来すると考えられている²⁻⁶⁾。とりわけ、Rodriguez らは CTX-M3 遺伝子を染色体に保有する *K. ascorbata* を環境材料から分離し、CTX-M3 遺伝子が CTX-M1 Group 遺伝子の起源である可能性を指摘している⁶⁾。一方、市販鶏肉が大腸菌などの CTX-M 型 ESBL 産生菌に汚染されていることが報告されており^{7,8)}、鶏肉が CTX-M 型 ESBL 産生菌の感染源となる可能性が指摘⁸⁾されているが、*Kluyvera* 属菌の Reservoir に関する報告はほとんどみあたらない。我々は、*Kluyvera* 属菌の Reservoir に関する知見を得ることを目的として、市販鶏肉を対象として CTX-M 遺伝子を保有する *Kluyvera* 属菌の検出を試みた。

2. 方法

2.1 鶏肉からの CTX-M 型遺伝子保有株の分離

平成 22 年 6 月と 7 月に秋田市内のスーパーで購入した鶏肉 16 検体を供試した。鶏肉 25 g を

BPW 225 ml に接種し、35°C で 1 夜培養した。培養液を 1% Cellobiose 加マッコンキアガーに CTX 4 μ g/ml、またはセファロチン 2 μ g/ml を加えた分離平板で 37°C 1 夜分離培養した。菌苔の濃厚発育部分からアルカリ法で抽出した DNA をテンプレートとして、表 1 に示す Pagani ら⁹⁾が報告した CTX-MU1/CTX-MU2 プライマーを使用する PCR により CTX-M 遺伝子保有株のスクリーニングを実施した。陽性となった平板は、発育した個々のコロニーについて同 PCR により CTX-M 遺伝子保有株を特定した。特定された CTX-M 遺伝子保有株については、表 1 に示すプライマーを使用して CTX-M 遺伝子を群別した。また、16S リボゾーナル RNA のシーケンスを決定¹⁰⁾し、BLAST 解析を行うと共に、API20E (バイオメリュー) により菌種を同定した。

分離株の薬剤感受性はドライプレート DPD1 と DP21 (栄研化学) により検討した。

2.2 鶏肉から分離された *K. cryocrescens* #4 と #8 の CTX-M 遺伝子を含む染色体 DNA 断片のクローニングと解析

鶏肉から分離された、CTX-M 遺伝子陽性 *K. cryocrescens* #4 と #8 から QIAamp DNA minikit (Qiagen) を使用して染色体 DNA を分離・精製し、

BamH1 で消化した。得られた DNA 断片を、あらかじめ BamH1 で消化した pBCKS ベクター (Stratagene) にライゲートし、Competent JM109 を Transform した。0.008% X-gal, 14.75 mg/ml IPTG, 30 µg/ml CP, 2 µg/ml CEZ を加えた L Agar Plate を使用して、CTX-M 遺伝子を含む Transformant を選択し、JM109 4-1 と JM109 8-1 を得た。

JM109 4-1 と JM109 8-1 から QIAquick spin mini kit (Qiagen) を使用してプラスミド p4-1 と p8-1 を調製し、T3, T7, CTX-MU1, CTX-MU2 プライマーを使用して、クローニングされた DNA 断片 (インサート 4-1, インサート 8-1) のシークエンスを決定した後、プライマーウォーキング法によりインサート 4-1 は約 3.3 Kb, インサート 8-1 は約 3.7 Kb の DNA シークエンスを決定した。

3. 結果

3.1 鶏肉からの CTX-M 型遺伝子保有株の分離

表 2 に鶏肉から分離された CTX-M 遺伝子陽性株を示す。6 月 24 日に購入した岩手県産純白鶏モモ (検体番号 4) 及び 7 月 8 日に購入した岩手県産若鶏モモ挽肉 (検体番号 8) から、CTX-M1 Group 遺伝子陽性 *K. cryocrescens* が分離された (菌株番号: #4-1 と #8-1)。一方、7 月 1 日に購入した岩手県産若鶏モモ挽肉 (検体番号 7) から CTX-M2 Group 遺伝子陽性 *E. coli* が分離された (菌株番号 #7-5-3)。

分離株の薬剤感受性を表 3 に示す。*K. cryocrescens* は #4-1 株, #8-1 株いずれも ABPC に耐性, CTX, CAZ, IPM, AMK, MINO, LVFX に感受性であった。また, #4-1 株は AZT 感受性であったのに対して, #8-1 株は AZT 中等度耐性であった。一方, *E. coli* #7-5-3 株は ABPC, CTX, IPM, AZT, AMK 耐性, CAZ, MINO, LVFX 感受性であった。

以上の結果から、鶏肉から分離された *K. cryocrescens* 2 株は、CTX-M1 Group 遺伝子を保有するものの CTX に耐性を示さないことが示された。一方、CTX-M2 Group 遺伝子を保有する *E. coli* #7-5-3 株は CTX 耐性 CAZ 感受性という、CTX-M 型 ESBL 産生株に典型的な耐性パターンを示し、IPM, AZT, AMK にも耐性を示すという、特徴的な多剤耐性傾向にあることが明らかとなった。

3.2 *K. cryocrescens* #4 と #8 の CTX-M 遺伝子を含む染色体 DNA 断片の解析

T3 プライマーと T7 プライマーを使用した検討により、p4-1 には *K. cryocrescens* #4 の染色体に由来する約 23 Kb の DNA 断片、p8-1 には *K. cryocrescens* #8 の染色体に由来する約 5 Kb の DNA 断片が組み込まれていることが判明した。プライマーウォーキング法により p4-1 のインサート 3,296 bp, p8-1 のインサート 3,742 bp の DNA シークエンスを決定し、解析した結果を図 1 に示す。インサート 4-1, 8-1 の *bla*_{CTX-M} 遺伝子周辺の遺伝子構造はほぼ同一で、Asparatate amino transferase, *bla*_{CTX-M}, *orf477* (Reverse strand), そして *orf1* の順にコードされていることが明らかとなった。

CTX-M1 Group に属する、プラスミド性 CTX-M3 遺伝子の Start Codon 上流部とインサート 4-1, 8-1 の CTX-M 遺伝子の上流部の DNA シークエンスを比較した結果を図 2 に、プラスミド性 CTX-M15 遺伝子の Stop Codon 下流部とインサート 4-1, 8-1 CTX-M 遺伝子の下流部の DNA シークエンスを比較した結果を図 3 にそれぞれ示す。インサート 4-1, 8-1 CTX-M 遺伝子の上流部と下流部の DNA シークエンスはほぼ同一であり、シークエンスの保存性が高いことが明らかとなった。CTX-M 遺伝子の Start Codon から -127 bp の領域は、プラスミド性 CTX-M3 遺伝子の Start Codon 上流部のシークエンスとほぼ一致していたが、プラスミド性 CTX-M3 遺伝子では -128 bp 以遠が *ISEcp1* 遺伝子の *IRR1*¹⁾ となり、インサート 4-1, 8-1 の CTX-M 遺伝子の上流部のシークエンスとはこの部分から異なった (図 2)。一方、CTX-M 遺伝子の Stop Codon 下流域の DNA シークエンスは *ISEcp1* 遺伝子の Putative *IRR*⁶⁾ の 3' 末端まではプラスミド性 CTX-M15 遺伝子、インサート 4-1, 8-1 遺伝子ともにほぼ一致していたが、Putative *IRR3'* からさらに下流ではプラスミド性 CTX-M15 遺伝子の DNA シークエンスは Insert 4-1, 4-8 の DNA シークエンスと異なっていた。

*bla*_{CTX-M4-1} と *bla*_{CTX-M8-1} の DNA シークエンスをアミノ酸配列に翻訳し、Protein BLAST 解析した結果を表 4 と表 5 にそれぞれ示す。CTX-M4-1 タンパク、CTX-M8-1 タンパク共に、同一の配列を持つ CTX-M タンパクは報告されていなかった。

CTX-M 4-1 タンパクはアミノ酸残基 291 個中 290 個が CTX-M3 と CTX-M30 とに一致し、これらとの相同性が最も高いこと、一方、CTX-M 8-1 タンパクはアミノ酸残基 291 個中 290 個が CTX-M68 と一致し、CTX-M68 と最も相同性が高いことが明らかとなった。

4. 考察

今回、我々は CTX-M2 Group 遺伝子を保有する大腸菌と CTX-M1 Group 遺伝子を保有する *K. cryocrescens* を秋田市内で市販されていた鶏肉から初めて分離した。CTX-M 型 ESBL 産生菌（腸内細菌、plasmid 性）を市販鶏肉から分離した報告は国内においても散見されるが、市販鶏肉から染色体性 CTX-M 遺伝子を保有する *Kluyvera* 属菌を分離した報告はみあたらない。*Kluyvera* 属菌のうち、*K.georgiana* は CTX-M9 Group²⁾、CTX-M8 Group³⁾、*K.ascorbata* は CTX-M3⁶⁾、KLUA (CTX-M2 Group)¹⁾⁵⁾、*K.cryocrescens* は KLUC-1⁴⁾ 遺伝子を染色体にコードしていることが報告されている。そして、大腸菌等の腸内細菌が保有するプラスミド性 CTX-M 遺伝子は、*Kluyvera* 属菌の染色体性 CTX-M 遺伝子に由来すると考えられている¹⁾。Decousser らが報告⁴⁾した *K.cryocrescens* の KluC-1 遺伝子は、CTX-M1 Group に近縁ではあるものの、CTX-M1 との相同性は約 85% に過ぎず¹⁾、CTX-M1 Group とは別群に属すると提唱されている。これに対して、今回我々が鶏肉から分離した *K.cryocrescens* が保有する CTX-M 遺伝子は CTX-M1 Group に属し、一株が CTX-M3 と CTX-M30、もう一株が CTX-M68 とアミノ酸レベルで約 99.6% の相同性を示すことが明らかとなった。以上の結果は、*K.georgiana*^{2,3)}、*K.ascorbata*^{1,5,6)} と同様に、*K.cryocrescens* も複数種類の CTX-M 遺伝子を染色体にコードしていることを示しており、同一種の *Kluyvera* 属菌が複数の CTX-M 遺伝子を染色体にコードしている実態がうかがわれる。

Kluyvera 属菌の染色体にコードされている CTX-M 遺伝子が腸内細菌などの腸内細菌のプラスミドに転移する機構には、*ISEcp1* が関与することが指摘¹¹⁾されている。実際、In Vitro で *Kluyvera ascorbata* の染色体性 CTX-M 遺伝子が *ISEcp1* により大腸菌のプラスミドに転移することが実験的に証明されている^{12,13)}。*ISEcp1* は CTX-M8

Group を除くプラスミド性 CTX-M1, 2, 9, 25 Group 遺伝子と共存していることがこれまでに報告されていることと併せて¹²⁾、CTX-M 型 ESBL 産生株の世界的な侵淫には *ISEcp1* による CTX-M 遺伝子のプラスミドへの転移が関与していると考えられる。なお、CTX-M2 遺伝子の転移には Putative transposase とされる orf513 が関与するという報告¹⁴⁾もあり、このことは *Kluyvera* 属菌の染色体性 CTX-M 遺伝子が腸内細菌に拡散する機構には複数の転移機構が関与していることを示唆している。なお、*ISEcp1* は CTX-M 遺伝子発現の強力なプロモーターとして機能することが報告¹¹⁾されている。実際、染色体性 CTX-M 遺伝子を保有する *Kluyvera* 属菌には *ISEcp1* が共存せず、CTX に対する MIC は 0.06 から 0.25 $\mu\text{g/ml}$ であるのに対して、*ISEcp1* が共存する、プラスミド性 CTX-M 遺伝子を保有する大腸菌の CTX に対する MIC は 4 から 512 $\mu\text{g/ml}$ であることが報告¹⁾されている。我々の成績においても、鶏肉から分離された *K.cryocrescens* は 2 株とも CTX-M 遺伝子の上流には *ISEcp1* が存在せず、CTX に対する MIC はそれぞれ ≤ 1 と 4 $\mu\text{g/ml}$ であったのに対して、CTX-M2 group 遺伝子を保有する大腸菌 #7-5-3 株の CTX に対する MIC は >32 $\mu\text{g/ml}$ であった。

今回、我々が鶏肉から分離した *K.cryocrescens* は 2 株とも CTX-M 遺伝子の上流と下流の DNA シークエンスが非常によく一致していること、そして、CTX-M の Start codon から -127bp までの配列がプラスミド性 CTX-M3 遺伝子の *ISEcp1* 遺伝子の IRR¹¹⁾までの DNA シークエンスと非常に高い相同性を保っていることが明らかとなった。さらに、CTX-M 遺伝子の Stop codon 下流部の DNA シークエンスは、プラスミド性 CTX-M15 遺伝子の下流部に存在する、*ISEcp1* の Putative IRR (18 bp) までの DNA シークエンスと非常に高い相同性を保っていることが明らかとなった。以上の結果は、今回我々が鶏肉から分離した *K.cryocrescens* は 2 株とも、CTX-M 遺伝子周辺に Putative IRR (18bp) を含む *ISEcp1* が認識可能な DNA シークエンスを保有していることを示していると考えられ、このことは、これらの株が染色体にコードしている CTX-M 遺伝子が *ISEcp1* により転移し得る可能性を示唆しているものと考えられる。

5. まとめ

今回、我々は、これまでに報告されていない CTX-M 遺伝子を保有する *K.cryocrescens* を市販鶏肉から分離し、これらの *K.cryocrescens* が *ISEcp1* により認識され得る遺伝子構造を持つことを示した。また、鶏肉から CTX-M2 group 遺伝子を保有する大腸菌も分離した。*Kluyvera* 属菌から腸内細菌に CTX-M 遺伝子が転移する場に関する知見は殆ど報告されていないが、今回の我々の成績は鶏の腸管が CTX-M 遺伝子保有大腸菌などの発生に関与する可能性を示唆するものと考えられ、この点に関して更なる研究が必要である。我々の成績はまた、*Kluyvera* 属菌が CTX-M 遺伝子自体のジーンプール (Reservoir) となっている可能性を示すと考えられる。CTX に加えて CAZ に耐性を示す CTX-M15 遺伝子保有株が世界的に問題となっている。CTX-M15 の起源は明らかではないが、その Progenitor であると考えられている CTX-M3 遺伝子にポイントミューテーションが生じて CTX-M15 となった可能性に加えて、CTX-M15 が *Kluyvera* 属菌の染色体に元々存在していた可能性も考えられ、この点の解明は今後の課題である。今後も鶏が保有する *Kluyvera* 属菌とプラスミド性 CTX-M 遺伝子を保有する腸内細菌の遺伝子を解析し、CTX-M 遺伝子の起源に関する知見を集積する必要がある。

参考文献

- 1) Bonnet R: Growing group of Extended-Spectrum β -lactamase, *Antimicrob. Agents. Chemother.*, **48**, 1, 2004, 1-14.
- 2) Olson AB, Silverman M, Boyd DA, et al : Identification of a progenitor of the CTX-M9 group of Extended-spectrum β -lactamases from *Kluyvera georgiana* isolated in Guyana, *Antimicrob. Agents. Chemother.*, **49**, 5, 2005, 2112-2115.
- 3) Poirel L, Kampfer P, Nordmann P : Chromosome-encoded ambler class A β -lactamase of *Kluyvera georgiana*, a probable progenitor of a subgroup of CTX-M extended-spectrum β -lactamases of *Kluyvera ascorbata*, probable progenitor of some plasmid-encoded CTX-M types, *Antimicrob. Agents. Chemother.*, **46**, 9, 2002, 3045-3049.
- 4) Decousser JW, Poirel L, Nordman P : Characterization of a chromosomally encoded extended-spectrum class A β -lactamase from *Kluyvera cryocrescens*, *Antimicrob. Agents. Chemother.*, **45**, 11, 2001, 3595-3598.
- 5) Humeniuk C, Arlet G, Gautier V, et al : β -lactamases of *Kluyvera ascorbata*, probable progenitors of some plasmid-encoded CTX-M types, *Antimicrob. Agents. Chemother.*, **46**, 12, 2002, 4038-4040.
- 6) Rodriguez MM, Power P, Radice M, et al : Chromosome-encoded CTX-M-3 from *Kluyvera ascorbata* : a possible origin of Plasmid-Borne CTX-M-1-derived Cefotaximases, *Antimicrob. Agents. Chemother.*, **48**, 12, 2004, 4895-4897.
- 7) 石畝 史, 永田暁洋, 鈴木里和 他: 福井県内における人および鶏肉由来基質特異性拡張型 β ラクタマーゼ産生大腸菌の分子疫学的解析, *日本獣医公衆衛生学会誌*, **63**, 2010, 883-887.
- 8) 石原ともえ, 古川一郎, 黒木俊郎 他: 市販鶏肉および市中病院外来患者における ESBL 産生菌の検出状況, *日本食品微生物学雑誌*, **28**, 2, 2011, 123-127.
- 9) Pagani L, Dell'Amico E, Roberta Migliavacca R, et al: Multiple CTX-M-Type Extended-Spectrum β -Lactamases in Nosocomial Isolates of *Enterobacteriaceae* from a Hospital in Northern Italy, *J. Clin. Microbiol.*, **41**, 9, 2003, 4264-4269.
- 10) Ferroni A, Sermet-Gaudelus I, Abachin E, et al : Use of 16S rRNA gene sequencing for identification of nonfermenting gram-negative bacilli recovered from patients attending a single cystic fibrosis center, *J. Clin. Microbiol.*, **40**, 10, 2002, 3793-3797.
- 11) Poirel P, Decousser JW, Nordmann P : Insertion sequence *ISEcp1B* is involved in expression and mobilization of a *bla*_{CTX-M} β -lactamase gene, *Antimicrob. Agents. Chemother.*, **47**, 9, 2003, 2938-2945.
- 12) Lartigue MF, Poirel L, Aubert D, et al : In Vitro analysis of *ISEcp1B*-mediated mobilization of naturally occurring β -lactamase gene *bla*_{CTX-M} of

Kluyvera ascorbata, Antimicrob. Agents. Chemother., **50**, 4, 2006, 1282-1286.

13) Nordmann P, Lartigue MF, poirel L : β -lactam induction of ISEcp1-mediated mobilization of the naturally occurring *bla*_{CTX-M} β -lactamase gene of *Kluyvera ascorbata*, FEMS Microbiol. Lett., **288**,

2, 2008, 247-249.

14) Arduino SM, Roy PH, Jacoby GA et al : *bla*_{CTX-M-2} is located in an unusual class 1 Integron (In35) which includes orf513, Antimicrob. Agents. Chemother., **46**, 7, 2002, 2303-2306.

表 1 CTX-M 遺伝子検出と型別用プライマー

名称	配列 (5'→3')	増幅断片
CTX-MU1	ATG TGC AGY ACC AGT AAR GT	
CTX-MU2	TGG GTR AAR TAR GTS ACC AGA	593 bp
CTX-M1GF	ATG GTT AAA AAA TCA CTG CG	
CTX-M1GR	TTA CAA ACC GTA GGT GAC	876bp
CTX-M2GF	ATG ATG ACT CAG AGC ATT CGC C	
CTX-M2GR	TCA GAA ACC GTG GGT TAC	876 bp
CTX-M9GF	ATG GTG ACA AAG AGA GTG CAA	
CTX-M9GR	TCA CAG CCC TTC GGC GAT	876 bp

表 2 鶏肉から分離された CTX-M 遺伝子陽性株

検体番号	品名	購入月日	検出株	CTX-M 遺伝子	菌株番号
4	岩手県産純白鶏モモ	6/24	<i>K. cryocrescens</i>	CTX-M1 Group	#4-1
7	岩手県産若鶏モモ挽肉	7/1	<i>E. coli</i>	CTX-M2 Group	#7-5-3
8	岩手県産若鶏モモ挽肉	7/8	<i>K. cryocrescens</i>	CTX-M1 Group	#8-1

表 3 鶏肉から分離された CTX-M 遺伝子陽性株の薬剤感受性

菌株番号	MIC μ g/ml							
	ABPC	CTX	CAZ	IPM	AZT	AMK	MINO	LVFX
<i>K. cryocrescens</i> #4-1	32	≤ 1	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.5	2	1	≤ 0.5
<i>E. coli</i> #7-5-3	>32	>32	1	>16	>32	>32	≤ 0.5	4
<i>K. cryocrescens</i> #8-1	32	4	4	≤ 0.5	16	2	≤ 0.5	≤ 0.5

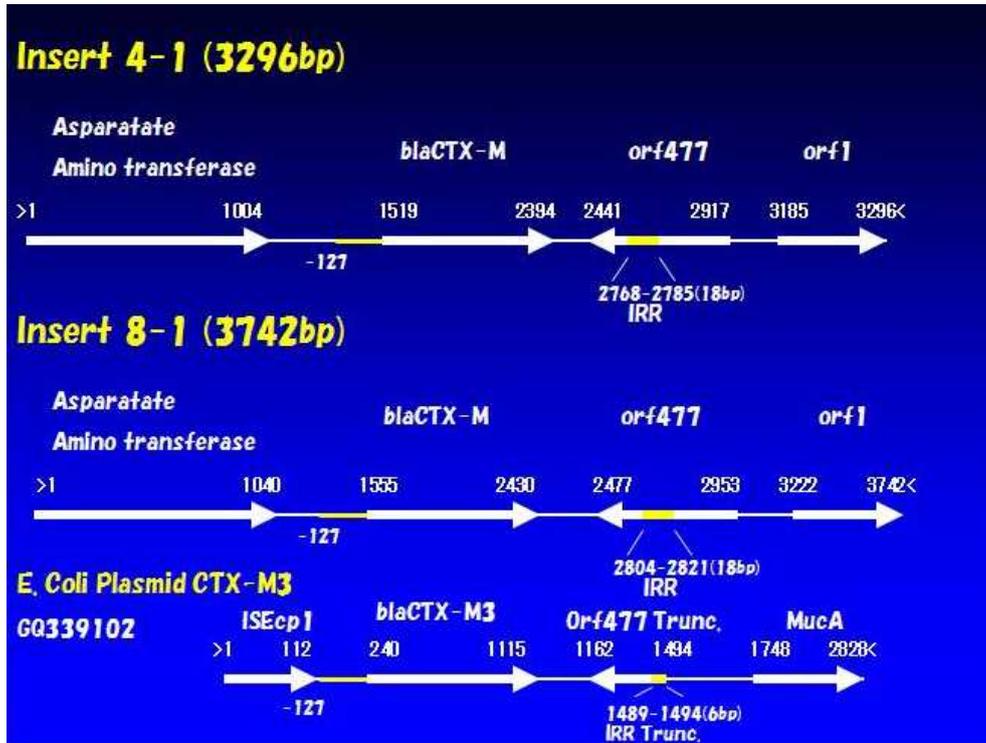


図1 Insert 4-1と Insert 8-1の DNA シークエンス解析結果

```

                -127
4-1  ATTTCAATTCGGTAATAAAATTTCAATTCCTGGCGACGTCGGTATTTGCCTTTCCGGAAGCATAA
8-1  ATTTCAATTCGGTAATAAAATTTCAATTCCTGGCGACGTCAGAATTTGCCTTTCCGGAAGCATAA
CTX-M3 ACACACGTTGGAATTTAGGTTTTCATTCCTGGCGACGTCGGTATTTGCCTTTCCGGAAGCATAA
      IRR ISEcp1 ***** * *****
4-1  AATCGGACGCGTTGTGGCTCGCTTCAGGTAAAATATTGACTATTCATGGTGTTGTTAATT
8-1  AATCGGACGCGTTGTGGCTCGCTTCAGGTAAAATATTGACTATTCATGGTGTTGTTAATT
CTX-M3 AATCGGACGCGTTGTGGCTCGCTTCAGGTAAAATATTGACTATTCATGGTGTTGTTAATT
      *****
4-1  CGTCTCTTCCAGAATAAGGAATCCCATG
8-1  CGTCTCTTCCAGAATAAGGAATCCCATG
CTX-M3 CGTCTCTTCCAGAATAAGGAATCCCATG
      ***** CTX-M Start Codon

```

図2 Insert 4-1, 8-1 CTX-M 遺伝子上流部と Plasmid CTX-M3 遺伝子上流部のシークエンス比較

CTM-X Stop Codon 60

4-1 TAATAGCGGAAACGGAATGGGGAAACTCATTCCGTTTTTGTATCGCCTTAGACGGCAA

8-1 TAGTTGCGGAAACGGAATGGGGAAACTCATTCCGTTTTTGTATCACCTCAGACGGCAA

E. coli plasmid CTX-M15 TAATAGCGGAAACGGAATGGGGAAACTCATTCCGTTTTTGTATCGCCTTAGACGGCAA

** * ***** **

361

4-1 GAGGGTGTGCGGTGCGGGGCGCACGTAGGTCCCTGGTTCCCATGGCAATAGCCAGACGTTGG

8-1 GAGGGTGTGCGGTGCGGGGCGCACATAGGTCCCAGGTTCC-ATGGCAATGGCCAGACGTTGG

E. coli plasmid CTX-M15 GAGGGTGTGCGGTGCGGGGCGCACGTAGGTCCCAGGTCATATTCCTTCCGGCGTCCGGCATT

***** **

Putative IRR from ISEcp1

図 3 Insert 4-1, 8-1 CTX-M 遺伝子下流部と Plasmid CTX-M15 遺伝子下流部のシーケンス比較

表 4 $bla_{CTX-M4-1}$ の Protein BLAST 解析結果

bla_{CTX-M}	Amino Acid identities
CTX-M3	290/291
CTX-M30	290/291
CTX-M15	289/291
CTX-M22	289/291

表 5 $bla_{CTX-M8-1}$ の Protein BLAST 解析結果

bla_{CTX}	Amino Acid Identities
CTX-M68	290/291
CTX-M10	289/291
CTX-M37	288/291
CTX-M34	288/291
CTX-M3	287/291

秋田県内の医療機関における CTX-M 基質拡張型 β -ラクタマーゼ (ESBL) 遺伝子保有株の分離状況

八柳 潤 今野貴之 齊藤志保子

平成 15 年から 23 年まで、県内の医療機関から受領した 963 株の ESBL 疑い株のうち、680 株が CTX-M 型 ESBL 遺伝子保有株であった。CTX-M 遺伝子保有株の 51.2%が *Escherichia coli*, 42.2%が *Proteus mirabilis* であり、この 2 菌種が CTX-M 型 ESBL 遺伝子陽性株の 93.4%を占め、また、66.8%が尿由来であった。181 株の CTX-M 遺伝子を型別した結果、CTX-M9 グループが 69 株と最も多く、CTX-M2 グループが 68 株と続き、CTX-M1 グループが 36 株であった。36 株の CTX-M1 グループ遺伝子保有株はすべて *E. coli* であり、CTX-M 遺伝子のシークエンスを解析した結果、すべて CTX-M15 であることが明らかとなった。秋田県内の医療機関に CTX-M 型 ESBL 産生株が広く侵淫していることが明らかとなった。とりわけ、CTX だけではなく CAZ にも耐性を獲得した CTX-M15 型 ESBL 遺伝子保有 *E. coli* が県内に侵淫していることを県内の医療機関に周知し、より適切な院内感染防止策の必要性を提起する必要がある。

1. 緒言

基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ (ESBL) とは、主にペニシリンを分解する ClassA β -ラクタマーゼである TEM-1, TEM-2, SHV-1 の基質特異性が、構造遺伝子の「ポイントミューテーション」により拡張し、第三世代のセフェム系抗生物質 (セフトキシム: CTX, セフトジム: CAZ 等) を分解する能力を獲得した β -ラクタマーゼを指す。また、これらと同様の基質特異性を有し、*Kluyvella* 属菌の染色体性 β -ラクタマーゼに由来する CTX-M 型 β -ラクタマーゼも ESBL とされている。ESBL 産生菌は昭和 58 年(1983 年)に世界で初めて Knothe らにより ESBL 産生 *Klebsiella pneumoniae* および *Serratia marcescens* として報告された¹⁾。日本においては平成 7 年に石井が Toho-1 型 (CTX-M 型) ESBL 産生 *Escherichia coli* を報告したのが最初である²⁾。日本では欧米と異なり TEM 型, SHV 型の ESBL 産生菌の報告は非常に少なく、CTX-M 型 ESBL 産生菌の分離頻度が高い。なお、近年、欧米においても TEM-型や SHV-型に代わり、CTX-M 型が ESBL の主流となってきた^{3,4)}。

地方衛生研究所においては、EHEC やサルモネラ、カンピロバクター等の腸管系細菌の侵淫実態や疫学についてはこれまでに各種の調査研

究を実施してきた実績があるが、ESBL を含む薬剤耐性菌の調査研究実績は乏しいのが現状である。

我々は、医療機関検査室からの要望に応じて平成 15 年 1 月から PCR 法による ESBL の確認を実施してきた。今回、平成 15 年 1 月から 23 年 8 月までに実施した ESBL 検査の結果、特に CTX-M 型 ESBL の分離状況等について報告する。

2. 方法

2.1 CTX-M 型 ESBL 遺伝子の検出

平成 15 年 1 月 24 日から平成 22 年 3 月 31 日までに県内の医療機関から合計 963 株の ESBL 疑い株が送付された。これらの株について TEM, SHV, CTX-M 遺伝子を標的とする PCR を実施した。CTX-M 遺伝子の検出には表 1 に示す Pagani ら⁵⁾が報告した CTX-MU1/CTX-MU2 プライマーを使用した。

2.2 CTX-M 遺伝子の型別

平成 22 年 9 月 13 日から 23 年 8 月 1 日に同定した 181 株の CTX-M 遺伝子陽性株について、表 1 に示すプライマーを使用する PCR により、CTX-M1 グループ, CTX-M2 グループ, CTX-M9 グループに型別した。CTX-M1 グループの株については、表 1 に示す CTX-M1GFJYM13Fmod ,

CTX-M1GRJYM13Rmod プライマーを使用する PCR により CTX-M 遺伝子全長を増幅し、シーケンスプライマー M13Fmod60, M13Rmod60 を使用して DNA シーケンスを決定し、BLAST により CTX-M 遺伝子の型を特定した。

3. 結果

3.1 秋田県における CTX-M 型 ESBL 遺伝子陽性株の検出状況

図 1 に平成 15 年 1 月 24 日から 22 年 12 月 31 日の CTX-M 遺伝子陽性株の検出状況を示す。平成 15 年から 22 年まで、医療機関から合計 963 株の ESBL 疑い株の検査依頼を受け、そのうち 680 株が CTX-M 型 ESBL 遺伝子陽性であった。この間、検査依頼数、CTX-M 遺伝子陽性株数共に増加傾向にあった。なお、TEM 型と SHV 型 ESBL 遺伝子陽性株は各 1 株 (TEM-104, SHV-12⁶⁾) 検出されたのみであった。

表 2 に CTX-M 型 ESBL 遺伝子陽性株の由来を示す。由来が記載されていた 301 株のうち、206 株 (68.4%) が尿由来株であり、CTX-M 型 ESBL 遺伝子陽性株が尿路感染に關与する頻度が高いことが示された。また、19 株が血液由来とされていることから、ESBL 遺伝子陽性株による敗血症患者が発生していることが伺われた。

表 3 に CTX-M 型 ESBL 遺伝子陽性株の菌種を示す。菌種が記載されていた 502 株のうち、*E.coli* が 257 株 (51.2%)、*P.mirabilis* が 212 株 (42.2%) であり、この 2 菌種が CTX-M 型 ESBL 遺伝子陽性株の 93.4% を占めていた。

3.2 CTX-M 遺伝子の型別結果

表 4 に 181 株の CTX-M 遺伝子の型別結果を示す。CTX-M9 グループが 69 株と最も多く、CTX-M2 グループが 68 株と続き、CTX-M1 グループが 36 株であった。また、今回使用したプライマーの CTX-M2 グループと CTX-M9 グループ両者に反応する株が 4 株、そしていずれとも反応しない型別不能の UT 株が 4 株認められた。CTX-M 型の分布には菌種により特徴的な傾向がみられ、*P.mirabilis* は 46 株中 45 株が CTX-M2 グループの ESBL 遺伝子を保有していたのに対して、*E.coli* では CTX-M1 グループ、CTX-M2 グループ、CTX-M9 グループ、CTX-M2/9 グループ、UT の全てが確認された。

CTX-M1 グループ 36 株について遺伝子全長の

シーケンスを決定して CTX-M 遺伝子の型を特定したところ、35 株の遺伝子が CTX-M15、1 株の遺伝子が CTX-M61 であることが判明した。データは示さないが、CTX-M15 型遺伝子保有株には KB 法による CAZ ディスクに対する阻止円の直径が 0 mm の株から 21 mm の株までが認められ、CTX-M15 遺伝子保有株の CAZ 耐性は、株により異なることが示された。

4. 考察

近年、CTX-M 型 ESBL が世界的に ESBL の主流となっている^{3,4)}。今回、我々は秋田県内の医療機関に CTX-M 型 ESBL 遺伝子保有株が既に広く侵淫していること、そして分離株数が平成 15 年以降、顕著に増加していることを示した。供試株に占める CTX-M 型 ESBL 遺伝子陽性株の割合は、平成 15 年には約 45% であったのに対して、22 年には約 86% となった。これは、ESBL 産生株が薬剤耐性菌として注目された平成 15 年当時は、医療機関において未だバイテックなどの自動同定装置による ESBL のスクリーニング検査法が普及していなかったことに起因すると推察される。現在は、クラブラン酸の阻害効果を利用した ESBL スクリーニング検査法が医療機関検査室に普及し、ESBL 産生疑い株を効率よく特定できると考えられる。なお、ESBL 産生が疑われながら、TEM, SHV, CTX-M 遺伝子のいずれも検出されなかった株の菌種は *Serratia marsecens*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii* などであり、これらは AmpC の過剰産生など、ESBL 産生とは異なる機構により CTX, CAZ などに耐性を示すと考えられる。

ESBL 産生菌感染のリスクファクターについて、Pena らは疾病の重症度、ICU および長期入院、気管内挿管、人工呼吸、カテーテルの挿入などが關与することを指摘している⁷⁾。今回、我々は ESBL 遺伝子保有株の由来として尿が最も高頻度であることを示した。尿由来とした株について、医療機関から菌株に添付された情報を詳細にみると、その多くがカテーテル尿由来である。尿道カテーテル留置患者の多くは高齢の長期入院患者であると推察され、我々の結果もこれらの患者が ESBL 産生株感染のハイリスク群であることを裏付けると考えられる。

今回の成績から秋田県では CTX-M 型 ESBL 遺

伝子保有株の 51.2%を *E.coli*, 42.2%を *P.mirabilis* が占め、これら 2 菌種が全体の 93.4%を占めることが示された。Shibata らが平成 13 年から 15 年に全国調査をした成績⁸⁾においても類似の傾向がみられ、CTX-M 型 ESBL 遺伝子保有株のうち分離数が多い菌種は上位から *E.coli*, *P.mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae* であり、CTX-M 型 ESBL 産生菌の中で *P.mirabilis* が *E.coli* に次いで分離頻度が高い。*P. mirabilis* は主に尿路感染症を引き起こす病原微生物である⁹⁾が、ampicillin をはじめとする β -lactam 薬に対する感受性が良好であること、重篤な感染症の原因菌となる頻度が低いことなどから臨床にあまり重要視されてこなかった。しかし、CTX-M2 型 ESBL 産生 *P. mirabilis* による院内感染も報告¹⁰⁾されており、今後院内感染起因菌としても注目すべき菌種と考えられる。

CTX-M 遺伝子はアミノ酸配列の相同性から CTX-M1 グループ、CTX-M2 グループ、CTX-M8 グループ、CTX-M25 グループ、そして CTX-M9 グループに分類される³⁾。これらのうち、CTX-M8 グループには 1 種類、CTX-M25 グループには 2 種類の型しか属さない。このため、我々は CTX-M1, M2, M9 グループと特異的に反応するプライマーを設計して、平成 22 年 9 月 13 日から 23 年 8 月 1 日に同定した CTX-M 遺伝子陽性株 181 株について CTX-M 遺伝子を型別した。その結果、*P.mirabilis* は 46 株中 45 株が CTX-M2 グループ遺伝子を保有していた。Shibata らの報告⁸⁾においても、供試した *P.mirabilis* 71 株全てが CTX-M2 グループ遺伝子を保有することが示されている。一方、大腸菌には CTX-M1 グループ、CTX-M2 グループ、CTX-M9 グループに加えて、今回供試したプライマーのいずれとも反応しない株 (UT) がみられた。これらのうち、UT となった株の遺伝子は CTX-M8 グループか CTX-M25 グループに属する可能性があり、その同定は今後の課題である。また、CTX-M2/9 となった遺伝子についても、遺伝子型を特定するために全長をシーケンスする必要がある。

一方、CTX-M1 グループに型別された 36 株のうち、35 株が CTX-M15 であること、1 株が CTX-M61 であることが判明した。CTX-M 型 ESBL 産生株は通常、CTX に耐性を示すが CAZ には感受性である。しかし、CTX-M15 は CTX-M3

がポイントミューテーション (D240G 変異) により基質特異性が拡張し、CAZ 加水分解能を獲得した CTX-M 型 ESBL であり^{11,12)}、近年、ヨーロッパにおいて問題となっている¹³⁾。国内においても少数の報告^{14,15)}があるが、現時点では問題視されるには至っていない。今回我々の検討により、CTX-M15 型 ESBL 産生菌が秋田県に既に侵淫していることが示された。この菌は臨床に汎用されている CAZ に耐性を示すことから、通常の CTX-M 型 ESBL 産生菌よりも臨床問題となる。確認された CTX-M15 型 ESBL 産生菌は全て大腸菌であり、県央の医療機関において最も多く分離されているが、県北、県南、本荘由利地域の医療機関においても分離されていることから、県内に広く侵淫していることが明らかとなった。CTX-M15 遺伝子保有株の CAZ 耐性は株により異なる傾向がみられた。その原因は明らかではないが、CTX-M15 遺伝子保有株は *ISEcp1B* 遺伝子を保有し、これがプロモーターとして機能し、CTX-M15 遺伝子の発現に関与している¹⁶⁾ことから、この調整機構がその耐性発現の違いに関与する可能性も考えられ、今後の検討が必要である。なお、CTX-M61 は CAZ 耐性に関与する D240G 変異を保有せず、CTX-M1 遺伝子に 1 か所の変異が生じて派生したタイプである。

5. まとめ

秋田県内の医療機関に CTX-M 型 ESBL 産生株が広く侵淫していることが明らかとなった。CTX-M 型 ESBL 産生菌は主として尿路感染を惹起していたことから、今後も院内感染起因菌として注目する必要がある。とりわけ、CTX だけではなく CAZ にも耐性を獲得した CTX-M15 型 ESBL 遺伝子保有株が県内に侵淫していることを県内の医療機関に周知し、より適切な院内感染防止策の必要性を提起する必要がある。

CTX-M15 を含む CTX-M 型 ESBL 遺伝子保有株が県内の健常人に侵淫しているかどうか、そして市販食品に分布しているかどうかなど、感染疫学解明のためのさらなる検討が必要である。

参考文献

- 1) Knothe H, Shah P, Krcmery V, et al.: Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin,

- cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumonia* and *Serratia marcescens*, *Infection*, **11**, 6, 1983, 315-317.
- 2) Ishii Y, Ohno A, Taguchi H, et al.: Cloning and sequence of the gene encoding a cefotaxime-hydrolyzing class A beta-lactamase isolated from *Escherichia coli*, *Antimicrob. Agents. Chemother.*, **39**, 10, 1995, 2269-2275.
 - 3) Bonnet R: Growing group of Extended-Spectrum beta-lactamase, *Antimicrob. Agents. Chemother.*, **48**, 1, 2004, 1-14.
 - 4) Canton R, Coque TM: The CTX-M beta-lactamase pandemic, *Current Opinion in Microbiology*, **9**, 5, 2006, 466-475.
 - 5) Pagani L, Dell'Amico E, Roberta Migliavacca R, et al.: Multiple CTX-M-Type Extended-Spectrum beta-Lactamases in Nosocomial Isolates of *Enterobacteriaceae* from a Hospital in Northern Italy, *J. Clin. Microbiol.*, **41**, **9**, 2003, 4264-4269.
 - 6) 今野貴之, 八柳潤, 齊藤志保子, 小沼譲 他: 秋田県において初めて確認された SHV-12 型 ESBL 産生大腸菌について, *病原微生物検出情報*, **31**, 7, 2010.
 - 7) Pena C, Pujol M, Ricart A, et al.: Risk factors for faecal carriage of *Klebsiella pneumoniae* producing extended spectrum beta-lactamase (ESBL-KP) in the intensive care unit, *J. Hosp. Infect.*, **35**, 1, 1997, 9-16.
 - 8) Shibata N, Kurokawa H, Doi Y, et al.: PCR classification of CTX-M-type beta-lactamase genes identified in clinically isolated gram-negative bacilli in Japan, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **50**, 2, 2006, 791-795.
 - 9) Rozalski A, Sidoreczyk Z, Kotelko K: Potential virulence factors of *Proteus* bacilli, *Microbiol Mol Biol Rev*, **61**, 1, 1997, 65-89.
 - 10) Nagano N, Shibata N, Saitou Y, et al.: Nosocomial outbreak of infections by *Proteus mirabilis* that produces extended-spectrum CTX-M-2 type beta-lactamase, *J Clin Microbiol.*, **41**, 12, 2003, 5530-5536.
 - 11) Karim A, Poirel L, Nagarajan S et al.: Plasmid-mediated extended-spectrum beta-lactamase (CTX-M-3 like) from India and gene association with insertion sequence ISEcp1, *FEMS Microbiology Letters*, **201**, 2, 2001, 237-41.
 - 12) Poirel L, Gniadkowski M, Nordmann P: Biochemical analysis of the ceftazidime-hydrolysing extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-15 and of its structurally related beta-lactamase CTX-M-3, *J. Antimicrob. Chemother.* **50**, 6, 2002, 1031-1034
 - 13) Brigante G, Luzzaro F, Perilli M, et al.: Evolution of CTX-M-type beta-lactamases in isolates of *Escherichia coli* infecting hospital and community patients, *Int. J. Antimicrob. Agents*, **25**, 2, 2005, 157-162.
 - 14) 大隈雅紀, 村谷哲郎, 松本哲朗 他: UOE-1 (CTX-M-15) type beta-lactamase 産生 *Escherichia coli* による敗血症患者の臨床経過と細菌学的検討, *日本化学療法学会雑誌*, **52**, 4, 2004, 223-227.
 - 15) 村谷哲郎, 小林とも子, 後藤令子 他: 基質特異性拡張型 beta-lactamase 産生 *Escherichia coli* に対する各種抗菌薬の抗菌力, *日本化学療法学会雑誌*, **52**, 10, 2004, 556-567.
 - 16) Poirel L, Decousser JW, Nordman P: Insertion sequence ISEcp1B is involved in expression and mobilization of a *bla*_{CTX-M} beta-lactamase gene, *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 9, 2003, 2938-2945.

表 1 CTX-M 遺伝子検出，型別，シーケンス用プライマー

名称	配列 (5'→3')	増幅断片
CTX-MU1	ATG TGC AGY ACC AGT AAR GT	
CTX-MU2	TGG GTR AAR TAR GTS ACC AGA	593 bp
CTX-M1GF	ATG GTT AAA AAA TCA CTG CG	
CTX-M1GR	TTA CAA ACC GTA GGT GAC	876 bp
CTX-M2GF	ATG ATG ACT CAG AGC ATT CGC C	
CTX-M2GR	TCA GAA ACC GTG GGT TAC	876 bp
CTX-M9GF	ATG GTG ACA AAG AGA GTG CAA	
CTX-M9GR	TCA CAG CCC TTC GGC GAT	876 bp
CTX-M1GFJYM13Fmod	TT AC TGT AAA ACG ACG GCC AGT ATG GTT AAA AAA TCA CTG CGY C	
CTX-M1GRJYM13Rmod	TT AC CAG GAA ACA GCT ATG ACC TTA CAA ACC GTC GGT GAC GAT	920 bp
M13Fmod60	AC TGT AAA ACG ACG GCC AGT	—
M13Rmod60	AC CAG GAA ACA GCT ATG ACC	—

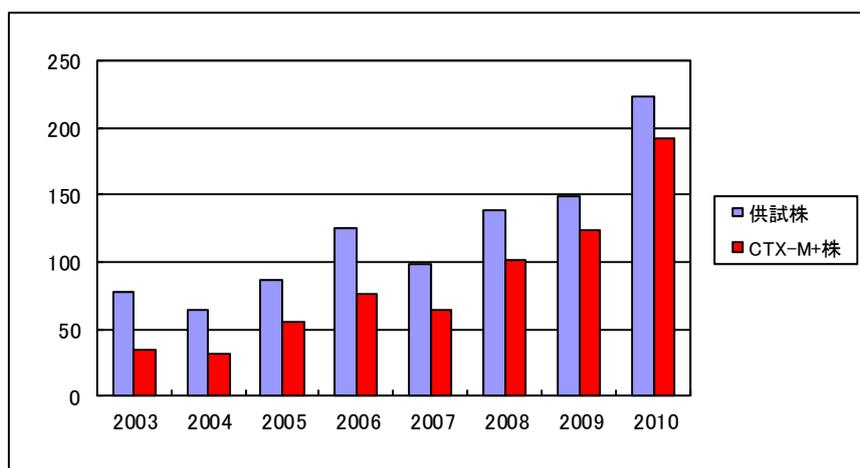


図 1 秋田県における CTX-M 遺伝子陽性株の検出状況 (2003. 1. 24-2010. 12. 31)

表 2 CTX-M 遺伝子陽性株 (680 株) の由来

由来	株数	由来	株数
不明	379	膿	3
尿	206	腹水	3
喀痰	41	胆汁	2
血液	19	咽頭	1
膿	11	子宮	1
便	4	耳漏	1
創部	4	髄液	1
浸出液	3	泌尿器	1

表 3 CTX-M 遺伝子陽性株 (680 株) の菌種

菌種	株数	菌種	株数
菌種不明	178	<i>K.oxytoca</i>	1
<i>E.coli</i>	257	<i>E.aerogenes</i>	1
<i>P.mirabilis</i>	212	<i>Providencia spp.</i>	1
<i>K.pneumonia</i>	22	<i>Klebsiella spp.</i>	1
<i>P.stuatii</i>	4	<i>C.broakii</i>	1
<i>P.vulgaris</i>	1	<i>M.morganii</i>	1

表 4 CTX-M 遺伝子の型別結果

菌種	CTX-M 型					計
	1	2	9	2/9	UT	
<i>E. coli</i>	36	12	49	4	2	103
<i>P. mirabilis</i>		45			1	46
<i>K. pneumoniae</i>		3				3
<i>C. broakii</i>		1				1
<i>M. morganii</i>		1				1
菌種不明		6	20		1	7
計	36	68	69	4	4	181

秋田県の1医療機関で分離された多剤耐性 *Achromobacter xylosoxidans* の分子疫学性状と Class 1 Integron の解析

八柳 潤 今野貴之 齊藤志保子

平成15年7月から18年9月に秋田市内の1医療機関からメタロβラクタマーゼ産生が疑われる14株のブドウ糖非発酵性グラム陰性桿菌が送付された。これらの分離株はいずれもIMP-1遺伝子を保有する多剤耐性 *Achromobacter xylosoxidans* であることが判明したので、分子疫学的性状と耐性遺伝子の性状について基礎的な検討を実施した。*Xba*I PFGE パターンから分離株は同一起源と判断し得た。分離株が保有する Class 1 Integron のサイズは、株により約2.5Kb単独、約3Kb単独、約2.5Kbダブルット、約1.3Kbと2.5Kbであった。4株の Class 1 Integron のシークエンスを決定した結果、IMP-1, *aacA4*, *aadA5* を含む Gene Casette が同一 Class 1 Integron 中や、異なる Integron 間で組換え・転移した可能性が示唆された。今回供試した多剤耐性 *A. xylosoxidans* の多くが尿由来株であり、一医療機関において継続的に分離されたことは、*A. xylosoxidans* を院内感染起因菌として注視する必要があることを示唆している。今後も秋田県内における多剤耐性 *A. xylosoxidans* の動向に注視する必要があると共に、分離株の多剤耐性機構についてさらなる検討が必要である。

1. 緒言

Achromobacter xylosoxidans は好気性、ブドウ糖非発酵性、グラム陰性桿菌であり、Immuno-compromised host に敗血症、髄膜炎、肺炎、尿路感染などを惹起^{1,2)}する日和見感染菌である一方、嚢胞性線維症 (Cystic Fibrosis) 患者からも分離される³⁾。*A. xylosoxidans* は各種の抗生物質に耐性を示す傾向がある⁴⁾がIMP-10⁵⁾、VIM-1⁶⁾、VIM-2⁷⁾、などのメタロβラクタマーゼを産生する株も報告されており、これらの株はカルバペネムを含むβ-ラクタム薬に多剤耐性となる。

平成15年7月から18年9月に秋田市内の1医療機関からメタロβラクタマーゼ産生が疑われる14株のブドウ糖非発酵性グラム陰性桿菌が送付され、これらの分離株がいずれもIMP-1遺伝子を保有する *A. xylosoxidans* であることが判明した。今回は、これらの株の分子疫学的性状と耐性遺伝子の性状について基礎的な検討を実施したので、その結果を報告する。

2. 方法

表1に平成15年7月から18年9月に秋田市内の1医療機関で分離され、当所に送付された14株の *A. xylosoxidans* 供試株一覧を示す。14株中6

株は尿由来であるが、残りの株の由来は不明であった。IMPとVIM遺伝子はPCRにより検出した⁸⁾。分離株の薬剤感受性はKBディスク法とドライプレート(栄研化学)により検討した。

A. xylosoxidans 分離株の *Xba*I PFGE パターンは、Tenaらの報告⁹⁾に従って実施した。

Class 1 Integron の5' conserved region と3' conserved region に設定した既報⁸⁾のプライマーを使用して Class 1 Integron を増幅し、アガロースゲル電気泳動により増幅されたインテグロンの数とサイズを推定した。また、Mβ-127, 140, 156, 161株については、プライマーウォーキング法により増幅されたインテグロンのシークエンスを決定した。

3. 結果と考察

表1に示すように、*A. xylosoxidans* は秋田市内の某医療機関から89歳女性の尿由来株が平成15年7月17日に初めてメタロβラクタマーゼ遺伝子の確認目的で送付されて以降、平成15年に3株、16年に5株、17年に3株、18年に3株送付された。送付されたこれらの14株は、全てIMP遺伝子を保有していた。14株のうち、7株について患者の年齢性別が示され、それらはいずれも77歳以上の高齢者であった。また、6株について

由来が記載されており、それらはいずれも尿由来であったことから、当該病院において高齢患者が *A. xylosoxidans* による尿路感染を発症していたものと推察された。14 株は全て、KB 法により ABPC, CAZ, CET, CFP, CFX, CTX, EM, FOM, IPM, KM, NFLX, TC に耐性であることが示された。14 株のうち、平成 18 年 8 月 8 日に送付された 80 歳女性の尿由来 Mβ-156 株についてドライプレートを使用して MIC を測定したところ、表 2 に示すように、LVFX にのみ中等度耐性である以外、被検抗生物質全てに耐性であることが示された。以上の結果から、秋田市内の同一医療機関で平成 15 年から 18 年にかけて断続的に分離された *A. xylosoxidans* は、全て IMP 遺伝子を保有し、β-ラクタム、マクロライド、モノバクタム、カルバペネム、アミノグリコシド、ニューキノロン、テトラサイクリン、ホスホマイシンに耐性を示す多剤耐性菌であることが示された。

図 1 に 14 株の *Xba*I PFGE パターンと、保有する Class 1 Integron の Size を示す。分離株の *Xba*I PFGE パターンは非常に類似しており、Tenover の Criteria¹⁰⁾では同一起源と判断し得たが、パターンには微妙な違いが認められ、その違いに基づき、パターンを A から D に分類した。分離株が保有する Class 1 Integron のサイズは、約 2.5 Kb 単独 (Mβ-72, 82, 161), 約 3 Kb 単独 (Mβ-140, 156), 約 2.5 Kb ダブルレット (Mβ-31, 38), 約 1.3Kb と 2.5 Kb (Mβ-51, 61, 64, 65, 85, 125, 127) であり、PFGE パターンと保有 Class 1 Integron の種類に関連は認められなかった。

これらの株が保有する Class 1 Integron の構造を詳細に検討するために、Mβ-127 (約 1.3 Kb, 2.5 Kb), Mβ-140, 156 (約 3 Kb 単独), Mβ-161 (約 2.5 Kb) の Class 1 Integron のシーケンスを決定した。表 3 に示すように、Mβ-127 は 2,451 bp の Class 1 Integron (IntMβ127) と 1,295 bp の Class 1 Integron (IntMβ127S) を保有し、IntMβ127 は 5CS と 3CS の間に IMP-1 と aadA5 の Gene Cassette をコードし、また、IntMβ127S は aacA4 の Gene Cassette をコードしていた。Mβ161 は 2,452 bp の IntMβ161 を保有し、この Class 1 Integron は IMP-1 と aadA5 の Gene Cassette を保有していた。データは示さないが、Mβ161 は PCR でも aacA4 が検出されなかったことから、この株は aacA4 遺伝子を保有していないことが確かめら

れた。これに対して、Mβ161 と同様に約 2.5 Kb の Class 1 Integron を保有する Mβ-72 と Mβ-82 株はいずれも PCR で aacA4 が検出されたことから、これらの 2 株は Mβ-161 と異なる class 1 Integron を保有する可能性があり、その構造の解明は今後の課題である。Mβ-140 と Mβ-156 はいずれも 3,055 bp の Class 1 Integron (IntMβ-140, IntMβ-156) を保有し、IMP-1, aacA4, aadA5 の Gene Cassette をコードしていたが、Class 1 Integron 中の IMP-1 と aacA4 Gene Cassette の順番が異なっていた。データは示さないが、これらの 14 株は Mβ-161 を除き、いずれも PCR で aacA4, aadA5, IMP が陽性であったことから、これらの株はこの 3 遺伝子を含む Gene Cassette をコードする Class 1 Integron を保有しているものと推察される。今回、代表株の Class 1 Integron のシーケンスを決定した結果は、これらの 3 遺伝子を含む Gene Cassette が同一 Class 1 Integron 中や、異なる Integron 間で組換え・転移した可能性を示唆しており興味深い。残りの 10 株についても Class 1 Integron のシーケンスを決定し、その構造を解明する必要がある。

今回我々が検討した *A. xylosoxidans* は、14 株全て供試した β-ラクタム、マクロライド、モノバクタム、カルバペネム、アミノグリコシド、ニューキノロン、テトラサイクリン、ホスホマイシンに耐性を示す多剤耐性株であった。*A. xylosoxidans* の薬剤耐性機構には IMP-10⁵⁾, VIM-1⁶⁾, VIM-2⁷⁾, などのメタロ β ラタマーゼ、VEB-1 ESBL¹¹⁾, OXA-114¹²⁾などが関与することが報告されている。また、今回、我々はアミノグリコシド修飾酵素遺伝子である aadA5, aacA4 の存在を示した。しかしながら、*A. xylosoxidans* の多剤耐性機構の詳細は明らかになっていない。実際、これらの薬剤耐性遺伝子の存在のみで我々が検討した多剤耐性株の耐性機構を説明することは困難であると考えられ、広域な耐性スペクトルをもたらす耐性機構が同時に関与する可能性が推察される。*A. xylosoxidans* の多剤耐性機構として、平成 23 年 (2011 年) に Amoureux ら¹³⁾は初めて RND 型の多剤排出ポンプの関与を報告した。多剤排出ポンプは *Pseudomonas aeruginosa* の多剤耐性機構に関与することも知られており¹⁴⁾、今回、我々が検討した多剤耐性 *A. xylosoxidans* の多剤耐性機構にも多剤排出ポンプが関与する

かどうかに興味を持たれる。多剤排出ポンプの関与は MC-04,124 等の Efflux Pump Inhibitor (EPI) を使用することにより証明し得る¹⁴⁾ので、今後検討する必要がある。

4. まとめ

A. xylosoxidans は日和見感染菌であるとされている。今回、秋田県内の 1 医療機関で平成 15 年から 18 年にかけて多剤耐性 *A. xylosoxidans* が分離され、感染高齢者が尿路感染を発症していたことが示唆された。このことは、*A. xylosoxidans* は院内感染起因菌として注目すべき菌であることを示唆していると考えられる。今後も秋田県内における多剤耐性 *A. xylosoxidans* の動向に注視する必要があると共に、分離株の多剤耐性機構についてさらなる検討が必要である。

参考文献

- 1) Tena D, Gonzalez-Praetorius A, Perez-balsalobre M et al.: Urinary tract infection due to *Achromobacter xylosoxidans* : report of 9 cases. Scand. J. Infect. Dis., **40**, 2, 2008, 84-87.
- 2) Gomez-Cerezo J, Saurez I, Rios J et al.: *Achromobacter xylosoxidans* bacteremia : a 10-year analysis of 54 cases, Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., **22**, 6, 2003, 360-363.
- 3) Saiman L, Siegel J : Infection control in cystic fibrosis. Clin. Microbiol. Rev., **17**, 1, 2004, 57-71.
- 4) Sader HS, Jones RN: Antimicrobial susceptibility of uncommonly isolated non-enteric gram-negative bacilli, Int. J. Antimicrob. Agents, **25**, 2, 2005, 95-109.
- 5) Iyobe S, Kusadokoro H, Takahashi A et al: Detection of a variant metallo-β-lactamase, IMP-10, from two unrelated strains of *Pseudomonas aeruginosa* and an *Alcaligenes xylosoxidans* strain, Antimicrob. Agents Chemother., **46**, 6, 2002, 2014 - 2016.
- 6) Riccio ML, Pallecchi L, Fontana R et al: In70 of plasmid pAX22, a *bla*_{VIM-1}-containing integron carrying a new aminoglycoside phosphotransferase gene cassette, Antimicrob. Agents Chemother., **45**, 4, 2001, 1249 - 1253.
- 7) Shin KS, Han K, Lee J et al: Imipenem-resistant *Achromobacter xylosoxidans* carrying *bla*_{VIM-2}-containing class 1 integron. Diagn. Microbiol. Infect. Dis., **53**, 3, 2005, 215-220.
- 8) Jun Yatsuyanagi, Shioko Saito, Seizaburo Harata, et al: Class 1 Integron Containing Metallo-β-Lactamase gene *bla*_{VIM-2} in *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Strains Isolated in Japan. Antimicrob. Agents Chemother., **48**, 2, 2004, 626 - 628.
- 9) Tena D, Carranza, R, Barbera JR et al: Outbreak of long-term intravascular catheter-related bacteremia due to *Achromobacter xylosoxidans* subspecies *xylosoxidans* in a hemodialysis unit, Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., **24**, 11, 2005, 727-732.
- 10) Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV et al: Interpreting Chromosomal DNA Restriction Patterns Produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Criteria for Bacterial Strain Typing, J. Clin. Microbiol. **33**, 9, 1995, 2233-2239.
- 11) Neuwirth C, Freby C, Ogier-Desserrey A, et al: VEB-1 in *Achromobacter xylosoxidans* from cystic fibrosis patient, France. Emerg. Infect. Dis., **12**, 11, 2006, 1737-1739.
- 12) Doi Y, Poirel L, Paterson DL, et al.: Characterization of a naturally occurring class D β-lactamase from *Achromobacter xylosoxidans*. Antimicrob. Agents Chemother., **52**, 6, 2008, 1952 - 1956.
- 13) Amoureux BJ, Dues JM, Drabowicz A, et al: First description of a RND-type multidrug efflux pump in *Achromobacter xylosoxidans*: AxyABM, Antimicrob. Agents Chemother., 2011, E-pub.
- 14) Kriengkauykiat J, Porter E, Lomovskaya O, et al: Use of efflux pump inhibitor to determine the prevalence of efflux pump-mediated fluoroquinolone resistance and multidrug resistance in *Pseudomonas aeruginosa*, Antimicrob. Agents Chemother., **49**, 2, 2005, 565-570.

表1 供試した IMP 遺伝子陽性 *A. xylosoxidans* 一覧

菌株番号 (Mβ-)	受付年月日	年齢性別	由来
31	H15.7.17	89F	尿
8	H15.10.6		尿
51	H15.11.14		
61	H16.1.16	77M	尿
64	H16.2.6	87F	尿
65	H16.2.18	84F	尿
72	H16.4.2	78M	
82	H16.7.7		
95	H17.1.12		
125	H17.9.26		
127	H17.9.29		
140	H18.1.16		
156	H18.8.8	80F	尿
161	H18.9.5	98F	

表2 Mβ-156 株の薬剤感受性 (MIC μ g/ml)

ABPC	>32	FMOX	>32	AMK	>32
PIPC	64	CPDX	>8	MINO	>16
CEZ	>32	AZT	>32	FOM	>32
CTM	>32	IPM	>16	ST	>76/4
CAZ	>32	MEPM	>16	LVFX	4 (I)
CCL	>32	GM	>16	CPFX	4 R

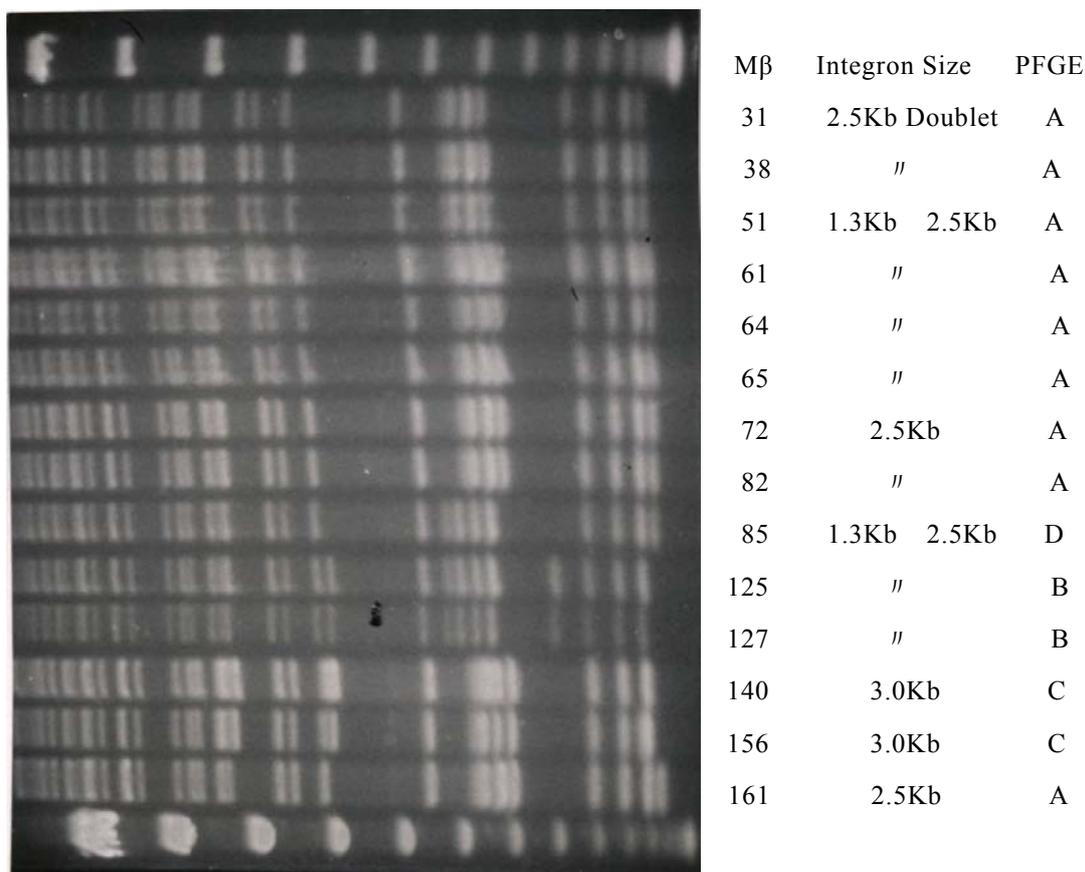


図1 *A. xylosoxidans* 14株の *Xba*I PFGEパターンと保有するインテグロンの概要

表3 DNAシーケンス解析から決定したインテグロンの構造

菌株番号	名称	サイズ	インテグロン構造
Mβ127	IntMβ-127	2,451bp	5CS-IMP-1-aadA5-3CS
	IntMβ-127S	1,295bp	5CS-aacA4-3CS
Mβ161	IntMβ-161	2,452bp	5CS-IMP-1-aadA5-3CS
Mβ156	IntMβ-156	3,055bp	5CS-IMP-1-aacA4-aadA5-3CS
Mβ140	IntMβ-140	3,055bp	5CS-aacA4-IMP-1-aadA5-3CS

秋田県における非定型的下痢原性大腸菌の分離状況と *astA* 保有大腸菌 (EAST1EC) における病原因子保有状況

今野貴之 八柳 潤 齊藤志保子

astA 保有大腸菌 (EAST1EC), 分散接着性大腸菌 (DAEC), 細胞剥脱性大腸菌 (CDEC) といった非定型的下痢原性大腸菌について, 秋田県内における健康被害の実態を把握するため, 県内医療機関等において散発下痢症患者から分離された下痢原性大腸菌疑い株を用いて, その分離状況を調査した。また, EAST1EC は分離された菌株によって病原性に違いがあることや, 健康者からも多数分離されることが指摘されているため, *astA* 以外の病原因子が EAST1EC の病原性に重要な役割をしている可能性を考え, これまでに下痢原性大腸菌で報告されている様々な病原因子の保有状況も併せて調査した。調査の結果, EAST1EC に関しては平成 19 年から 21 年の 3 年間で 35 株の分離が確認された。一方, DAEC および CDEC に関しては, 平成 22 年の下痢原性大腸菌疑い株について調査したが, 分離は確認されなかった。また, EAST1EC の病原因子の保有状況の調査では, 35 株中 24 株で何らかの付着因子, 3 株で毒性に関わる α 溶血素, 24 株でヒト体内での菌の増殖に参与する siderophore が検出された。これらの結果から, 非定型的下痢原性大腸菌のうち, EAST1EC に関しては, 県内でも散発の下痢症患者から分離されることが確認され, 分離された EAST1EC の一部は, 様々な病原因子を保有し, ヒトに下痢症を惹起する可能性があることが示唆された。

1. はじめに

ヒトに下痢を惹起させる大腸菌は下痢原性大腸菌と総称され, 病原性の違いにより腸管出血性大腸菌 (EHEC), 腸管病原性大腸菌 (EPEC), 腸管侵入性大腸菌 (EIEC), 毒素原性大腸菌 (ETEC), 腸管集合性大腸菌 (EAggEC) の 5 つに大別される¹⁾。しかしながら, 最近の研究により大腸菌の新たな病原因子となりうる種々の遺伝子が報告され, 必ずしも上記の 5 つにあてはまらない病原型の大腸菌の存在が示唆されている²⁾。これら的大腸菌によって食中毒等が発生した場合には, 原因不明となり適切な衛生改善指導や医療機関における治療法の選択等に支障をきたす可能性があり, 問題となっている。そこで, *astA* 保有大腸菌 (EAST1EC), 分散接着性大腸菌 (DAEC) および細胞剥脱性大腸菌 (CDEC) といった非定型的下痢原性大腸菌による健康被害の実態を把握するため, 県内における分離状況を調査した。

また, 特に EAST1EC では, これまでに数例の集団下痢症事例の報告があるにも関わらず,

分離される菌株によって病原性が異なることや, 健康者からも多数分離されることが指摘されている。今回, 我々は EAST1EC の病原性には *astA* 以外の病原因子も関わっていることを予想し, 県内で分離された EAST1EC に関して, DAEC や CDEC の病原因子も含め, これまでに下痢原性大腸菌で報告されている様々な病原因子の保有状況を調査した。

2. 方法

2.1 実験材料

EAST1EC に関しては, 平成 19 年 1 月から平成 21 年 12 月までに秋田県内医療機関等から送付された下痢原性大腸菌疑い株計 2,168 株を調査対象とした。

DAEC および CDEC に関しては, 平成 22 年に同様に得られた下痢原性大腸菌疑い株 769 株のうち, 各下痢原性大腸菌の主要な病原因子を保有せず, 溶血性の確認された 55 株を調査対象とした。

2.2 実験方法

2.2.1 非定型的下痢原性大腸菌の同定

EAST1ECは通常の下痢原性大腸菌が保有する主要な病原因子を持たず、EAST1 遺伝子 (*astA*) を持つ大腸菌として定義される³⁾。そのため、EAST1ECの同定には、PCR法により*astA*の検出を行うと同時に、各下痢原性大腸菌の主要な病原因子、すなわち腸管出血性大腸菌の*stx*、腸管病原性大腸菌の*eaeA*、腸管侵入性大腸菌の*invE*、毒素原性大腸菌の*est* および *elt*、腸管集合性大腸菌の*aggR*を標的にしたPCRを行い、各病原因子の保有の有無を確認した。DAECおよびCDECについては、病原性の指標となる溶血性を確認し、*hlyA*についてPCRによる検出を行った。*hlyA*陽性株について、さらにこれらの病原型に特徴的な病原因子と推定されている*daa*、*aid*、*cdtB*についてPCRによる検出を行った。

2.2.2 EAST1ECの病原因子プロファイル

細菌の病原性に重要な付着性に関わる因子として*iha*、*lpfA*、*ldaG*、*pilS*、*pic*、*daa*、*aah*、*aid*の8遺伝子、毒素因子として*pet*、*cdtB*、*hlyA*の3遺伝子、腸管内での増殖性に関わる因子として*irp2*、計12種類の病原因子についてPCRにより検出を行った。

3. 結果と考察

3.1 非定型的下痢原性大腸菌の分離状況

EAST1ECに関しては、平成19年の833株中7株、平成20年の725株中15株、平成21年の610株中13株を同定した。

DAECおよびCDECについては、平成22年の下痢原性大腸菌疑い株のうち、溶血性の確認された55株を対象に共通の病原因子である*hlyA*の検出を行い、28株についてその保有を確認した。しかしながら、その28株については特徴的な病原因子である*daa*、*aid*および*cdtB*は検出されず、DAECおよびCDECに該当する菌株は確認されなかった。

非定型的下痢原性大腸菌のうち、EAST1ECは大阪市の調査でも下痢症患者から2.5%分離されることが報告されており、今回の調査結果とほぼ一致する⁴⁾。DAECは特に小児の下痢症に関係するが²⁾、今回の調査では年齢は考慮されていない。CDECの病原因子である*cdtB*は、ほとんどの場合、EPECの病原因子である*eaeA*と

同時に検出されることが多いため²⁾、今回の調査では検出されなかったと考えられる。

3.2 *astA*保有大腸菌の病原因子保有状況

EAST1ECとして同定された35株について、表1に示した12種類の病原因子の保有状況を調査し、その結果を表2にまとめた。

35株中24株で何らかの付着性に関わる病原因子を検出した。そのうち、最も高率に確認された*lpfA*は、特に家畜との関連が指摘されている因子であり⁵⁾、EAST1ECが家畜由来の食品等による食中毒を起こす可能性があることが示唆された。また、複数の菌株で確認された*iha*、*pilS*、*pic*はEHECやEAggECにおいて細胞付着性への関与が指摘されており⁶⁻⁸⁾、EAST1ECの付着因子として注目される。1株で検出された*aah*は特定のDAECにおいて付着性を発揮するために必須の因子であることから⁹⁾、EAST1ECとDAECには何らかの関係がある可能性がある。また、*hlyA*は腸管外感染を起こす大腸菌にみられる病原因子の一つであるが、DAECやCDECでは下痢との関係が指摘され、腸粘膜細胞の機能変化を引き起こす作用があることが示されている²⁾。そのため、*hlyA*はEAST1ECの毒性を強める可能性がある。さらに、多くの株がヒトの体内での増殖に必要な*irp2*を持ち、*iha*、*pilS*、*pic*および*hlyA*を保有する株は共通してこの因子を持ち合わせていた。特定の病原因子のセットを持つ菌株のみがヒトへの病原性を持つと推定すると、*astA*に加えて、*irp2*および*iha*、*pilS*、*pic*、*hlyA*といった病原因子はEAST1ECの病原性に重要な役割を担う可能性がある。

表1 対象病原因子と特性

関連する病原型	病原因子	関連する病原性
EHEC	<i>iha</i>	IrgA homologue adhesin
	<i>lpfA</i>	Long polar fimbriae
EPEC	<i>ldaG</i>	LDA afimbrial adhesin
EAggEC	<i>pilS</i>	TypeIV pilus major subunit
	<i>pet</i>	Plasmid encoding toxin
DAEC	<i>pic/shET1</i>	Mucinase/Shigella enterotoxin I
	<i>irp2</i>	Siderophore
	<i>daa</i>	F1845 fimbriae
DAEC	<i>aah</i>	AIDA adhesin
	<i>aid</i>	AIDA adhesin
CDEC	<i>cdtB</i>	Cytolethal distending toxin
DAEC/CDEC	<i>hlyA</i>	α -hemolysin

表2 EAST1ECの病原因子プロファイル

年	菌株No.	血清型	病原因子											
			<i>iha</i>	<i>lpfA</i>	<i>ldaG</i>	<i>pilS</i>	<i>pic</i>	<i>pet</i>	<i>irp2</i>	<i>daa</i>	<i>aah</i>	<i>aid</i>	<i>cdtB</i>	<i>hlyA</i>
平成	EC11592	1	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
19年	EC11628	UT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	EC11651	125	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
	EC11805	125	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	EC11935	115	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
	EC11969	18	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	EC12331	6	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
平成	EC12397	8	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
20年	EC12434	18	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	EC12491	153	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	EC12535	20	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	EC12580	8	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	EC12584	153	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	EC12596	151	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
	EC12685	74	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
	EC12713	166	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	EC12790	UT	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	EC12817	125	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	EC12908	8	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	EC12939	6	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
	EC13008	UT	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	EC13109	1	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
平成	EC13115	27	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
21年	EC13273	UT	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	EC13290	8	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	EC13334	1	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
	EC13353	UT	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
	EC13395	167	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	EC13404	166	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	EC13475	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	EC13509	153	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	EC13539	UT	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	EC13574	6	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+
	EC13584	UT	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
	EC13612	6	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

参考文献

- 1) 日本食品衛生協会: 食中毒予防必携, 1998, 58-64.
- 2) 坂崎利一: 食水系感染症と細菌性食中毒, 2000, 210-297.
- 3) 渡辺治雄: 食中毒検査・診療のコツと落とし穴, 2006, 11.
- 4) Nishikawa Y, Zhou Z, Hase A, Ogasawara J, Kitase T, Abe N, Nakamura H, Wada T, Ishii E, Haruki K; Surveillance Team: Diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from stools of sporadic cases of diarrheal illness in Osaka City, Japan between 1997 and 2000: prevalence of enteroaggregative *E. coli* heat-stable enterotoxin 1 gene-possessing *E. coli*, *Jpn J Infect Dis*, 55, 6, 2002, 183-190.
- 5) Wu Y, Hinenoya A, Taguchi T, Nagita A, Shima K, Tsukamoto T, Sugimoto N, Asakura M, Yamasaki S: Distribution of virulence genes related to adhesins and toxins in shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from healthy cattle and diarrheal patients in Japan, *J Vet Med Sci*, 72, 5, 2010, 589-597.
- 6) Tarr PI, Bilge SS, Vary JC Jr, Jelacic S, Habeeb RL, Ward TR, Baylor MR, Besser TE: *Iha*: a novel *Escherichia coli* O157:H7 adherence-conferring molecule encoded on a recently acquired chromosomal island of conserved structure, *Infect Immun*, 68, 3, 2000, 1400-1407.
- 7) Dudley EG, Abe C, Ghigo JM, Latour-Lambert P, Hormazabal JC, Nataro JP: An Inc1 plasmid contributes to the adherence of the atypical enteroaggregative *Escherichia coli* strain C1096 to cultured cells and abiotic surfaces, *Infect Immun*, 74, 4, 2006, 2102-2114.
- 8) Henderson IR, Czczulin J, Eslava C, Noriega F, Nataro JP: Characterization of *pic*, a secreted protease of *Shigella flexneri* and enteroaggregative *Escherichia coli*, *Infect Immun*, 67, 11, 1999, 5587-5596.
- 9) Benz I, Schmidt MA: Glycosylation with heptose residues mediated by the *aah* gene product is essential for adherence of the AIDA-I adhesin, *Mol Microbiol*, 40, 6, 2001, 1403-1413.

新生児マス・スクリーニング検査における

精密検査依頼事例結果について（平成 21 年度・22 年度）

安部真理子 千葉真知子 柴田ちひろ

平成 21 年度の精密検査依頼件数 9 件中、疾患名が確定した件数は 7 件であった。内訳は、ガラクトース血症 1 名、クレチン症関連疾患 5 名、シトリン欠損症（マス・スクリーニング対象外疾患）1 名であった。平成 22 年度の精密検査依頼件数は 10 件で疾患名が確定した件数は 2 件であった。内訳はクレチン症関連疾患が 2 名であった。精密検査の依頼を出してから受診するまでの日数は最長で 21 日の事例があったが、84%が 1 週間以内に受診しており、治療を必要とする 6 事例（シトリン欠損症を除く）は 5 日以内に受診していた。

1. はじめに

新生児マス・スクリーニング検査事業は、先天性代謝異常症 4 疾患（フェニルケトン尿症、ホモシスチン尿症、メープルシロップ尿症、ガラクトース血症）等を対象に昭和 52 年から開始され 34 年が経過した。平成 21 年度までに全国で 4,893 名の患児が発見されている¹⁾。甲状腺機能低下症（クレチン症含む）の検査は昭和 54 年より開始され、平成 21 年度現在の患者数は 11,880 名になっている¹⁾。先天性副腎過形成症の検査は昭和 63 年から開始され患者数は 1,513 名である¹⁾。

秋田県においては平成 22 年度現在、新生児マス・スクリーニングで発見された対象 6 疾患の患者数は 189 名である。平成 20 年度までの精密検査依頼事例については、平成 11 年と平成 20 年の秋田県健康環境センター年報に記載している^{2,3)}。今回は平成 21, 22 年度に精密検査を依頼した事例について結果を報告する。

2. 対象及び方法

県内の産科医療機関で出生した生後 4 日～6 日目の新生児のかかとかから採取したろ紙血を検査材料とした。先天性代謝異常症の 3 疾患（フェニルケトン尿症、ホモシスチン尿症、メープルシロップ尿症）は BIA 法（枯草菌成長阻止法）で検査した。糖代謝異常症であるガラクトース血症はペイゲン法とボイトラー法の 2 法で検査した。また、甲状腺機能低下症と先天性副腎過形成症の 2 疾患は ELISA 法で検査した。先天性副腎過形成症の検

査は直接法でカットオフ値以上になった検体については抽出法を行った。検査項目別精密検査依頼カットオフ値は表 1 のとおりであり、カットオフ値以上の場合に精密検査依頼をした。

平成 22 年度に TSH 高値で精密検査を依頼した 7 事例については、ELISA 法による FT4（遊離サイロキシン）の測定も行った。カットオフ値 1.0 ng/dl 未満を異常値とした。

表 1 検査項目別カットオフ値

疾患名	検査項目	初回精密検査 依頼カットオフ値	再検査後精密検査 依頼カットオフ値
フェニルケトン尿症	フェニルアラニン	8 mg/dl	4 mg/dl
ホモシスチン尿症	メチオニン	4 mg/dl	1 mg/dl
メープルシロップ尿症	ロイシン	8 mg/dl	4 mg/dl
ガラクトース血症	ガラクトース (ペイゲン法)	20 mg/dl	10 mg/dl
ガラクトース血症	ガラクトース (ボイトラー法)	蛍光なし	蛍光なし
先天性甲状腺機能低下症	TSH	20 µIU/ml	8.0 µIU/ml
先天性副腎過形成症	17OHP	20 ng/ml	5 ng/ml

3. 結果

平成 21, 22 年度精密検査依頼事例を表 2 及び表 3 に示した。平成 21 年度の精密検査依頼事例は 9 件であった（表 2）。精密検査依頼項目をみると、TSH が 6 件、ガラクトースが 2 件、ガラクトースとメチオニンともに異常値例が 1 件であった。診断名をみると、クレチン症、先天性甲状腺機能低下症、一過性甲状腺機能低下症、一過

表2 平成21年度精密検査依頼事例

No.	性別	出生体重(g)	精密検査項目	検査値	精密検査依頼月日	受診月日	診断名	治療の有無	備考
1	女	2,240	G, M	初回：G：20 M：1	H21.4.8	H21.4.21	シトリン欠損症	有り	島根大学にて検査
2	男	3,260	TSH	初回：26.35	H21.8.7	H21.8.12	経過観察	無し	TSH値低下
3	女	3,046	TSH	初回：>94.5	H21.8.12	H21.8.13	先天性甲状腺機能低下症	有り	他県に転居
4	女	2,640	G	初回：蛍光なし (ポイトラー法)	H21.8.18	H21.8.18	新生児貧血	無し	
5	男	598	TSH	初回：29.31 再検査：8.18	H21.9.7	H21.9.7	先天性甲状腺機能低下症	有り	境界域発達
6	女	3,643	G	初回：10	H21.9.16	H21.9.16	ガラクトース血症	有り	治療終了
7	男	3,253	TSH	初回：19.26 再検査：13.19	H21.10.20	H21.10.23	一過性甲状腺機能低下症	有り	治療終了・フォロー終了
8	女	2,962	TSH	初回：9.58 再検査79.26	H22.1.4	H22.1.7	クレチン症	有り	
9	女	3,042	TSH	初回：46.84	H22.3.25	H22.3.26	一過性高TSH血症	無し	母親が治療中

表3 平成22年度精密検査依頼事例

No.	性別	出生体重(g)	※精密検査項目	検査値	精密検査依頼月日	受診月日	診断名	治療の有無	備考
1	男	2,710	TSH	初回：12.05 再検査：8.05	H22.9.3	H22.9.9	正常	無し	
2	女	2,714	TSH	初回：16.93 再検査：9.63	H22.9.7	H22.9.7	経過観察	無し	関連検査正常値
3	男	3,520	TSH	初回：20.79	H22.9.3	H22.9.7	一過性高TSH血症	無し	正常化
4	男	2,886	17OHP	初回：14.45	H22.9.10	H22.9.13	経過観察	無し	
5	男	884	17OHP	初回：3.77 再検査：8.81 再々検査：11.0	H22.9.17	H22.9.24	正常	無し	関連検査正常値
6	男	3,280	G	初回：8 再検査：10	H22.9.29	H22.10.20	経過観察	無し	フォローを終了
7	男	2,880	TSH	初回：11.08 再検査：13.99	H22.12.14	H22.12.28	経過観察	無し	
8	男	3,188	TSH	初回：12.64 再検査：89.0	H22.12.15	H22.12.20	クレチン症	有り	
9	女	3,020	TSH	初回：9.82 再検査：11.80	H23.2.1	H23.2.8	経過観察	無し	TSH値微弱陽性
10	男	2,952	TSH	初回：21.08	H23.2.24	H23.2.27	正常	無し	関連検査正常値

G：ガラクトース M：メチオニン TSH：甲状腺刺激ホルモン 17OHP：17ヒドロキシprogesterone

性高 TSH 血症の甲状腺機能低下症関連疾患が 5 名であった。また、ガラクトース血症 1 名、シトリン欠損症 1 名であった。その他の 2 件については、経過観察 1 名、正常 1 名であった。

次に平成 22 年度の精密検査依頼事例を表 3 に示した。精密検査依頼事例は 10 件であった。精密検査依頼項目で見ると、TSH が 7 件、17OHP が 2 件、ガラクトースが 1 件であった。診断名で見ると、一過性高 TSH 血症 1 名、クレチン症 1 名であった。その他の 8 件については、経過観察 5 名、正常 3 名であった。平成 21 年度、22 年度事例を男女比でみると 11:8 で男子が多かった。また、出生時体重をみると 1,000 g 以下の超低出生

体重児は 2 名 (598 g, 884 g) いたが、16 名 (84.2 %) は 2,500 g 以上の標準体重児であった。

次に精密検査依頼日から受診するまでの日数を図 1 に示した。精密検査依頼当日に受診した人は 4 名、翌日受診者は 2 名、3 日後 4 名、4 日後 1 名、5 日後 2 名、6 日後 1 名、7 日後 2 名で、1 週間以内に受診した人が 19 名中 16 名 (84%) であった。また、13 日目に受診したシトリン欠損症患児を除き、治療を必要とする対象疾患 6 事例すべてが 5 日以内に受診していた。

平成 22 年度の精密検査依頼事例の中で TSH が高値であった 7 事例について FT4 の測定を試みた (表 4)。正常と診断された事例 1 についてみ

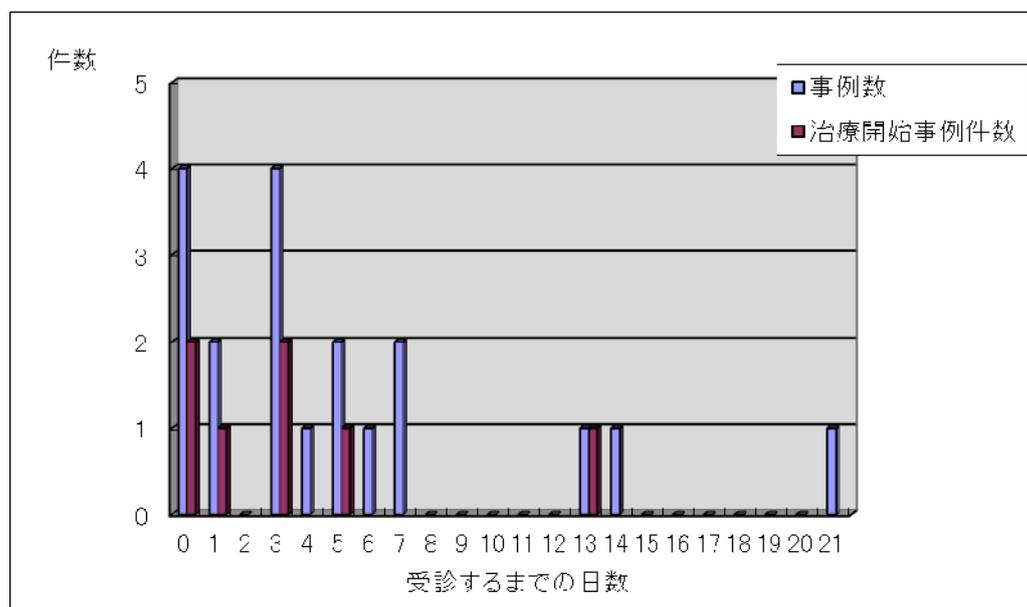


図1 精密検査依頼日から受診するまでの日数

表4 TSH高値事例におけるFT4値(平成22年度分) ※NT: not Test

事例No.	性別	出生体重(g)	初回TSH値(μU/ml)	初回FT4値(ng/dl)	再検査TSH値(μU/ml)	再検査FT4値(ng/dl)	診断名	治療の有無
1	男	2,710	12.05	1.98	8.05	1.90	正常	無し
2	女	2,714	16.93	2.87	9.63	1.39	経過観察	無し
3	男	3,520	20.79	2.03	※NT	NT	一過性高TSH血症	無し
7	男	2,880	11.08	3.03	13.99	2.79	経過観察	無し
8	男	3,188	12.64	2.74	89.00	2.88	クレチン症	有り
9	女	3,020	9.82	3.15	11.80	1.50	経過観察	無し
10	男	2,952	21.08	2.71	NT	NT	正常	無し

ると、初回 FT4 値、再検査 FT4 値は共に正常値であり、事例 10 も、初回 FT4 値は正常値を示した。経過観察となった事例 2, 7, 9 の FT4 値もすべて正常値であったが、事例 2 と事例 9 は 1.39 ng/dl, 1.5 ng/dl とカットオフ近似値であった。クレチン症と診断された事例 8 について初回検査は TSH 値が 12.64 ng/dl, FT4 値 2.74 ng/dl, 再検査は TSH 値が 89.0 ng/dl と高値であったが、FT4 値は 2.88 ng/dl と正常値を示した。

4. 考察

平成 21, 22 年度において疾患名が確定した件数は 9 件であった。精密検査依頼件数からみた疾患確定比率は、平成 21 年度は 77.8%, 平成 23 年度は 20.0% であり、過去においても年度によっ

て差がみられている⁴⁾。平成 21 年度に新生児マス・スクリーニング対象外疾患であるシトリン欠損症と診断された事例は、当センターのスクリーニング検査において、ガラクトースとメチオニンの 2 項目に異常値を示した。精密検査医療機関において詳細な検査(一部他県大学に検査を依頼)を実施した結果、診断名が確定した。このように、現行の新生児マス・スクリーニング対象 6 疾患以外の疾患もガラクトースやアミノ酸に何らかの異常値を示すことがわかっている⁵⁻⁷⁾。複数の検査項目に異常値を示した場合は、本事例のように、他の疾患を疑う必要性が改めて確認された。また、ガラクトース検査のペイゲン法は正常でありながら、ポイトラー法で蛍光が認められなかった平成 21 年度の事例 4 は、出産医療機関に問い

合わせをした結果、新生児貧血であったことが判明した。ガラクトース血症は、I型～III型まであり、臨床上重要とされているのはI型及びII型である。特にI型は重篤な症状をきたすため、早期発見が望まれている。I型は血液中に存在する galactose-1-phosphate uridylyltransferase（以下トランスフェラーゼとする）欠損による疾患であり、その発見のためのスクリーニングを、当センターではガラクトースの定量（ペイゲン法）に加えて赤血球中のトランスフェラーゼ活性の定性試験（ボイトラー法）で行っている。ガラクトース血症でペイゲン法による検査が正常で、ボイトラー法のみで異常をきたす事例はほとんどなく、このような場合は紙血の時間的変質や生乾き等の検体不備の影響による場合がほとんどである。今回報告した事例は、新生児貧血によるヘモグロビン濃度の薄さによる影響と判明した⁸⁾。現行のボイトラー法は目視による検査であるために、定量値がわからず、観察者により判定が異なる可能性がある。このため、定量化が可能になった改良ボイトラー法も考案されており⁹⁾その導入も検討課題である。

また当センターでペイゲン法を導入している理由として、半定量法ではあるが、安価であることと比較的判定がしやすいことがあげられる。一時検査でペイゲン法を使用している施設でも二次検査で酵素法による定量法等が望ましいとされており¹⁰⁾、酵素法の導入が課題である。

平成21年度の事例7は一過性甲状腺機能低下症と診断されたが、一定期間の投薬後に検査値が正常化した段階でフォローを終了している。事例9は母親がバセドウ病で治療中であったために児に影響が出たと考えられた事例であった。

クレチン症と診断された平成22年度事例8は再検査高値による精密検査依頼後の医療機関受診は依頼後5日以内であったが、再検査依頼日から再検査検体到着まで1ヶ月以上を要し、再検査時のTSHは89.0と異常高値を示した事例であった。再検査検体の送付が遅れている検体に対しては現在「お願い文書」を送付しているが、さらにアプローチの検討が必要である。本事例では、治療開始の遅延による影響について今後も追跡調査が必要と考えられた。

次に、当センターで精密検査を依頼した日から受診までに要した日数について検討した。検査依

頼当日に受診した事例が4事例、1週間以内に受診した事例が19事例中16事例であったことは早期診断・治療に寄与したと考える。その一方、21日目にして受診した平成22年度の事例6もあったが、この事例はボイトラー法では蛍光がみられたが、ペイゲン法によるガラクトースが初回値8 mg/dlであり、再検査で初回値より高い値だったために精密検査依頼した事例であった。この事例では経過観察した上でフォローを終了している。精密検査依頼をした場合は、定期的に受診の推奨を促すことが、早期治療に繋がるとされていることから¹¹⁾、当センターでは、精密検査依頼後1ヶ月を経過しても検査結果報告書が届かない場合は、電話や文書にて受診状況を確認している。

平成22年度の精密検査依頼事例におけるTSH高値7事例についてFT4の測定を試みた結果、正常と診断された事例、一過性高TSH血症と診断された事例のFT4値は正常値であったが、経過観察となった2事例（事例2、事例9）のFT4値は1.0 ng/dl以下ではなかったものの、再検査検体では、観察値とされる1.39と1.50 ng/dlであった。しかし、クレチン症と診断された事例8においてFT4値は初回FT4値も再検査FT4値も正常値であった。平成20年度の検討では患者と診断された事例のFT4値は1.5以下であり、精密検査依頼事例におけるFT4値の補助的活用が有効であった¹²⁾（平成21年度年報参照）。しかし、今回の事例で異常値とならなかった要因については今後の検討課題であり、マス・スクリーニングにおけるFT4値の取り扱いには注意が必要と考えられた。

現在、秋田県は全国と比較しても少子化に歯止めがかからない状況にある¹³⁾。大切な赤ちゃんを障がいから守るためにも、新生児マス・スクリーニング検査事業はきめ細かな対応で取り組んでいかなければならないと考える。

5. まとめ

- 1) 平成21年度の精密検査依頼事例9件の内、7件は疾患名が確定した。
- 2) 平成22年度の精密検査依頼事例10件の内、2件は疾患名が確定した。
- 3) マス・スクリーニング対象外疾患であるシトリン欠損症が1名確定した。

- 4) 精密検査依頼通知後1週間以内で受診した患者は19名中16名であった。
- 5) 治療を必要とされる事例6事例は精密検査依頼日から5日以内に受診していた。
- 6) 精密検査依頼後の受診推奨の他に再検査依頼後の受検推奨も必要であった。

参考文献

- 1) 厚生労働省雇用均等・児童家庭局母子保健課: 先天性代謝異常等検査実施状況(平成21年度), 特殊ミルク情報, **46**, 11, 2010, 69-70.
- 2) 安部真理子他: 平成17年度新生児マス・スクリーニング発見患児について, 秋田県健康環境センター年報, **1**, 2006, 63-70.
- 3) 安部真理子他: 新生児マス・スクリーニング検査における平成18年度から平成20年度の発見患児について, 秋田県健康環境センター年報, **4**, 2009, 70-74.
- 4) 安部真理子他: マス・スクリーニングで発見された先天性代謝異常症等疾患・神経芽細胞種患者の追跡調査 (In Akita), 日本マス・スクリーニング学会誌, **19**, 1, 2009, 39-44.
- 5) 九曜雅子他: 新生児マス・スクリーニング要精密検査児の追跡結果—10年間のまとめ—, 日本マス・スクリーニング学会誌, **19**, 3, 2009, 53-62.
- 6) 伊藤道徳: <診断へのアプローチ—新生児マス・スクリーニング>メチオニン, 小児内科, **42**, 7, 2010, 1075-1078.
- 7) 石毛美夏他: <診断へのアプローチ—臨床症状>発育障害, 小児内科, **42**, 7, 2010, 1141-1144.
- 8) 岡野善行: <診断へのアプローチ—新生児マス・スクリーニング>ガラクトース, 小児内科, **42**, 7, 2010, 1079-1083.
- 9) 米田豊他: ガラクトース血症マス・スクリーニングのための HemoglBindTMを用いるポイトラー試験の定量化, 日本マス・スクリーニング学会誌, **17**, 3, 2007, 53-58.
- 10) 富士勝: ガラクトース血症スクリーニングのカットオフ値の再検証と標準的なカットオフ値に関する考察, 日本マス・スクリーニング学会誌, **20**, 3, 2010, 7-18.
- 11) 竹原健二: わが国の新生児マス・スクリーニングに関する実態調査～精密検査対象者に対する受診勧奨・受診確認は適切におこなわれているか?～, 日本マス・スクリーニング学会誌, **20**, 1, 2010, 39-43.
- 12) 安部真理子他: 新生児マス・スクリーニング検査における FT4 測定の試み, 秋田県健康環境センター年報, **5**, 2010, 48-53.
- 13) 厚生労働省大臣官房統計情報部: H23 年我が国の人口動態 平成 21 年度までの動向, **2**, 2010, 6-14.

パンソルビン・トラップ法による食品中のノロウイルス検査法の構築

斎藤博之 東方美保*¹ 田中智之*² 野田 衛*³

食品検体からノロウイルス (NV) を検出するための実践的な手法としてパンソルビン・トラップ法 (パントラ法) の開発を平成 19 年度から進めている。本稿では利便性向上に加えて G II /4 以外の血清型への対応を視野に入れ、それに必要なプロトコル改良を行ったので報告する。食品を超音波処理することで、NV を洗い出す操作に一定の基準を設けることができ、特に油を多く含む食品に対して有効であった。また、 α -Amylase による前処理を行うことで RNA 抽出液の凍結保存中に炭水化物の沈澱が生じるという問題を解決できた。食品洗滌液を改良することで、パンソルビンの結合性が向上し、プール血清やブロードバンド・モノクローナル抗体の使用が可能となった。今後はこれらの抗体の生産・安定供給体制の確立が新たな課題となった。本法を用いることで一般的な食品から NV を検出することが可能となれば、食中毒発生時の原因究明のみならず、汚染経路に関するデータの蓄積を通して予防対策にも貢献できるものと考えられた。

1. はじめに

ウイルス性食中毒の大部分を占めるのがノロウイルス (NV) であり、対策として二枚貝の汚染実態調査や、調理従事者への衛生教育等が進められてきている¹⁻³⁾。しかしながら、一部に飲用水からの検出例が報告されているものの^{4,5)}、一般的な食品からのウイルス検出は、その作業の困難さからこれまでほとんど検討されてこなかったため、具体的な汚染ルートの解明に決め手を欠いているのが実状である。平成 19 年度から取り組んでいる本研究では⁶⁻¹³⁾、固形、液状、練り物、油物などの一般的な食品から NV を検出する手法としてパンソルビン・トラップ法 (パントラ法) を開発し、この問題を解決するための糸口を見出すことができた。平成 20 年度までの研究でパントラ法の基本プロトコルはほぼ完成したが、平成 21 年度はより汎用性を向上させるために、G II /4 以外の血清型に対する適用を中心に改良を行った。本稿における改良点は次の 4 点に集約される。

- ①油を多く含む食品では油滴に NV が包埋されて検出効率が落ちる可能性があるため、その対策。
- ②炭水化物混入対策の強化。
- ③ブロードバンド・モノクローナル抗体使用のための条件検討。
- ④プール血清を使用することによる、様々な血清型への対応。

①②は利便性向上、③④は多種類の血清型への対応に関する検討である。

2. 方法

2.1 研究材料

汚染実験に用いる食品として、市販されているポテトサラダと焼ソバを用いた。また、検出対象となる NV として、秋田県内の集団感染事例において搬入された保存糞便検体を用いた。次のとおり Accession No. と採取年月を示す。

G II /4 型: AB293424, 2006 年 12 月

G II /5 型: AB448707, 1993 年 3 月

G II /18 型: AB083780, 1995 年 11 月

G I /8 型: AB448734, 2008 年 6 月

2.2 試薬類

2.2.1 抗 NV 血清

国立感染症研究所において、ウイルス様人工粒子 (VLP) から作製したウサギ免疫血清 19 種 (抗 GI /1, 2, 3, 4, 8, 11 G II /1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 14, 15, 17)¹⁵⁾ を単味、またはプール血清として用いた。

2.2.2 抗 NV ブロードバンド・モノクローナル抗体

堺市衛生研究所で樹立したハイブリドーマから得られたマウス腹水 4 種類 (MAb#22 : broad, MAb#23 : broad, MAb#14 : G II specific, MAb#3912 : G I specific) を混合して用いた。

*¹ 福井県衛生環境研究センター、*² 堺市衛生研究所、*³ 国立医薬品食品衛生研究所

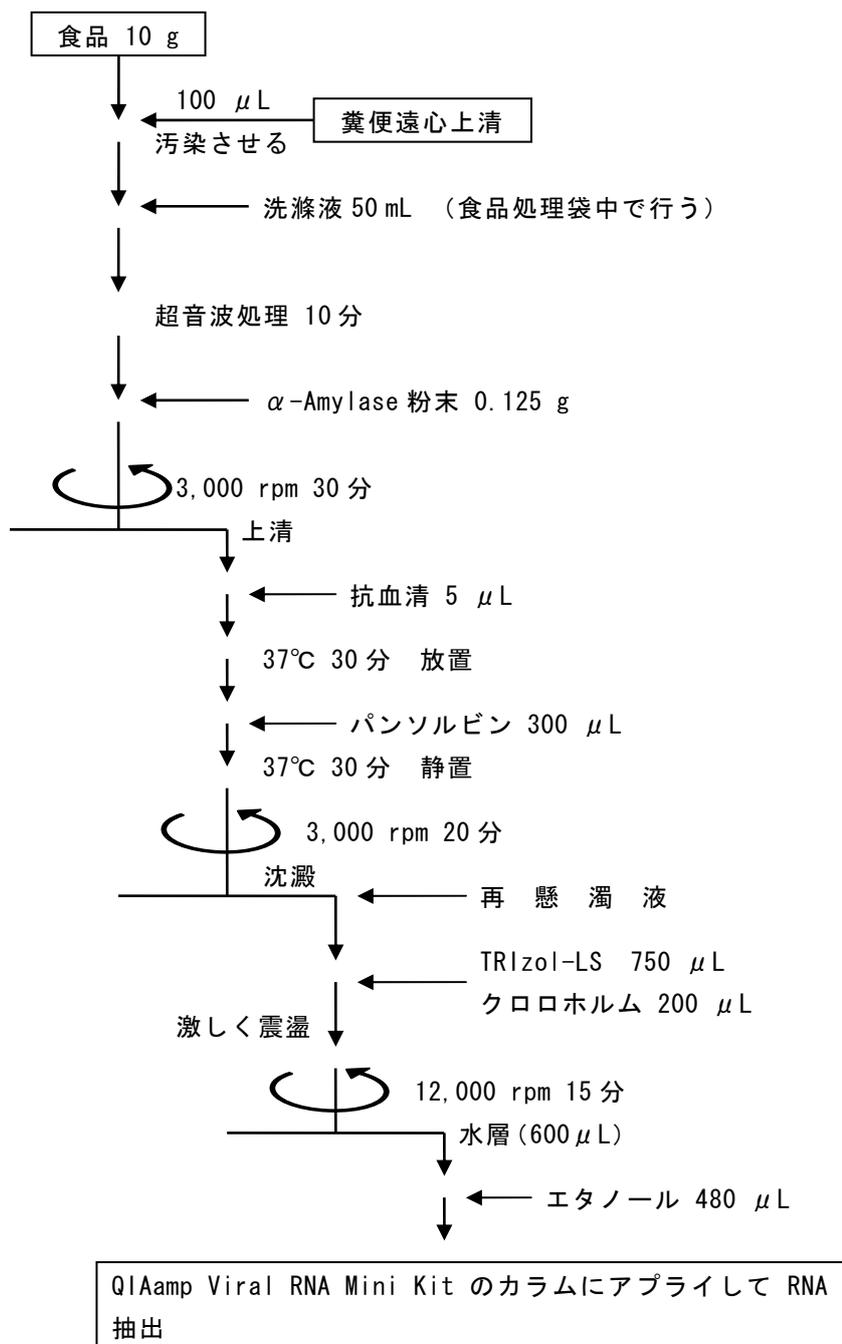


図1 パンソルビン・トラップ法の操作手順 (Ver. 3)

2.2.3 食品洗滌液

Tris-HCl (pH8.4) - 0.5M NaCl - 0.1% Tween20

2.2.4 パンソルビン

黄色ブドウ球菌を熱処理してホルマリン固定したもの懸濁液で、メルク社から購入

2.2.5 再懸濁液

0.1% Na-Citrate (pH4.2)

2.2.6 フェノール系 RNA 抽出キット

TRIzol-LS (invitrogen)を使用

2.2.7 カラム方式の RNA 抽出キット

QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen) を使用

2.2.8 逆転写反応エンハンサー

RTmate (ニッポンジーン) を使用

2.2.9 DNase I (RT Grade) 及び RNase inhibitor

ニッポンジーンの商品を使用

2.2.10 アミラーゼ

前処理用：枯草菌由来 α-Amylase 粉末 (和光純薬) を使用

後処理用：α-Amylase Ultrapure (ニッポンジーン) を使用

2.2.11 食品処理袋

サニスペックテストバッグ (アズワン) を使用



図 2A 超音波処理の実際



図 2B 超音波処理後の乳化
(左から無処理・3分・10分)

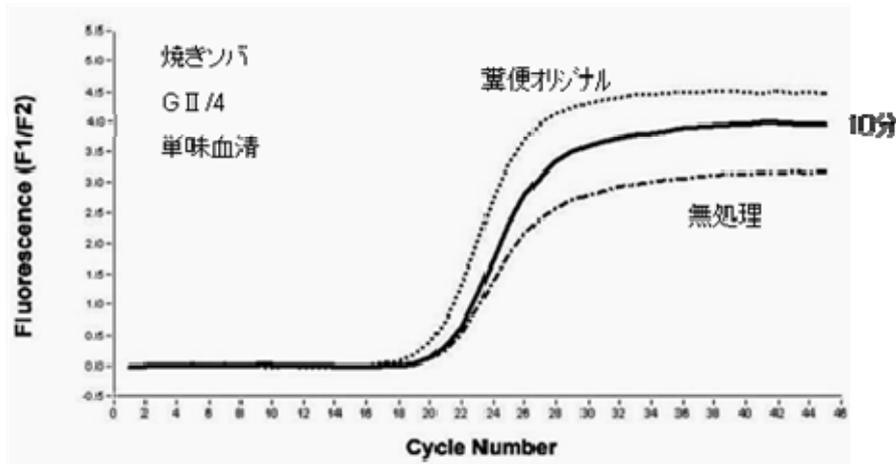


図 2C 超音波処理による回収率の比較 (増幅曲線)

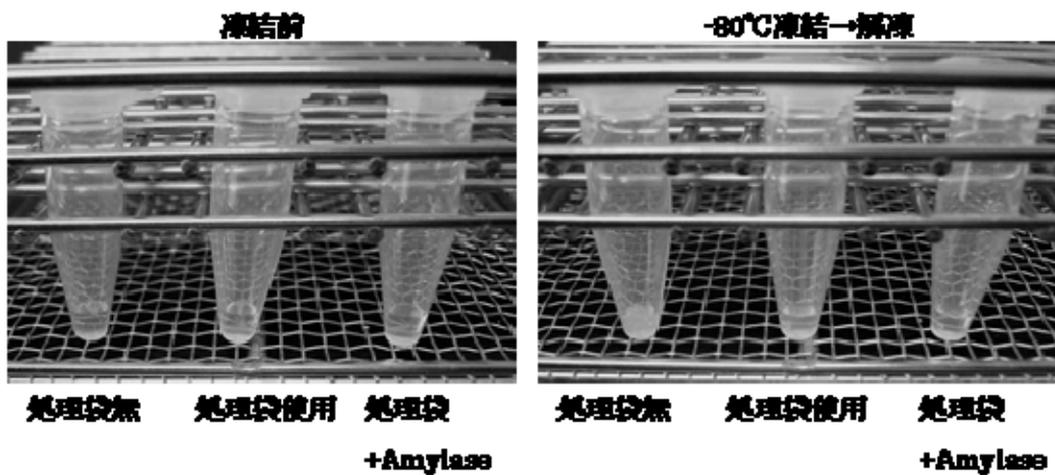


図 3A 凍結保存後の炭水化物の沈澱

2.3 パンソルビン・トラップ法の全体の手順

基本的な操作の流れを図1に示した。なお、プール血清とモノクローナル抗体使用時にはプロトコル全体を1/10にスケールダウンして検討を行った(再懸濁以降は通常スケール)。前年度のプロトコルからの主な改良点は、次の通

りである。本稿では、これらの改良に至った経緯について順次考察を加えていく。

- ①食品からNVを効率的に遊離させることができるように超音波処理を加えた(図2A)。
- ②前年度の研究では、フィルター付きの食品処理袋を用いてPCRの阻害物質である炭水化物を

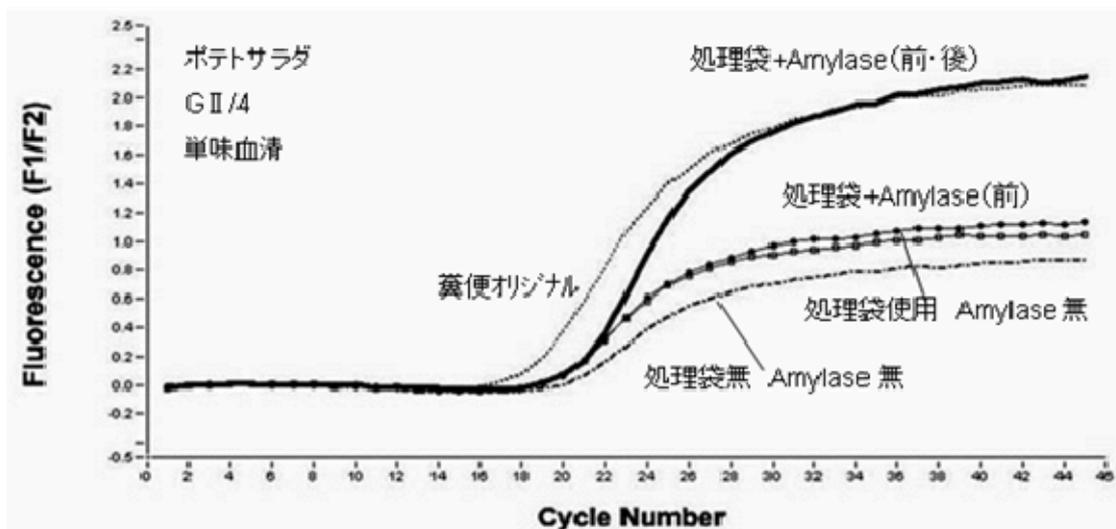


図 3B α -Amylase 処理の効果 (増幅曲線)

表 1 IgG の Protein A への結合性 (生化学データブック (東京化学同人) より抜粋)

動物種	サブクラス	生理的条件下での結合性
ウサギ	IgG (1 種類)	+++
マウス	IgG ₁	+
	IgG _{2a}	+++
	IgG _{2b}	+++
	IgG ₃	+++
ヒト	IgG ₁	+++
	IgG ₂	+++
	IgG ₃	+
	IgG ₄	+++
モルモット	IgG (1 種類)	+++
ラット	IgG ₁	++
	IgG _{2a}	—
	IgG _{2b}	—
	IgG _{2c}	+++
ニワトリ	IgG (1 種類)	—
ヤギ	IgG ₁	—
	IgG ₂	+++

効率的に除去できるようになった^{10,12)}が、最終的に得られた抽出 RNA を凍結保存してから解凍すると沈澱が生じることがわかった(図 3A)。混入対策を強化するため、処理途中で粉末の α -Amylase を添加した。途中から添加するのは、 α -Amylase 粉末には不溶性成分が含まれていることと、超音波処理による失活を避けるためである。

③モノクローナル抗体の実体を成すマウス IgG はいくつかのサブクラスに分かれており、その大半を占める IgG₁ は Protein A (パンソルビン) への親和性が弱いことがわかっている(表 1)。抗血清の成分であるウサギ IgG についても、プール血清使用時には大量の IgG を結合させる必要がある。この問題の解決のため食品洗滌液に 0.5M となるように NaCl を添加した。

2.4 NVの検出

cDNA合成の前に、最終的に得られたRNA抽出液(60 µL)から8.5 µLを取り、DNase I及びα-Amylase Ultrapureを各1 µL、RNase inhibitorを0.25 µL、5×逆転写 buffer (添付)を4 µL加えた後、蒸留水で反応量を15.5 µLとし、37°C10分、65°C5分のインキュベーションを行った。その後、特異的プライマー(COG2F/R)、dNTP、RTmate、及び逆転写酵素を追加してcDNAを合成した(反応容量20 µL)。特異的プライマーとしてCOG2FとCOG2Rの両方を加えたのは、引き続いて行われるPCRの際にプライマーの非対称化を避けるためである。合成したcDNA溶液を5 µL取り、KageyamaらのReal-time PCR法¹⁶⁾でNVを検出した。使用した機器はロシュ製「LightCycler 350S」、及び「LightCycler 480」で反応容量は20 µLである。

3. 結果

3.1 超音波処理の効果

油の多い食品の代表として焼きそばを用いて、図2Aに示すとおり食品処理袋を超音波洗浄機に浸漬した。処理後の食品検体の状態を図2Bに示したが、処理時間が3分、10分と延びるに従って、油成分が洗滌液と混じりあい、機械的乳化に至っているのがわかる。図2Cに示したReal-time PCRの増幅曲線のコピー数から算出した回収率は、無処理の場合で37%、10分処理で46%と改善された。

3.2 α-Amylaseによる前処理の効果

平成20年度の本研究において、抽出したRNAからcDNAを合成する段階でα-Amylase処理を行うことにより、検出効率が向上することがわかった^{10,12)}(便宜上“後処理”と呼ぶ)。しかし、抽出したRNAを-80°Cで凍結保存し、後日検査を再開しようとした際に、炭水化物の沈澱が新たに生じてくるという問題があった。食品処理袋を使用することで、一定の改善は見込めたが、精製カラムの目詰まりを防止しRNAを適切に保存するために、プロトコルの早い段階でのα-Amylase処理(便宜上“前処理”と呼ぶ)を検討した。プロトコルの最初に用いるという性格上、処理量が多く(50 mL)なるため、枯草菌由来の廉価な粉末を使用し、超音波処理で

酵素活性が失われないように、途中で添加するようにした。また、この粉末は不溶性成分を含むため完全には溶解しないが、3,000 rpm 30分の遠心で食品残渣を除去する段階で一緒に沈澱するため問題はない。図3Aではα-Amylase前処理の効果を比較するため凍結保存したRNAの濁りを観察した。凍結前のRNA抽出液は処理袋やα-Amylase前処理の有無に関わらず透明であった。処理袋を使わなかった場合には、大量の炭水化物が混入し、たとえ一部が精製カラムで除去されたとしても最後まで残留し、凍結後にはそれが顕著に現れた(沈澱が生じた)。食品処理袋を使用すると、相当な改善が認められたが、それでも凍結後の濁りは少し残っていた。α-Amylase前処理を行った場合には凍結後も濁りは観察されなかった。

図3Bには増幅曲線を示したが、ここでの回収率は、処理袋もα-Amylaseも一切用いなかった場合が13%、処理袋を用いた場合が23%、処理袋を用いてα-Amylase前処理を行った場合が25%であった。cDNA合成時にα-Amylase後処理を追加すると、回収率は30%となり、同時に蛍光強度も約2倍になった。

3.3 NaCl添加によるIgGとパンソルビンの結合性向上

パントラ法を用いるためには抗血清の安定供給が不可欠であるが、将来的にはブロードバンド・モノクローナル抗体の使用も視野に入れておく必要がある。表1には動物種ごとのIgGとProtein Aとの結合性を示した。抗血清を用いる場合はウサギIgGであるため、結合性そのものには大きな問題は生じない。しかし、モノクローナル抗体はマウスIgGであり、サブクラスがIgG1(割合が最も高い)であった場合には結合性が弱いことが問題となる。ハイブリドーマ選択の際にIgG2aやIgG2b等の他のサブクラスのものが見られればよいが、スクリーニングの優先順位がブロードバンドでの反応性であることから、それを望むのは難しい。本研究で用いたモノクローナル抗体も4種類全てがIgG1である。そこで、マウスIgG1であってもProtein Aへ結合するような条件を検討したところ、「免疫グロブリンGのプロテインAへの結合方法」という発明名称でBio-Rad社が特許を保有して

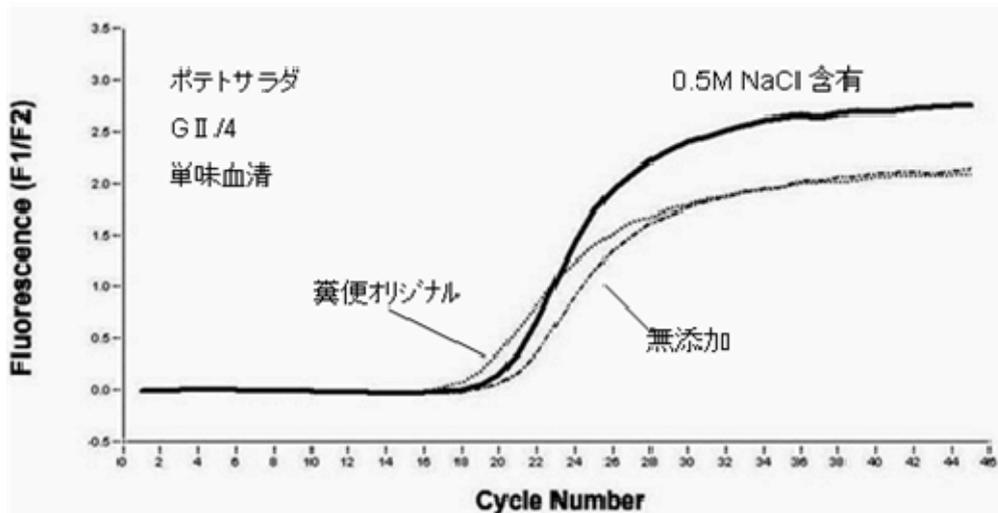


図4 食品洗滌液へのNaCl添加の効果(増幅曲線)

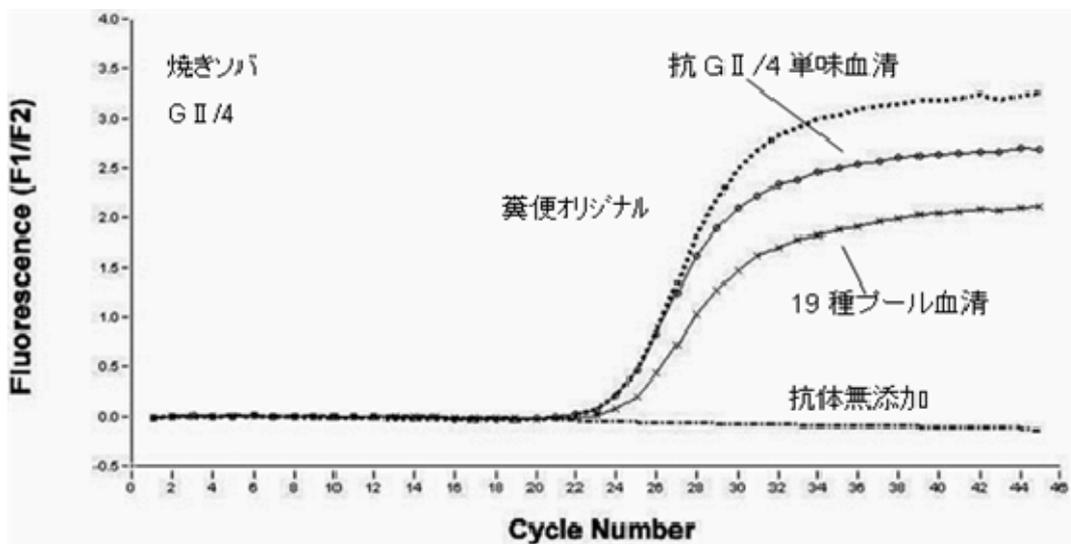


図5A GII/4型による汚染食品からのNV回収(増幅曲線)

いることがわかった(公開特許公報 昭61-12631)。ただし、この特許は期限が切れているため現在では自由に使用できることになっている。特許の記載内容はNaClを添加することでマウスIgG1であってもProtein Aと結合させることができるというものであった。また、ウサギIgGであっても結合性が増すため、プール血清等を用いる際のパンソルビンのキャパシティ向上も期待できる。一方で、この特許は、IgGとProtein Aの結合に関してのみ記述されており、パンソルビンという菌体を用いることは考慮されていない。従って、NaClの濃度を高くすることでIgGとProtein Aの結合性は増すにせよ、食品洗滌液の比重が高くなり遠心してもパンソルビンが沈澱しないという事態が起こり得た。本研究ではNaClを終濃度0.5Mで用いるようにしているが、1.0Mを用いたところ3,000

rpm 20分の遠心ではパンソルビンの沈澱が不十分であった。

図4はこれまでの検討に用いてきた抗GII/4単味血清を使った実験系において、NaClの効果と比較したものである。食品洗滌液にNaClを加えない状態での回収率は29%であったが、0.5M NaCl存在下では42%に向上し、蛍光強度も増大した。

3.4 プール血清への応用

NaClを食品洗滌液に添加することで、パンソルビンのキャパシティ向上が期待できたため、19種類の抗血清を各5μLずつプールして回収実験を行った結果を図5Aに示した。焼きソバをGII/4型のNVで汚染させたものを被検体とした場合の回収率は抗GII/4単味血清では92%、19種プール血清では55%であった。同様にGII

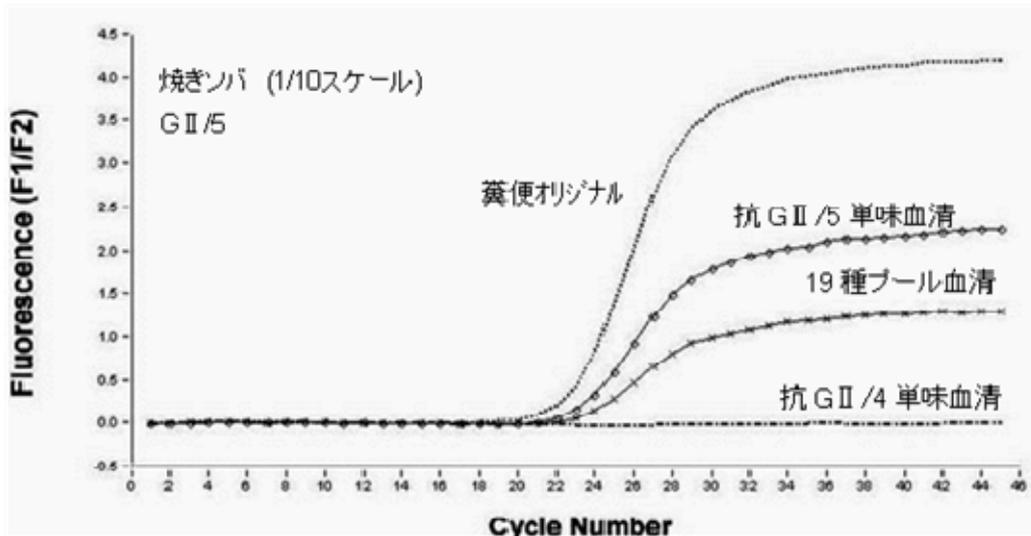


図 5B GII/5 型による汚染食品からの NV 回収 (増幅曲線)

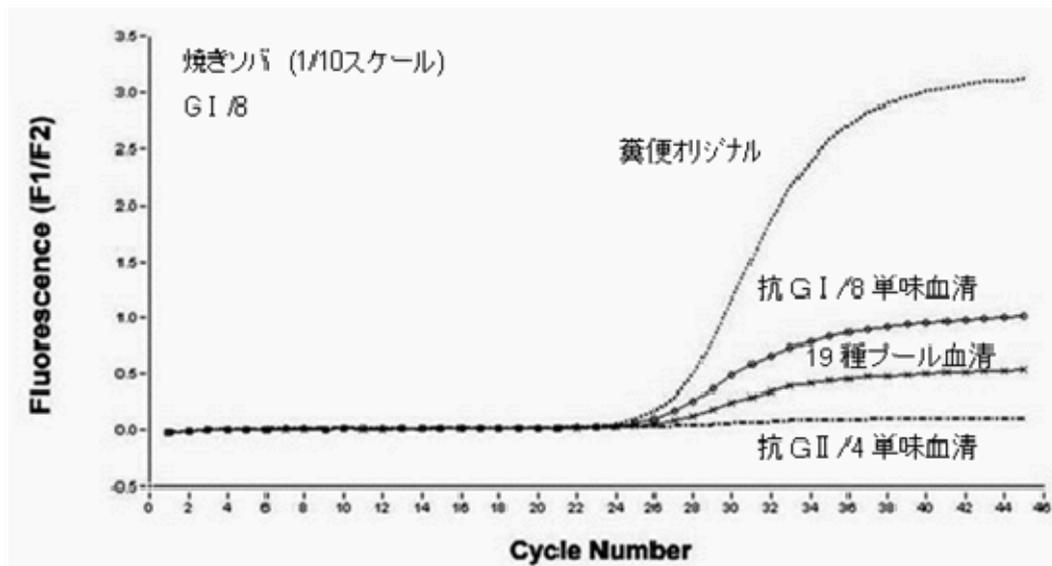


図 5C GI/8 型による汚染食品からの NV 回収 (増幅曲線)

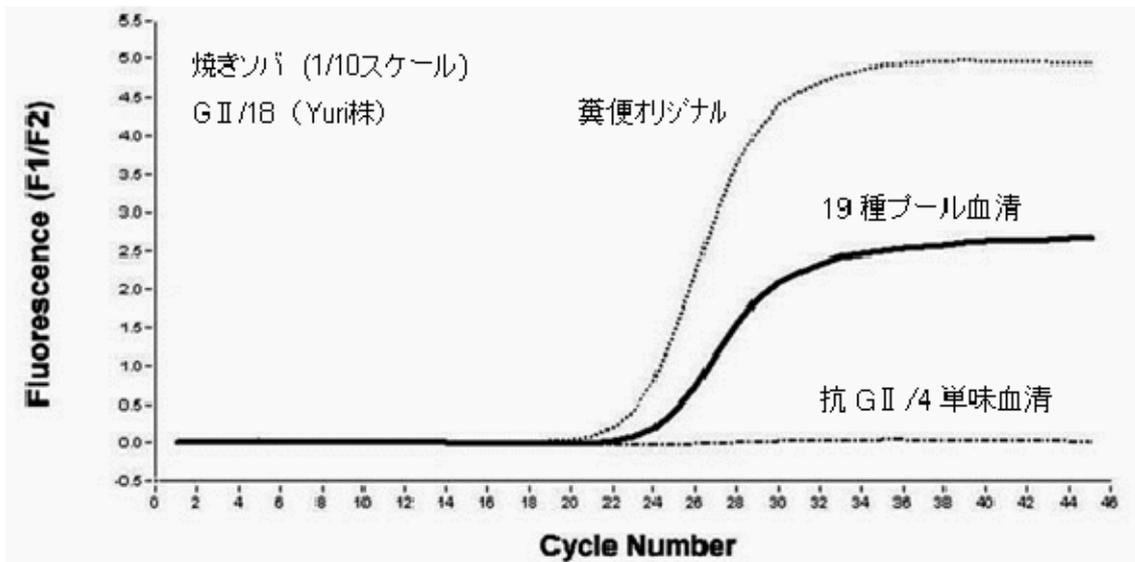


図 5D GII/18 型 (Yuri 株) による汚染食品からの NV 回収 (増幅曲線)

表2 プール血清によるNVの回収率(%)

NV	抗血清	抗GII/4単味	抗GII/5単味	抗GI/8単味	19種プール
GII/4		92			55
GII/5		N.D.	35		18
GI/8		N.D.		41	13
GII/18 (Yuri株)		N.D.			27

・図5A～図5Dの増幅曲線から算出した。GII/4は通常スケール(図1)、他は1/10スケールによる検討を行った。

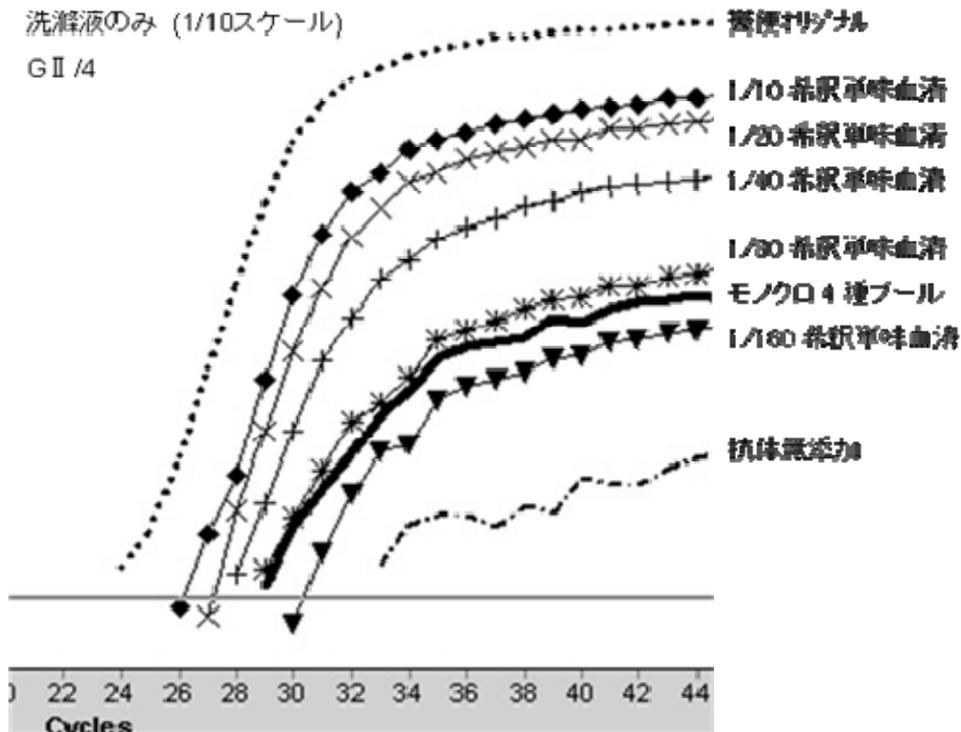


図6 段階希釈した単味血清とモノクローナル抗体の比較(増幅曲線)

・実験スケールは1/10(全量5mL)で行った。単味血清は各希釈液を5μL、モノクローナル抗体は腹水を4種類とも50μL添加した。

15型とGI/8型、及び抗血清プールには含まれないがGII/18型(Yuri株)を用いた回収実験結果を図5B～5Dに示した。この3株については、抗血清を節約するため1/10スケール(洗滌液5mL、抗血清各0.5μL、パンソルビン30μL)で行った。表2に回収率を比較したが、単味血清と比べるとプール血清では半分～1/3程度の数値となった。GII/18についてはプール血清に含まれていないものの27%の回収率が得られた。

3.5 モノクローナル抗体の実用可能性の検討

モノクローナル抗体の反応性を評価するため、これまで様々な検討に用いてきた抗GII/4単味

血清の段階希釈系列と比較した結果を図6及び表3に示した。単味血清を希釈するほど回収率は下がるが、1/40希釈から1/80希釈の間にモノクローナル抗体の回収率と等価になる領域があるのが見て取れる。抗GII/4単味血清のホモ抗体価は国立感染症研究所におけるELISAでの測定により、およそ1,000万倍であることがわかっているため、モノクローナル抗体(マウス腹水)の見かけ上の抗体価を回収率と添加量から逆算すると、12,500～25,000倍と見積もられた。このことから、理論上は添加量を増やせばモノクローナル抗体でも抗血清と同等の回収率が期待できることになる。

表3 段階希釈した単味血清とモノクローナル抗体の比較（回収率）

添加抗体	抗体価（終濃度）	回収率（%）
1/10 希釈単味血清	×1,000	33
1/20 希釈単味血清	×500	18
1/40 希釈単味血清	×250	11
モノクロ4種プール	(×125~250)	9.1
1/80 希釈単味血清	×125	7.8
1/160 希釈単味血清	×62.5	2.3
抗体無添加	—	N.D.

- ・回収率は図6の増幅曲線から算出した。単味血清のホモ抗体価については、ELISAによる測定でおよそ10,000,000倍であることがわかっている。モノクローナル抗体（マウス腹水）の見かけ上の抗体価は回収率と添加量から逆算すると12,500~25,000倍となる。

4. 考察

4.1 利便性の向上に関する改良

4.1.1 超音波処理によるNV粒子の遊離

食品に付着しているNVを洗滌液中に効果的に遊離させるためには、処理袋を念入りに揉みほぐす必要があるが、その程度に関して一定の基準を設けることは難しいのが実状である。また、焼ソバなどの油を多用した食品の場合は油滴中にNVが包埋されて、その後の処理がうまくいかない可能性もある。油に対する解決法の一つとして洗滌液にLipase（ブタ膵臓由来：和光純薬）を添加する方法も検討したが、黄色ブドウ球菌の表面脂質も分解されて構造が壊れるため本法に用いることは不可能であった。ただし、Lipase処理によって油と洗滌液が均一になるため、PEG沈澱法でNV回収を試みる場合には有効と考えられる。次に検討したのは超音波による機械的乳化であり、図2Aに示すとおりガラス器具洗滌用の超音波洗浄機に処理袋を浸漬することで、油滴を細かく分散させてNV粒子を遊離させることを目的としている。図2Bでは、超音波処理によって油と洗滌液が均一に混じり合っているのがわかる。また、水中で超音波を発すると微細な泡の消長に伴う衝撃波が持続的に発生し（キャビテーション効果）、部分的かつ瞬間的な圧力は1,000 kg/cm²に達する。このことは、油物に限らず食品に付着したNVを効率良く洗滌液中に遊離させるのに利用することができる。図2Cでは超音波処理によって回収率

が約3割向上しているが、食品の種類によってはさらに改善される可能性もある。超音波洗浄機はほとんどの試験研究機関において常備されている機器であり、また廉価で入手できるため、NVの洗い出し作業に一定の基準を設定する意味でも用いることが望ましいと考えられた。

4.1.2 α -Amylaseによる前処理

炭水化物は核酸と同じ挙動を示すため、除去が困難で結果に影響を及ぼすことは以前から知られていた。平成20年度の研究では、食品処理袋を使用することで食品残渣を取り除く方法と逆転写反応直前に α -Amylaseによって混入した炭水化物を分解する方法（後処理）について検討し、両者とも効果が認められた^{10,12)}。しかしながら、図3Aに示すとおり、食品処理袋を使用して良好な結果が得られたと思われるRNA抽出液であっても、-80℃で凍結保存後に解凍すると炭水化物の沈澱が生じてくる場合があった（RNAも共沈する）。この問題を解決するために、食品洗滌液に α -Amylase粉末を加えて、その後の抗原抗体反応中に炭水化物の分解処理を並行して行うようにした（前処理）。その結果、凍結保存後も沈澱は生じなくなった（図3A）。図3Bの増幅曲線では、食品処理袋のみの場合と比べてあまり差は認められないが、プロトコル上での作業負担にはならないことと、炭水化物の沈澱によりRNAをロスするリスクを避けるために、 α -Amylaseによる前処理をプロトコルに加えることは意義があるものと思われる。

また、図 3B によると cDNA 合成時に再度 α -Amylase 処理を行うことで回収率の更なる向上が見込めるため、前処理と後処理は併用するのが現実的である。

4.2 多種類の血清型への対応

4.2.1 食品洗滌液の改良

多くの血清型がある NV に普遍的に対応するためにはブロードバンドのモノクローナル抗体の利用が望ましく、抗体の安定供給といった面からも有利である。しかしながら、表 1 に示すとおり、モノクローナル抗体のサブクラスの中で最も割合の高いマウス IgG1 は、ウサギ IgG と比べて ProteinA との結合が弱いという問題を抱えている。本稿ではその解決策として、食品洗滌液に NaCl を 0.5 M になるように添加した。この手法は Bio-Rad 社が検討を加えて特許を保有していたが、平成 18 年に期限をむかえたため現在は自由に用いてよいことになっている。NaCl 添加の効果はこれまで用いてきたウサギ IgG に対しても認められ (図 4)、パンソルビンに対する結合能の向上が期待できた。プール血清を用いた場合には、IgG の量が単味血清の場合と比べて最大 19 倍 (19 種混合) に増える計算になるため、パンソルビンのキャパシティを増やす意味でも NaCl 添加は意義があるものと考えられた。

4.2.2 プール血清を用いた検討

食品洗滌液への NaCl 添加によってパンソルビンのキャパシティが向上したため、19 種類の抗血清を混合したプール血清を用いた NV 回収実験を行った。図 5A～図 5D にはそれぞれ G II/4, G II/5, G I/8, G II/18 についての増幅曲線を示した。表 2 にはそれぞれの回収率を示したが、単味血清と比べてプール血清では半分～1/3 程度の数値であった。プール血清を用いた場合には、無関係の血清型に対する大量の IgG が競合してパンソルビンに結合するため回収率への影響は避けられない。むしろ、あらかじめ NaCl 添加によってキャパシティを向上させていたため、この程度の影響で済んだという見方もできる。Real-time PCR では 2 サイクル以内の差であり、また実際の検査局面では Nested PCR を行うことが想定されるため、深刻な問題にはならないと考えられる。また、参考までに G II/18 型の

reference strain である Yuri 株を用いた回収実験も行ったが、プール血清の中に対応する血清が含まれていないにもかかわらず回収することができた (図 5D)。いずれかの血清成分が交差反応を起こしている可能性が高いが、本法の目的 (ウイルス粒子の回収) からすれば好ましい結果である。

4.2.3 ブロードバンド・モノクローナル抗体の実用可能性

食品洗滌液への NaCl 添加によってマウス IgG1 であってもパンソルビンへ結合させることができるようになったが、抗体価が実用的なレベルに達しているかどうか不明であった。そこで、抗 G II/4 単味血清の段階希釈系列を作り、モノクローナル抗体がどの段階に相当するかを検討した (図 6)。回収率と添加量から逆算するとモノクローナル抗体の抗体価は 12,500～25,000 倍相当と見積もられた (表 3)。理論上は抗体添加量を増やすことで抗血清を用いた場合と同等の回収率が得られると考えられるが、そのためには 1 検体 (50 mL) 当たり 2 mL 程度のマウス腹水が必要な計算となるため現実的とは言えない。そこで次なる可能性として、ハイブリドーマを回転ボトル等で大量培養 (10 L 程度) して培地から IgG を濃縮・精製する方法がある。NV に対する特異性は、Real-time PCR で担保されているため、IgG の精製に当たってはアフィニティークロマトのような煩雑なプロセスは不要で、硫酸沈澱による粗精製で十分と考えられる。

4.3 パントラ法の総括と今後の展開

安定供給という面で課題は残るものの、プール血清を用いることで、多くの血清型に対応させることが可能となり、食品からの NV 検出という目標を達成することができた。今後は抗血清の生産・供給体制を作りつつ、引き続きモノクローナル抗体の利用を検討することになる。本法は添加する抗体さえあれば NV 以外にも適用可能であるため、サポウイルスや A 型肝炎ウイルス等にも用いることが可能である。本法によって食品からの NV 検出が可能となれば、食中毒発生時の原因究明のみならず、汚染経路のデータが蓄積されることによって予防対策にも貢献できるものと考えられた。

参考文献

- 1) 薬事・食品衛生審議会 食品衛生分科会食中毒部会：ノロウイルス食中毒対策について（提言），2007, 1-2.
- 2) 国立感染症研究所感染症情報センター，国立感生事例に対して感染症および食品部局が共同で実施する初期実地疫学調査および微生物学的検査のポイント（第1版：平成19年11月18日付け），2007, 16-17.
- 3) 丸山務（監修）：改訂 ノロウイルス現場対策，2007, 35-36.
- 4) M. A. Borchardt et. al.: Incidence of enteric viruses in ground-water from Household Wells in Wisconsin. *Appl. Env. Microbiol.*, **69**, 2003, 1172-1180.
- 5) 斎藤博之,他：簡易水道が原因と考えられたノロウイルスの流行，病原微生物検出情報，**26**, 2005, 150.
- 6) 斎藤博之，他：パンソルビン・トラップ法による食品検体からのノロウイルスの回収，厚生労働科学研究費補助金 食品の安心・安全確保推進研究事業 食品中のウイルスの制御に関する研究 平成19年度 総括・分担研究報告書，2008, 103-111.
- 7) 東方美保，他：パンソルビン・トラップ法による食品検体からのノロウイルスの回収（検討2），厚生労働科学研究費補助金 食品の安心・安全確保推進研究事業 食品中のウイルスの制御に関する研究 平成19年度 総括・分担研究報告書，2008, 125-133.
- 8) 斎藤博之，他：食品検体のノロウイルス検査に向けたパンソルビン・トラップ法の開発，秋田県健康環境センター年報，**4**, 2008, 75-81.
- 9) 東方美保，他：パンソルビン・トラップ法による食品検体からのノロウイルスの回収検討（第1報），福井県衛生環境研究センター年報，**7**, 2008, 69-72.
- 10) 斎藤博之，他：パンソルビン・トラップ法の実用化に向けた改良（検討1），厚生労働科学研究費補助金 食品の安心・安全確保推進研究事業 食品中のウイルスの制御に関する研究 平成20年度 総括・分担研究報告書，2009, 27-38.
- 11) 東方美保，他：パンソルビン・トラップ法の実用化に向けた改良（検討2），厚生労働科学研究費補助金 食品の安心・安全確保推進研究事業 食品中のウイルスの制御に関する研究 平成20年度 総括・分担研究報告書，2009, 181-190.
- 12) 斎藤博之，他：食品検体のノロウイルス検査に向けたパンソルビン・トラップ法の実用性向上に関する研究，秋田県健康環境センター年報，**5**, 2009, 54-62.
- 13) 斎藤博之，他：パンソルビン・トラップ法による食品検査法の構築（検討1），厚生労働科学研究費補助金 食品の安心・安全確保推進研究事業 食品中のウイルスの制御に関する研究 平成21年度 総括・分担研究報告書，2010, 45-60.
- 14) 東方美保，他：パンソルビン・トラップ法による食品検査法の構築（検討2），厚生労働科学研究費補助金 食品の安心・安全確保推進研究事業 食品中のウイルスの制御に関する研究 平成21年度 総括・分担研究報告書，2010, 187-197.
- 15) Hansman GS et al.: Genetic and antigenic diversity among noroviruses, *J. Gen. Virol.*, **87**, 2006, 909-919.
- 16) T. Kageyama et. al.: Broady reactive and highly sensitive assay for Norwalk-lile viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR, *J. Clin. Microbiol.*, **41**, 2003, 1548-1577

秋田県における Oral sex 経験者の *N. gonorrhoeae* および *C. trachomatis* の検出状況

佐藤寛子 柴田ちひろ 藤谷陽子 斎藤博之 安部真理子
千葉真知子 齊藤志保子 能登 彩*¹ 能登 舞*² 能登宏光*³

Oral sex 経験者 125 例を対象に初尿と咽頭スワブおよびうがい液を検体として、淋菌とクラミジアの検出状況を検討した。併せて、病原体遺伝子を real-time PCR 法で定量解析し、スワブとうがい液の有用性を比較検討した。尿検体の淋菌あるいはクラミジア陽性率は、Oral sex を患者とパートナー両者が行った A 群が 49.5%、パートナーだけの B 群が 50.0%であった。また、咽頭検体陽性率は、A 群が 15.9%、B 群が 16.7%であった。尿、咽頭検体の両方が陽性であったのは、A 群が 12.1%、B 群が 16.7%であり、両群間に有意差はなく、Oral sex はどちらの行為でも感染リスクがあることが示唆された。また、うがい液の検出率は 95.0%、スワブは 50.0%であり、双方の病原体コピー数には顕著な差がなかったことから、患者の負担軽減の面からもうがい液が有用と考えられた。

1. 緒言

近年、性交渉の多様化や低年齢化により、性感染症が若年層を中心に増えてきている。とりわけ、*Neisseria gonorrhoeae* (淋菌) と *Chlamydia trachomatis* (クラミジア) の咽頭感染は、男女共に症状が非常に乏しい¹⁾ ことに加え、性器感染ほど広く一般に知られていないことから、感染を防御することがないまま、病原体の新たな温床となりつつある。しかし、感染症法に基づく感染症発生動向調査では、咽頭感染については調査対象に含まれていないため、その実態は依然として不明である。地方の保健行政における性感染症相談業務は保健所が主体となり実施されているが、ここで使用されている資料は、咽頭感染についての情報が希薄である。さらに、これまでの咽頭感染に関する調査報告は、フィールドが首都圏であったり、対象が CSW (commercial sex workers) や MSM (men who have sex with men) であったりする場合が多く、地方における若年者にとっては現実味に欠ける情報であるのが実状である。したがって、地方の性感染症予防教育の場において、身近で活用しやすい教材となる地元のデータが必要と思われる。そこで今回、その基礎的資料の作成を目的に、Oral sex 経験者の初尿および咽頭における

淋菌とクラミジアの検出状況について検討した。また最近、核酸増幅法を用いる場合の咽頭検体として、うがい液がスワブよりも病原体検出率が高いとして注目されている²⁻⁴⁾。本研究では、各検体中の病原体を real-time PCR により定量解析し、うがい液と咽頭スワブの比較検討も行った。なお、本研究は、秋田県健康環境センター研究倫理審査委員会、秋田県健康福祉部、秋田県医師会から承認を得て、ヘルシンキ宣言に準じ実施した。

2. 対象と方法

2.1 対象

2009年6月～2010年5月までの1年間に、尿路・性器感染症を発症あるいは危惧し、秋田泌尿器科クリニックを受診した Oral sex 経験のある患者 125 名 (男性 116 名、女性 9 名) を対象とした。平均年齢は 32.5 歳であり、年代分布は 10 代 7 名、20 代 52 名、30 代 28 名、40 代 28 名、50 代 10 名であった。

2.2 方法

2.2.1 検体採取法

患者には十分なインフォームドコンセントを行い、文書による同意を得た上で検体を採取し

*¹ かつの厚生病院産婦人科、*² 秋田大学医学部附属病院皮膚科、*³ 秋田泌尿器科クリニック

表 1-1 男性と女性における淋菌, クラミジアの陽性数 (率) の比較

	男性	女性	計
尿検体	62/116 (53.4%)	2/9 (22.2%)	64/125
咽頭検体*	19/116 (16.4%)	1/9 (11.1%)	20/125
男性と女性間の陽性率の差異	N.S.**		

* うがい液, 咽頭スワブのいずれかあるいは両方

**有意差なし

表 1-2 尿あるいは咽頭検体からの淋菌, クラミジアの検出数 (率) (n=125)

	陽性	内 訳		
		淋菌	クラミジア	淋菌+クラミジア**
尿検体	64 (51.2%)	33 (26.4%)	46 (36.8%)	15 (12.0%)
咽頭検体*	20 (16.0%)	14 (11.2%)	7 (5.6%)	1 (0.8%)

* うがい液, 咽頭スワブのいずれかあるいは両方

**淋菌とクラミジアの両方を検出

た。検体としては、初尿と咽頭スワブおよびうがい液を用いた。咽頭検体は、先にスワブ、続いてうがい液を採取した。うがい液は滅菌生理食塩水 15 ml を口に含み、顔を上に向けて 10 秒以上うがいをして、吐き出したものとし、検査実施まで -25°C で保存した。また、患者には受診前の直近の性交渉における Oral sex の有無を医師が聞き取りにより確認し、有りという回答であった場合は、行為者を確認した。

2.2.2 DNA 抽出と PCR 条件

各検体からの DNA 抽出と real-time PCR 法による淋菌およびクラミジアの検出は次のように行った。スワブは綿棒を滅菌蒸留水 500 μl に振り出したものを検体とした。スワブとうがい液、尿の各検体 200 μl から MagNA Pure LC2.0 (Roche Diagnostics) を用いて 50 μl の DNA 濃縮抽出液を得た。淋菌は Geraats-Peters ら⁵⁾、クラミジアは Jatou ら⁶⁾の real-time PCR 法に準じて行った。機器は LightCycler480 (Roche Diagnostics)、試薬は Light Cycler 480 Probes Master (Roche Diagnostics) を使用した。反応容量は 20 μl である。各検体の陽性例は 1 ml 当たりの淋菌あるいはクラミジアのコピー数を算出した。咽頭検体は、スワブとうがい液の一方あるいは両方から

検出された場合を陽性と判定した。各検体の陽性数については、検体種別、対象種別に X^2 検定を行い、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

3. 結果

3.1 尿検体と咽頭検体における淋菌およびクラミジアの検出

男性 116 例中、尿検体で淋菌あるいはクラミジアが陽性であったのは 62 例 (53.4%)、咽頭検体陽性は 19 例 (16.4%) であった (表 1-1)。一方、女性 9 例中、尿検体で淋菌あるいはクラミジアが陽性であったのは 2 例 (22.2%)、咽頭検体では 1 例 (11.1%) であった。今回の調査では女性が男性と比べて少なく、男女間の各検体陽性率に有意差がなかったため、以後は男女別の検討は行わなかった。

全 125 例中、尿検体で淋菌あるいはクラミジアが陽性であったのは 64 例 (51.2%) で、内訳は淋菌 33 例 (26.4%)、クラミジア 46 例 (36.8%) で、15 例 (12.0%) が淋菌とクラミジアの重複であった (表 1-2)。

咽頭検体は 20 例 (16.0%) が陽性で、内訳は淋菌 14 例 (11.2%)、クラミジア 7 例 (5.6%)、重複 1 例 (0.8%) であった。尿検体と咽頭検体

表 1-3 尿検体陽性例の咽頭検体の淋菌, クラミジアの検出数 (率) (N=64)

	陽性	内 訳		
		淋菌	クラミジア	淋菌+クラミジア
咽頭検体*	16 (25.0%)	12 (18.8%)	5 (7.8%)	1 (1.6%)

* うがい液と咽頭スワブのいずれかあるいは両方

** 淋菌とクラミジア両方

表 1-4 年代別尿と咽頭検体の淋菌, クラミジアの陽性数 (率) (N=125)

	年 齢				
	10~19	20~29	30~39	40~49	50~59
尿検体	3/7 (42.9%)	30/52 (57.7%)	8/28 (28.6%)	13/28 (46.4%)	9/10 (90.0%)
咽頭検体*	0/7 (0.0%)	7/52 (13.5%)	5/28 (17.9%)	5/28 (17.9%)	3/10 (30.0%)

* うがい液と咽頭スワブのいずれかあるいは両方

の陽性率は、クラミジアでは尿検体の方が有意に高く ($p<0.01$)、淋菌では尿検体の陽性率が高い傾向が見られたが有意差はなかった。尿検体陽性 64 例中、咽頭検体も陽性であったのは 16 例 (25.0%) で、淋菌 12 例 (18.8%)、クラミジア 5 例 (7.8%)、重複 1 例 (1.6%) であった (表 1-3)。また、咽頭検体陽性例の性交渉パートナーは CSW17 例、非 CSW (一般女性) 3 例であった。

次に、各年代における尿検体陽性数は 10 代が 7 例中 3 例 (42.9%)、20 代が 52 例中 30 例 (57.7%)、30 代が 28 例中 8 例 (28.6%)、40 代が 28 例中 13 例 (46.4%)、50 代が 10 例中 9 例 (90.0%) であった。陽性率が最も高かったのは 50 代であり、40 代は 10 代、30 代よりも高かった。一方、咽頭検体の陽性数は 10 代 0 例 (0.0%)、20 代 7 例 (13.5%)、30 代 5 例 (17.9%)、40 代 5 例 (17.9%)、50 代 3 例 (30.0%) であり、20~40 代はほぼ同率、50 代は咽頭検体でも最も高かった。(表 1-4)。

3.2. 尿検体と咽頭検体の相関性について

尿検体が淋菌陽性 33 例中、咽頭検体も淋菌陽

性は 12 例 (36.4%) であり、尿検体淋菌陰性 92 例中、咽頭検体も淋菌陰性は 90 例 (97.8%) であった (表 2-1)。また、尿検体がクラミジア陽性 46 例中、咽頭検体もクラミジア陽性は 5 例 (10.9%) であり、尿検体クラミジア陰性 79 例中、咽頭検体もクラミジア陰性は 77 例 (97.5%) であった (表 2-2)。尿検体が陽性である場合、咽頭検体も陽性である割合は淋菌の方がクラミジアに比べて有意に高かった ($p<0.01$)。

次に、尿検体が淋菌単独陽性 18 例では、咽頭検体も淋菌陽性は 8 例 (44.4%) であったのに対し、尿検体が淋菌とクラミジア重複陽性 15 例では、咽頭検体淋菌陽性は 4 例 (26.7%) であった。一方、尿検体がクラミジア単独陽性 31 例では、咽頭検体もクラミジア陽性は 3 例 (9.7%) であったのに対し、尿検体が重複陽性 15 例では、咽頭検体クラミジア陽性は 2 例 (13.3%) であった。尿検体が重複陽性である場合の咽頭陽性率は、淋菌では単独感染の約 0.6 倍だったのに対し、クラミジアでは単独感染よりも約 1.4 倍と高かったが、共に尿検体重複陽性と単独陽性例の咽頭陽性率に有意差はなかった。

表 2-1 尿検体と咽頭検体の相関（淋菌）

		咽頭検体		計
		淋菌陽性	淋菌陰性	
尿検体	淋菌陽性	12	21	33
	淋菌陰性	2	90	92
計		14	111	125

表 2-2 尿検体と咽頭検体の相関（クラミジア）

		咽頭検体		計
		クラミジア陽性	クラミジア陰性	
尿検体	クラミジア陽性	5	41	46
	クラミジア陰性	2	77	79
計		7	118	125

表 2-3 尿検体と咽頭検体の相関

		咽頭検体				計
		淋菌	クラミジア	淋菌・クラミジア重複陽性	陰性	
尿検体	淋菌	8	0	0	10	18
	クラミジア	1	3	0	27	31
	淋菌・クラミジア重複陽性	3	1	1	10	15
	陰性	1	2	0	58	61
	計	13	6	1	105	125

3.3 Oral sex と淋菌・クラミジアの陽性率について

患者とパートナーの両者が Oral sex を行ったという回答は 107 例（85.6%）、パートナーだけが Oral sex を行ったという回答は 18 例（14.4%）であった。この 18 例は全て男性からの回答であり、パートナーは CSW が 7 例、非 CSW が 11 例であった。また、5 例はパートナーが Oral sex をした後、kiss をしたという回答であった。

Oral sex を患者とパートナー両者が行った A 群とパートナーだけが行った B 群の、尿検体と咽頭検体における淋菌あるいはクラミジアの陽性率の比較を図 1～3 に示す。尿検体の陽性率

は、A 群 49.5%（53/107）、B 群 50.0%（9/18）とほぼ同率であった（図 1）。病原体別ではクラミジアが淋菌よりも高率であったが、両群に有意差はなかった。咽頭検体の陽性率は、A 群 15.9%（17/107）、B 群 16.7%（3/18）であった（図 2）。病原体別では、両群共に淋菌の陽性率がクラミジアの約 2 倍であったが、有意差はなかった。尿と咽頭検体の重複陽性率は、A 群 12.1%（13/107）、B 群 16.7%（3/18）であり、淋菌とクラミジアが尿からも咽頭からも検出された両検体での重複陽性例が 0.9%（1/107）であった（図 3）。なお、尿検体が陰性で咽頭検体のみ陽性例が 2.8%（3/107）あり、これらは全て A 群であった。

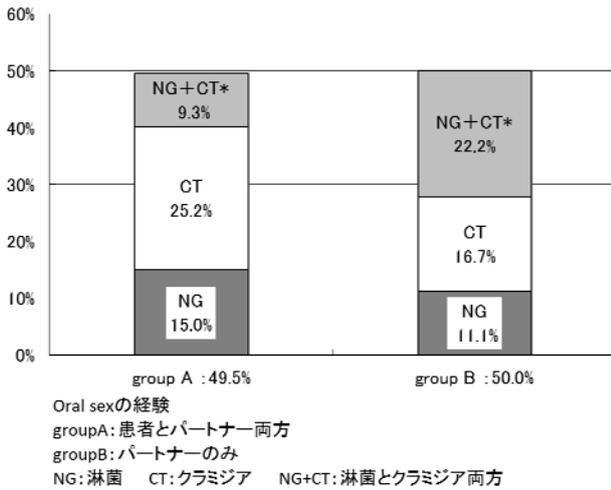


図1 Oral sex 経験者の尿検体における淋菌とクラミジアの陽性率
(groupA : n=107, groupB : n=18)

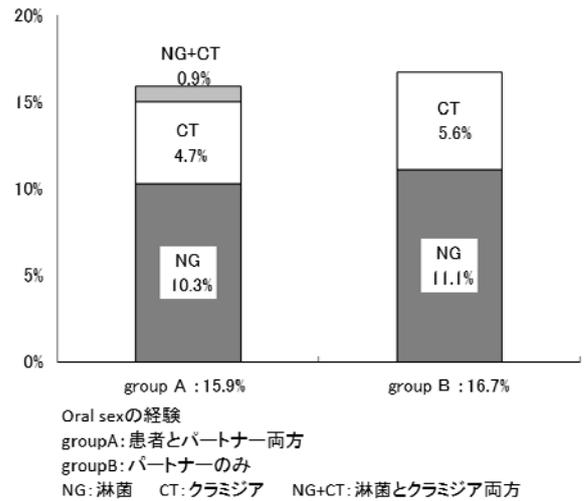


図2 Oral sex 経験者の咽頭検体における淋菌とクラミジアの陽性率
(groupA : n=107, groupB : n=18)

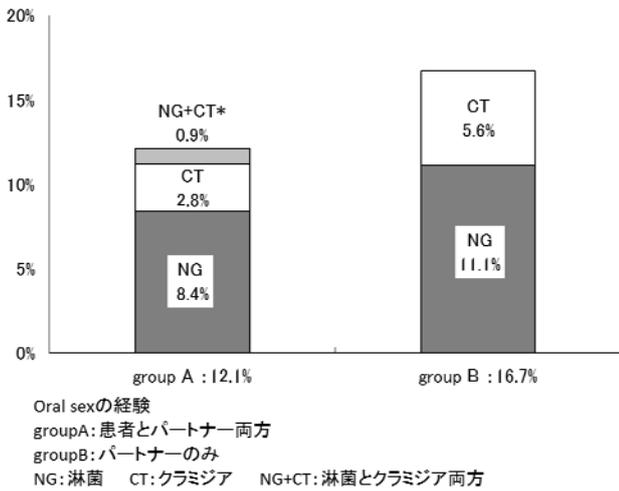


図3 尿検体が陽性であった Oral sex 経験者の咽頭検体の淋菌とクラミジアの陽性率
(groupA : n=107, groupB : n=18)

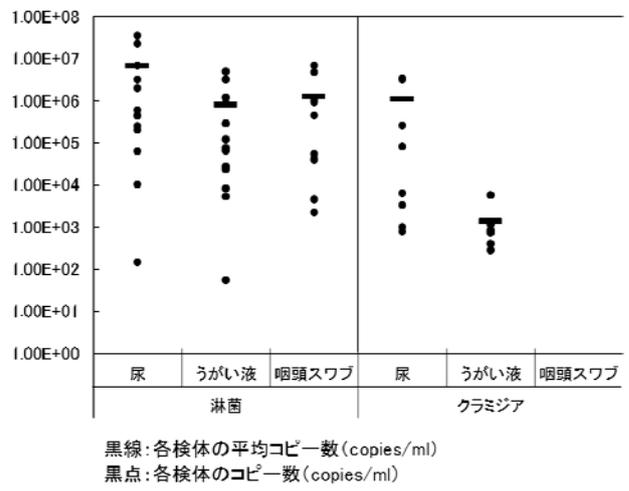


図4 検体別淋菌とクラミジアのコピー数

表3 咽頭検体種別による検出数の比較 (n=20)

	陽性	内 訳	
		淋菌	クラミジア
うがい液と咽頭スワブ両方	9	9	0
うがい液のみ	10	3	7
咽頭スワブのみ	1	1	0
Total	20	13	7
うがい液と咽頭スワブの 検出数有意差	p<0.01	N.S.*	p<0.01

* 有意差なし

3.4. うがい液とスワブの比較

咽頭検体が淋菌あるいはクラミジアが陽性 20 例中、うがい液が陽性であったのは 19 例 (95.0%)、スワブが陽性であったのは 10 例 (50.0%) であった。その内訳はうがい液とスワブ両方が陽性であったのが 9 例 (45.0%)、うがい液のみが 10 例 (50.0%)、スワブのみが 1 例 (5.0%) で、うがい液からの検出率が有意に高かった ($p < 0.01$) (表 3)。病原体別では、淋菌は両方からの検出が 9 例 (69.2%)、うがい液のみが 3 例 (23.1%)、スワブのみが 1 例 (7.7%) であった。クラミジアはスワブからの検出はなく、うがい液のみ 7 例 (100%) であった。淋菌では、うがい液とスワブの検出率に有意差はなかったが、クラミジアではスワブよりうがい液の検出率が有意に高かった ($p < 0.01$)。

図 4 に各検体のコピー数と平均コピー数を示す。淋菌の平均コピー数は尿検体が 6.77×10^6 copies/ml に対し、うがい液が 8.31×10^5 copies/ml、スワブが 1.30×10^6 copies/ml であり、3 種類の検体の平均コピー数は同程度であった。一方、クラミジアでは尿が 1.12×10^6 copies/ml に対し、うがい液が 1.41×10^3 copies/ml で 1000 倍の差があった。

4. 考察

都市部の調査^{7,8)}では、病原体が性器に存在した場合、淋菌は 10~30%、クラミジアは 10~20% の患者で咽頭感染も認められると報告されているが、今回の調査でも尿検体が陽性であった場合、淋菌が 18.8%、クラミジアが 7.8%と咽頭感染が認められ、クラミジアの感染率が若干低いものの同様の傾向が認められた。また、尿検体ではクラミジア、咽頭検体では淋菌の検出が多かったことも、これまでの調査報告^{9,10)}と同様であり、人口の少ない地方都市であっても大都市圏と同じような傾向で感染が蔓延している可能性が示唆された。

尿検体と咽頭検体の相関性についての検討では、淋菌感染において両検体間に相関性が認められた。また、有意差はなかったが、尿検体がクラミジア単独陽性である場合よりも、淋菌と重複陽性である場合の方が、咽頭のクラミジア陽性率が 1.4 倍高かったことから、尿中の淋菌の存在がクラミジアの咽頭感染に関与している

可能性も除外できないと思われた。しかし、今回の検討では重複陽性例が少なかったため、今後、検体数を増やし、より詳細な調査と検討の余地があると考えられた。

患者とパートナーの両方が Oral sex を行った A 群と、パートナーだけが Oral sex を行った B 群の比較では、A 群のみに淋菌とクラミジアが尿からも咽頭からも検出された重複陽性例が 1 例 (0.9%)、尿検体が陰性で咽頭検体のみ陽性例が 3 例 (2.8%) 認められた。しかし、他の全ての比較においては、両グループ間に有意差が認められなかった。今回のデータは A 群と比較し、B 群の母数が少なかったことから、今後、調査対象数を増やし検討を重ねる必要があると思われるが、自身あるいはパートナーが淋菌・クラミジアを保菌している場合の Oral sex は、咽頭や性器に病原体を感染させる危険性があることが示唆された。また、患者の中にはパートナーが Oral sex をした後、kiss をしたという回答が 5 例含まれており、このような間接的な接触も咽頭感染の要因の一つになる可能性が考えられた。さらに、咽頭検体陽性例の中には検体採取時の問診ではパートナーだけが Oral sex を行ったと回答したが、直近の性交渉以前の行動については不明である。従って、直近より前に自らが Oral sex を行う等の感染機会があり、咽頭に病原体が持続感染していた者がいたことも想定される。

咽頭からの検体採取法の比較では、うがい液はスワブよりも検出数が多くクラミジアはうがい液のみからの検出であり、有意差が認められた。病原体平均コピー数は、淋菌は尿検体、うがい液およびスワブの 3 種の検体がほぼ同数であり、クラミジアはうがい液の平均コピー数が尿検体の約 1/1000 であった。近年、咽頭の淋菌・クラミジアの核酸増幅検査検体として、うがい液の有用性が高いことを示す報告³⁻⁵⁾があるが、本研究結果も同様であり、咽頭からの検体採取は、患者の負担軽減の面から考えても、スワブよりうがい液の有用性が高いと考えられた。また、淋菌・クラミジアの咽頭検体における検出率の違いは、宿主細胞への接着時間の差が感染率を左右するためと考えられている¹¹⁾。本研究でも咽頭検体からの淋菌の検出率が高く、それぞれの病原体の検出率の違いについて

の裏付けになったと思われ、また淋菌の尿検体と咽頭検体の陽性率の相関性についても、このことが一因となっている可能性があると考えられる。

以上のことから、医療機関や保健所においては、患者や相談者に対して咽頭症状の有無にかかわらず感染の可能性を念頭に置くことが適切であると考えられる。しかし現在、保健所では、咽頭の淋菌・クラミジアの検査が実施されていない事に加え、医療機関において咽頭検査が保険適用とされるのはスワブのみとなっている。また、これまで若年者への性教育の重要性が医療、教育など各現場から訴えられており、学校教育を受けている世代への啓発は本県でも多くの実績がある。しかし、対象者が若年者以上の世代が多数であった本研究において、高い陽性率が認められたことから、これからの性教育、性感染症の啓発対象として、過去に充実した性教育を受ける機会がなかった世代も加える必要があると思われた。

参考文献

- 1) 小島弘敬: NG 感染症/男性. 性感染症/HIV 感染その現状と検査・診断・治療, 性の健康医学財団, 139-49 メディカルビュー, 2001
- 2) 余田敬子, 尾上泰彦, 海野壮: 性感染症クリニック女性受診者における Real-time PCR を用いた *N.gonorrhoeae* および *C.trachomatis* の検出性の検討, 日性感染症会, **20**, 1, 2009, 127-33.
- 3) 余田敬子, 尾上泰彦, 田中伸明, 新井寧子: 当科および性感染症クリニックにおける咽頭の NG および CT 陽性率, 口咽科, **20**, 3, 2008, 347-53.
- 4) Takahashi S , Kurikuma Y , Hashimoto J, et al: Pharyngeal *Neisseria gonorrhoeae* detection in oral-throat wash specimens of male patients with urethritis, J infect Chemother, **14**, 6, 2008, 442-444.
- 5) C.W.M Geraats-Peters,et al: Specific and Sensitive Detection of *Neisseria gonorrhoeae* in Clinical Specimens by Real-Time PCR, J.Clin.Microbiol, **43**, 11, 2005, 5653-5659.
- 6) Katia Jatou, et al: A novel real-time PCR to detect *Chlamydia trachomatis* in first-void urine or genital swabs, J.Med.Microbiol, **55**, 12, 2006, 1667-1674.
- 7) 性感染症診断・治療ガイドライン 日性感染症会誌, **19**, 1, 2008, 51.
- 8) 性感染症診断・治療ガイドライン日性感染症会誌, **19**, 1, 2008, 58.
- 9) 余田敬子, 尾上泰彦, 檜原摩紀, 池田淳, 雑賀威, 高梨真樹: *Neisseria gonorrhoeae* および *Chlamydia trachomatis* の咽頭および性器感染-性感染症クリニック受診者からみた現状-, 日性感染症会誌, **20**, 2, 2009, 45.
- 10) 野口靖之: 産婦人科領域における無症候性感染のスクリーニング, 厚生労働科学研究「性感染症の効果的な蔓延防止に関する研究班」, 2004.
- 11) 尾上泰彦: コマーシャルセックスワーカーとクラミジア性, 淋菌性咽頭炎, Mebio, **24**, 1, 2007, 60.
- 12) 瀧砂良一, 松本哲朗: オーラルセックスと性感染症, 臨床とウイルス, **38**, 4, 2010, 291.

新規制物質 1,4-ジオキサンの固相抽出及びヘッドスペース分析法の検討

小川千春 小林貴司

公共用水域及び地下水中 1,4-ジオキサン分析の公定法である固相抽出ーガスクロマトグラフ質量分析法の導入に係る基礎的検討を行った。その結果、精度良く分析するために、活性炭カラム 2 本とも抽出を行うこと、適度な窒素吹きつけ濃縮を行うことが必要であった。また、廃水や地下水などの実試料について、固相抽出法とヘッドスペース法での定量値を比較したところ、ヘッドスペース法の定量下限値 (0.05 mg/L) 以上の濃度での 2 法の定量値は良く一致しており、排水試料の分析方法としてヘッドスペース法は十分適用できる方法と考えられた。

1. はじめに

1,4-ジオキサンは、環境中で分解しにくく、非常に水に溶けやすい¹⁾化学物質である。そのため、汚水の一般的な処理法である活性汚泥法や凝集沈殿法では除去効果が低く^{2,3)}、環境中での広範囲な残存状況が報告⁴⁾されるなど、生態系への悪影響が懸念されている。人に対する毒性としても、発がん性が疑われている⁵⁾ことから、平成 21 年 11 月に公共用水域の水質汚濁に係る人の健康の保護に関する環境基準及び地下水の水質汚濁に係る環境基準に 1,4-ジオキサンが追加された^{6,7)}。

この 1,4-ジオキサンの公定分析法は、固相抽出ーガスクロマトグラフ質量分析法 (固相抽出法) であり、水に溶けやすい 1,4-ジオキサンを精度良く回収するために、吸着力の強い活性炭を二段連結で使う特殊な方法である。さらに 1,4-ジオキサンは揮発性物質でもあり、揮散による損失にも注意を払う必要がある。そこで、公共用水域及び地下水中の 1,4-ジオキサンを精度よく分析するため、活性炭による固相抽出法についての基礎的な検討を行った。

また、1,4-ジオキサンは排水基準への追加も検討されており、基準値は環境基準 (0.05 mg/L) の 10 倍値 (0.5 mg/L) となる見込みである。分析方法として、前処理操作の簡便なヘッドスペースーガスクロマトグラフ質量分析法 (ヘッドスペース法) も採用される可能性があるため⁸⁾、固相抽出法とヘッドスペース法での定量値を比較したので併せて報告する。

2. 方法

2.1 試薬の調製

メタノールは関東化学製水質試験用、アセトンは和光純薬製残留農薬・PCB 試験用 (5000 倍濃縮保証品)、水はザルトリウス製 arium 611UV 超純水製造装置で製造した超純水を使用した。

添加回収試験に用いる 1000 mg/L 1,4-ジオキサン水溶液及びサロゲートとして用いる 1000 mg/L 1,4-ジオキサン-d₈ 水溶液の調製にはスペルコ製 neat を使用した。

測定感度補正のための内標準 (シリンジスパイク) として用いる 1000 mg/L 4-ブロモフルオロベンゼン メタノール溶液の調製にはスペルコ製 25000 µg/mL 4-ブロモフルオロベンゼン メタノール溶液を使用した。

検量線用標準液として用いる 0.1, 0.2, 0.5, 1, 10, 100 mg/L 1,4-ジオキサン アセトン溶液の調製にはスペルコ製 1000 µg/mL 1,4-ジオキサンメタノール溶液を使用し、それぞれに 1,4-ジオキサン-d₈ と 4-ブロモフルオロベンゼンを 2 mg/L となるよう添加した。

2.2 装置

固相抽出装置は Waters 製 Sep-Pak Concentrator を使用した。活性炭カラムはジーエルサイエンス製 GL-Pak 活性炭 Jr. 400 mg を、妨害成分除去用カラムはジーエルサイエンス製 InertSep mini RP-1 を用い、いずれもアセトンと水でコンディショニングしてから使用した。濃縮管はジーエルサイエンス製 GL-SPE 濃縮管 0.5 mL & 1.0 mL メスを使用した。

測定には J&W 製キャピラリーカラム DB-624 (内径 0.32 mm, 長さ 60 m, 膜厚 1.8 μm) を取り付けた島津製ガスクロマトグラフ質量分析計 (GC/MS) GCMS-QP5000 を使用した。

ヘッドスペースオートサンプラーはパーキンエルマー製 TurboMatrix HS-40 を使用した。

2.3 分析方法

固相抽出法における試料水の前処理手順を図 1 に示した。試料水 200 mL にサロゲート溶液 10 μL を添加後、妨害成分除去用 SDB カラムと活性炭カラム 2 本を直列に接続したものに毎分 10 mL で通水した。水 10 mL で洗浄後、活性炭カラムをそれぞれ 30 分間の吸引により脱水した。活性炭カラムからアセトン 5 mL のバックフラッシュにより得られた溶出液に室温 (25 $^{\circ}\text{C}$) で流速 300 mL/min の窒素を吹きつけ 2 mL に濃縮後、シリンジスパイク溶液 10 μL を添加し、GC/MS 測定用試料とした。GC/MS 測定条件は以下のとおりである。

注入方法：スプリットレス，注入量：1 μL ，注入口温度：200 $^{\circ}\text{C}$ ，キャリアーガス及びカラム入口圧：He 100 kPa，オープン温度：40 $^{\circ}\text{C}$ (1 min) - 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ - 120 $^{\circ}\text{C}$ - 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ - 200 $^{\circ}\text{C}$ (5 min)，インターフェース温度：230 $^{\circ}\text{C}$ ，測定モード：SIM 法，測定質量数 (m/z：定量イオン，確認イオン)：1,4-ジオキサン (88, 58)，1,4-ジオキサン- d_8 (96, 64)，4-ブロモフルオロベンゼン (174, 95)

1,4-ジオキサンの定量は 1,4-ジオキサン- d_8 を，1,4-ジオキサン- d_8 の回収率は 4-ブロモフルオロベンゼンを内部標準として算出した。

2.4 実試料の分析及びヘッドスペース法との比較

公定法である固相抽出法での精度を確認するため，実試料 15 検体 (公共用水域：4 検体，地下水：4 検体，産業廃棄物処理施設の浸出水・処理水：7 検体) の分析を行った。

また，分析値の比較のため，同一試料をヘッドスペース法でも分析した。手順は次のとおりである。

試料水 10 mL，塩化ナトリウム 3.0 g 及び内標準液を入れ，キャップした 22 mL バイアルからヘッドスペースオートサンプラーを用いて，気

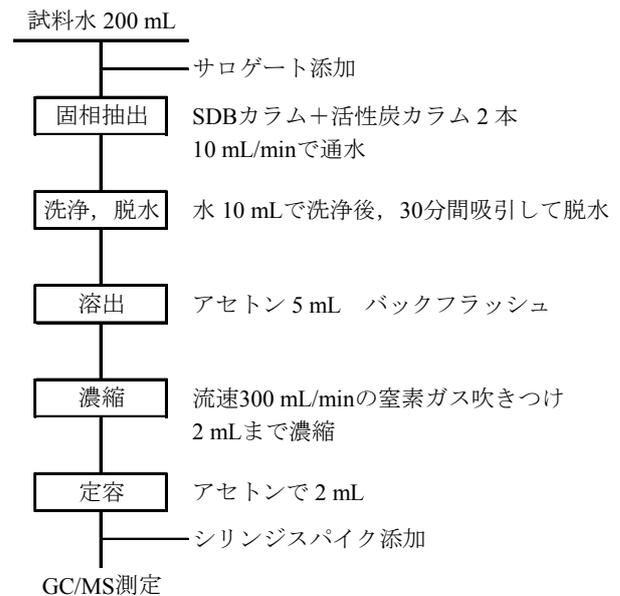


図 1 試料水の前処理手順

液平衡温度：60 $^{\circ}\text{C}$ ，気液平衡時間：30 min，ニードル温度：120 $^{\circ}\text{C}$ ，トランスファーライン温度：120 $^{\circ}\text{C}$ ，加圧時間：3.0 min，インジェクション時間：0.14 min の条件で採取した試料を GC/MS に導き測定した。

3. 結果及び考察

3.1 活性炭カラムの溶出本数の検討

試料水 200 mL 中 1,4-ジオキサン濃度を目標定量下限 (環境基準値の 1/10) の 0.005 mg/L として分析 (n=3) を行い，サロゲートの回収率を求めた結果，1 段目は 69.7~82.9%，2 段目は 21.9~31.8%，1 段目と 2 段目の合計は 101.5~104.8% となった。1,4-ジオキサンの破過を考慮し，十分なコンディショニングなどで有機溶媒混入を極力避けたにもかかわらず，2 段目への破過が 30% も確認される結果であった。廃水など有機物量が多い試料の場合，活性炭カラム 1 本の溶出では回収率が 50% を下回るおそれがあるため，活性炭カラム 2 本とも溶出操作を行い，あわせて 1 試料とすることにした。

また，通水量による 1,4-ジオキサンの挙動を確認するため，試料量を 500 mL として同様にサロゲートの回収率を求めた結果，1 段目は 76.7~80.4%，2 段目は 23.2~26.3%，1 段目と 2 段目の合計は 102.9~103.6% と，試料量 200 mL での 1,4-ジオキサン- d_8 の存在割合とほぼ同等の結果であった。

3.2 窒素吹きつけ濃縮の検討

1,4-ジオキサンは揮発性が高く、濃縮操作により揮散するため⁹⁾、当センターでの窒素吹きつけ条件下において揮散状況の確認を行った。

確認試験は、濃度 1 mg/L の 1,4-ジオキサンのアセトン溶液 5 mL に流速 300 mL/min の窒素を吹きつけ、4,3,2,1,0.5 mL まで濃縮後、5 mL にメスアップしシリンジスパイクを添加、回収率を確認することで行った。図 2 に窒素吹きつけ濃縮による回収率の低下を示した。濃縮量が 2 mL を下回ると 1,4-ジオキサンの回収率は、大きく低下した。2 mL までは減少傾向がゆるやかであるため、濃縮操作は 2 mL まで行うことにした。

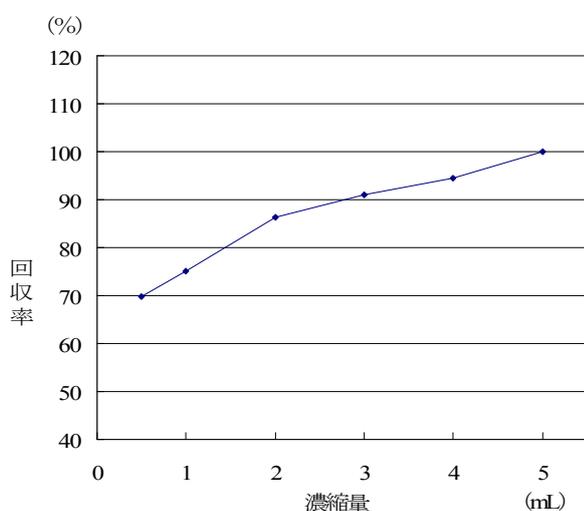


図 2 窒素吹きつけ濃縮による回収率の低下

3.3 添加回収試験

3.1 と 3.2 の検討を踏まえ、図 1 の手順により、試料水 200 mL 中 1,4-ジオキサン濃度を目標定量下限の 0.005 mg/L とし、添加回収試験 (n=3) を行った。表 1 に回収率を示す。1,4-ジオキサンの回収率は 88.7~91.7%、サロゲートの回収率は 82.6~89.3%と、それぞれ公定法で規定されている回収率 70~120%及び 50~120%を満たしていた。測定感度の面からも、窒素吹きつけ濃縮により十分なピーク強度が得られており、

表 1 1,4-ジオキサン及び 1,4-ジオキサン-d₈ の回収率 (%)

	1,4-ジオキサン	サロゲート (-d ₈)
1 回目	90.5	83.0
2 回目	91.7	82.6
3 回目	88.7	89.3

目標定量下限 0.005 mg/L という低い濃度であっても、良好な結果を得ることができた。

3.4 実試料の分析及びヘッドスペース法との比較

表 2 に固相抽出法及びヘッドスペース法による公共用水域及び地下水の分析結果を示した。実試料の定量値が 0.005 mg/L 以下の低濃度であるため定量値の比較はできないが、固相抽出法でのサロゲートの回収率は 67.9~89.5%であった。表 3 に産業廃棄物処理施設の浸出水・処理水の分析結果を、図 3 に固相抽出法とヘッドスペース法での定量値の相関を示した。固相抽出法でのサロゲートの回収率は、有機物量の多い廃水試料であっても 96.7~109.2%と良好であった。また、固相抽出法とヘッドスペース法で得られた定量値は、ヘッドスペース法での定量下限 0.05 mg/L 以上の濃度であり、非常に良く一致していた。予想される排水基準値が 0.5 mg/L であることを考慮すると、排水試料の分析方法としてヘッドスペース法は十分適用できる方法と考えられた。

4. まとめ

公共用水域及び地下水中の 1,4-ジオキサン分析の公定法である固相抽出法の基礎的検討を行った。精度よく分析を行うためには①活性炭カラム 2 本とも抽出を行うこと、②窒素吹きつけ濃縮を 2 mL まで行うことが必要であった。

また、固相抽出法とヘッドスペース法での定量値を比較した結果、ヘッドスペース法の定量下限 0.05 mg/L 以上の濃度であれば、両法の定量値は良く一致していた。排水などの高濃度試料には前処理操作の簡便なヘッドスペース法、地下水などの低濃度試料には固相抽出法と 2 つの分析法を使い分けることで、精度良く迅速に 1,4-ジオキサン分析を行うことができると考えられる。

今後は、低濃度でのヘッドスペース法の適用範囲を広げるために、ヘッドスペース法の定量下限について検討を行う予定である。

表 2 公共用水域及び地下水の 1,4-ジオキサン濃度

	1,4-ジオキサン (mg/L)	
	固相抽出法	HS 法*
公共用水域 1	< 0.005 (68.1)	< 0.05
公共用水域 2	0.005 (67.9)	< 0.05
公共用水域 3	< 0.005 (83.7)	< 0.05
公共用水域 4	0.005 (81.9)	< 0.05
地下水 1	< 0.005 (89.5)	< 0.05
地下水 2	< 0.005 (83.8)	< 0.05
地下水 3	< 0.005 (76.7)	< 0.05
地下水 4	< 0.005 (89.2)	< 0.05

() はサロゲートの回収率 (%)

*: ヘッドスペース法

表 3 産業廃棄物処理施設の浸出水及び処理水の 1,4-ジオキサン濃度

	1,4-ジオキサン (mg/L)	
	固相抽出法	HS 法*
浸出水 1	1.7 (96.7)	1.9
浸出水 2	2.6 (101.2)	3.2
浸出水 3	0.43 (109.2)	0.46
処理水 1	0.069 (106.2)	0.06
処理水 2	0.15 (104.6)	0.16
処理水 3	0.57 (107.0)	0.61
放流水	0.24 (108.0)	0.27

() はサロゲートの回収率 (%)

*: ヘッドスペース法

参考文献

- 1) 環境省環境保健部環境リスク評価室：化学物質の環境リスク評価 第2巻, 2003, 150.
- 2) 牧野良次, 蒲生昌志, 佐藤修之, 中西準子：1,4-ジオキサンの下水処理場における除去率について, 水環境学会誌, **28**, 3, 2005, 211-215.
- 3) 高木総吉, 宮野啓一, 小泉義彦, 安達史恵, 渡邊功, 織田肇：大阪府内水道水源および淀川水系における 1,4-ジオキサンレベルの実態調査, 環境化学,**16**, 4, 2006, 669-676.
- 4) 環境省環境保健部環境安全課：平成 14 年度版 化学物質と環境, 2003, 209-247.
- 5) International Agency for Research on Cancer: IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, **71**, 1999, 589-602.
- 6) 環境省：環境省告示第 78 号, 平成 21 年 11 月 30 日.
- 7) 環境省：環境省告示第 79 号, 平成 21 年 11 月 30 日.
- 8) 環境省：中央環境審議会水環境部会 排水規制等専門委員会 (第 10 回) 資料, 2011.
- 9) 矢野美穂, 川元達彦, 巻幡希子, 谷本高敏, 河野義一：改良型固相抽出ガスクロマトグラフィー/質量分析法による兵庫県下の原水及び水道水中の 1,4-ジオキサンの高感度定量, 分析化学, **54**, 9, 2005, 917-921.

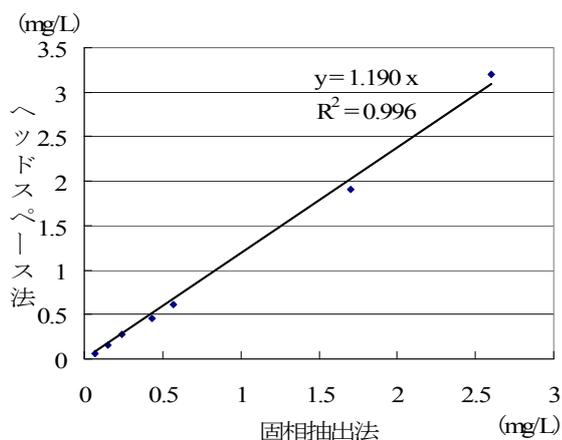


図 3 固相抽出法とヘッドスペース法の相関

玉川酸性水中和処理におけるシュベルトマナイト様化合物形成 による重金属吸着挙動

佐々木純恵 成田修司 高橋英之 佐久間昂* 布田 潔*

当センターでは平成22年度から「玉川源泉の酸度上昇にも対応した実証的中和処理技術の開発とその対策がもたらす水質改善効果」に関する研究を実施している。その研究でヒ素（As）の吸着能を有する茶褐色の非晶質水酸化鉄と思われる堆積物が玉川中和処理施設放流口に存在することを確認した。本研究ではこの堆積物の同定を行うとともに、源泉中の重金属の中和処理における吸着除去挙動を明らかにすることを目的に調査を実施した。その結果、中和処理施設放流口の堆積物はシュベルトマナイト（Sch）様化合物であることが明らかとなった。また、源泉の As 4.2 mg/L、鉛（Pb）1.2 mg/L、クロム（Cr）0.10 mg/L の重金属濃度は中和処理過程において Sch 様化合物の形成に伴う吸着除去により、As <0.001 mg/L、Pb 0.49 mg/L、Cr 0.014 mg/L に減少し、同化合物の一部が As 14.0×10^3 mg/kg、Pb 0.61×10^3 mg/kg、Cr 0.19×10^3 mg/kg の濃度で蓄積し、中和処理施設放流口に堆積していた。中和処理後の pH 3.5 の溶液中における As、Cr はオキソアニオンの形態で Sch 様化合物構造内の硫酸イオン（ SO_4^{2-} ）との配位子交換により吸着され、また、Pb は 2 価カチオンの形態で Sch 様化合物表面に生じた $\text{OH}\text{SO}_4^{2-}$ と錯体を形成することによって吸着されると考えられる。この Pb の吸着は源泉由来の多量の SO_4^{2-} によってもたらされたものと考えられる。

1. はじめに

秋田県仙北市玉川上流部に位置する玉川源泉の大噴は、湧出量 9000 L/min を誇り、鉄（Fe）（II）、アルミニウム（Al）（III）、硫酸-塩酸を主成分とする pH 約 1.2 の強酸性泉として知られている。この玉川源泉はその特異的な泉質のため、源泉やその下流域である玉川支流の渋黒川（図1）の化学組成に関する研究が行われている。特に、源泉中に含まれるヒ素（As）の挙動に関して秋田大学の佐藤らは渋黒川流域を対象として調査を行った¹⁾。佐藤らはこの流域の pH 2.9~3.9 領域で源泉由来の Fe（II）、硫酸イオン（ SO_4^{2-} ）が結合し、形成されたと考えられる非晶質水酸化鉄およびシュベルトマナイト等の吸着除去作用がもたらす河川水中での As 濃度の減少を報告した¹⁾。また、pH 6.3 の地点の懸濁物質からはバクテリア類が多数認められたことも報告されている¹⁾。これらの報告を受け、非晶質水酸化鉄の形成に関わるバクテリアの存在を特定することを目的に、当センターでは渋黒川流域に生息する鉄酸化細菌の種の特異性と生息分布に関する研究を行った²⁾。これらの結果から、流域に生息する鉄酸化細菌が Fe（II）から Fe（III）への酸化

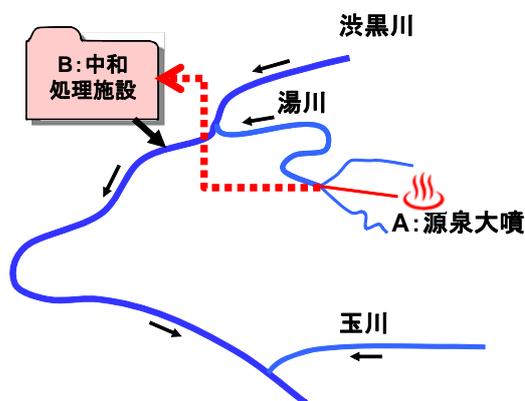


図1 玉川上流部・中和処理施設周辺の概要図
およびサンプリング地点



図2 玉川中和処理施設放流口

*秋田大学工学資源学部

反応を促進し、非晶質水酸化鉄の形成に関与している可能性があることを報告した²⁾。さらに、玉川中和処理施設放流口(図2)に上記の非晶質水酸化鉄と考えられる堆積物がみられていることを平成22年からの当センターと秋田大学の布田らとの調査で確認した³⁾。この堆積物はFe(II)、SO₄²⁻を多量に含む源泉の大部分が中和処理施設に導入され、pH約3.5まで中和処理され、源泉の酸性を弱める過程によって生成したものと考えられる。つまり、上記の非晶質水酸化鉄と考えられる堆積物は、中和処理を行う過程で源泉中に含まれる重金属を吸着除去している可能性が高い。そこで本研究では中和処理施設放流口の堆積物の特性評価による同定を行い、その中に含まれる重金属濃度を定量し、源泉中重金属の中和処理における吸着除去の挙動を明らかにすることを目的とした。

2. 方法

2.1 試料の採取

平成22年10月に図1に示す地点A：大噴の源泉，地点B：中和処理施設の中和処理放流水，同施設放流口の堆積物を採取し，試料とした。

2.2 中和処理施設放流口の堆積物の同定³⁾

中和処理施設放流口の堆積物を乾燥させ、夾雑物を取り除いた後、メノウ乳鉢で粉碎した。その後、100メッシュの篩にかけ、粒径を揃えたものを測定試料とし、XRD(X-ray Diffraction)およびFT-IR(Fourier-transform Infrared Spectroscopy)により同定を行った。

2.3 採取試料の重金属定量分析

2.3.1 試料の前処理

源泉は未ろ過のまま，中和処理放流水は溶液反応で形成されている可能性が考えられる非晶質水酸化鉄の混入を防ぐため，0.45 μm メンブレ

ンフィルターでろ過後，「JIS K 0102 (2008) 5.1」に従い，10倍濃縮の試料溶液とした。また，中和処理施設放流口の堆積物は「環境省 底質調査方法(平成12年3月) 5.1.1(4) a」湿式分解法に従い，2.00 g 秤量し，100 mL の試料溶液とした。

2.3.2 標準添加法による高濃度 Fe 試料中の As, 鉛 (Pb), クロム (Cr) の定量分析

Pb, Cr の定量は誘導結合プラズマ (Inductively Coupled Plasma : ICP) 発光分析法を用い，次の2つのステップで行った。はじめに ICP 発光分析装置 (ThermoFisher Scientific 社製 iCAP 6300 Duo) を用いた1点検量法による65元素の半定量分析を行い，目的元素のおおよその濃度を測定した。次にその結果をふまえ，上記非晶質水酸化鉄の主成分であり，また，源泉，中和処理放流水にも高濃度で溶存している Fe の干渉を避けるため，標準添加法により定量分析を行った。ここでは一定量の試料溶液 (5.0 mL) に表1に示すように標準液を添加し，0.1 N 硝酸で10 mL にメスアップしたものを例として示す。これより作成した検量線 (図3) $y=0$ により式 (1) にて x を求め，試料中の目的元素の濃度を算出した。

また，As の定量は水素化物発生装置を用いた原子吸光分析装置 (Varian 社製 SpectrAA280FS) を使用し，0.001, 0.002, 0.003, 0.005 mg/L の絶対検量線を作成し，定量分析を行った。

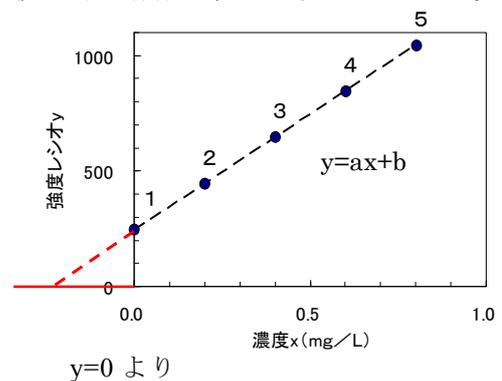


図3 標準添加法により作成した検量線

表1 標準添加法における試料溶液中への標準液の添加量

No.	1	2	3	4	5
Me 濃度 (μg/mL)	0	0.2	0.4	0.6	0.8
Me 標準液 (1 μg/mL) (mL)	0	1.0	2.0	3.0	4.0
試料溶液 (随時希釈) (mL)	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0

Me : Pb および Cr

3. 結果と考察

3.1 中和処理施設放流口の堆積物の同定³⁾

中和処理施設放流口にみられた非晶質水酸化鉄と考えられる堆積物の XRD の結果 (図 4) から、オキシ酸化鉄硫酸塩鉱物の一種であるシュベルトマナイト ($\text{Fe}_8\text{O}_8(\text{OH})_{8-2x}(\text{SO}_4)_x, (1 < x < 1.75)$) (以下 Sch と記述) のパターンと酷似した回折線が認められた。また、FT-IR の結果 (図 5) より Sch 中の二座配意型 SO_4^{2-} に特徴的な 4 つの吸収がみられた。これらの結果より中和処理施設放流口の堆積物は Sch 様化合物であることが明らかとなった。

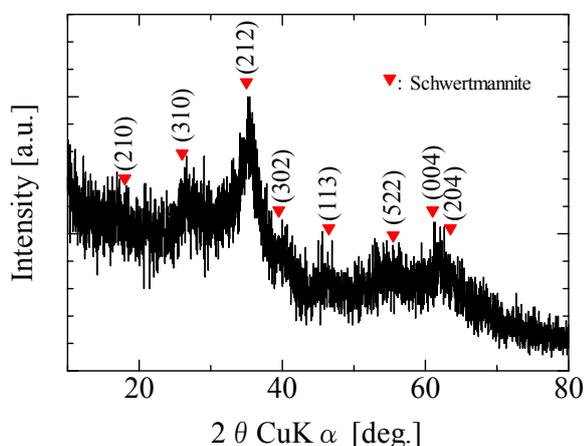


図 4 中和処理施設放流口の堆積物の XRD パターン

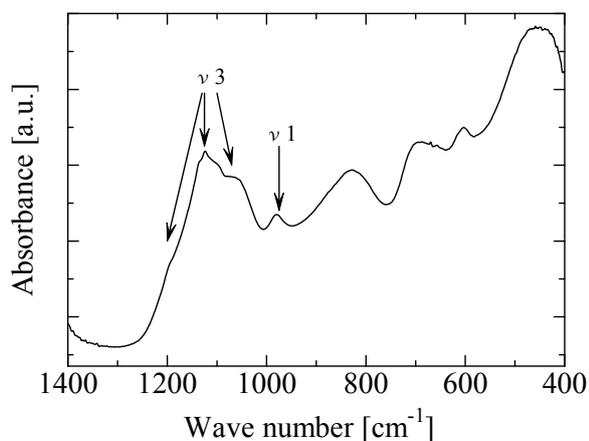


図 5 中和処理施設放流口の堆積物の IR スペクトル

3.2 中和処理過程における源泉中の重金属の吸着除去挙動

源泉, 中和処理放流水の As, Pb, Cr 濃度を表 2 に示す。源泉の重金属濃度は As が 4.2 mg/L, Pb が 1.2 mg/L, Cr が 0.10 mg/L であり, 中和処理放流水の重金属濃度は As が <0.001 mg/L, Pb が 0.49 mg/L, Cr が 0.014 mg/L であった。これらの結果より, 源泉中の重金属濃度が中和処理過程において減少していることが明らかとなった。また, 中和処理施設放流口に堆積している Sch 様化合物には表 3 に示すように, As が 14.0×10^3 mg/kg, Pb が 0.61×10^3 mg/kg, Cr が 0.19×10^3 mg/kg の濃度で含有していた。つまり, 上記重金属は Sch 様化合物に吸着され, 高濃度で蓄積されたと考えられる。以上の結果より源泉中の重金属は中和処理過程において Sch 様化合物の形成に伴う吸着除去の後, 同化合物の一部が中和処理施設放流口に堆積していると考えられる。

中和処理放流水中の pH 約 3.5 の溶液中において上記 As, Cr は負電荷を持つオキソアニオン, Pb は正電荷を持つ 2 価カチオンの形態で存在している⁴⁾ため, それぞれ異なる機構で Sch 様化合物に吸着されていると考えられる。そこで, これらの吸着機構について, 近年報告された Sch の吸着反応機構モデル^{4,9)}を用い, 以下に記述する。

表 2 源泉, 中和処理放流水の As, Pb, Cr 濃度

	源泉 (mg/L)	中和処理放流水 (mg/L)
As	4.2	<0.001
Pb	1.2	0.49
Cr	0.10	0.014

表 3 Sch 様化合物中の As, Pb, Cr 濃度

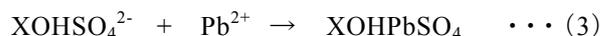
	Sch 様化合物 (mg/kg)
As	14.0×10^3
Pb	0.61×10^3
Cr	0.19×10^3

3.3 Sch における重金属吸着反応機構

Sch における重金属吸着反応機構は大きくオキソアニオンの場合と 2 価カチオンの場合の 2 つに分けられる。As, Cr は pH 2.0~4.0 の領域で As (V), Cr (VI) のオキソアニオンである H_2AsO_4^- , HCrO_4^- の形態で吸着されることが知られている^{4,6)}。Sch は図 6 に示すように Fe 八面体 ($\text{FeO}_3(\text{OH})_3$) で作られるトンネル構造を持ち、この基質表面に存在する OH 基の一部と置換することによって、 SO_4^{2-} がトンネル内に吸着保持される^{4,7)}。オキソアニオンである H_2AsO_4^- はこの Sch のトンネル内の SO_4^{2-} と配位子交換を行い、同時に H^+ を放出することにより吸着される (図 7)^{4,7)}。 HCrO_4^- も SO_4^{2-} との配位子交換による同様の吸着反応機構となる。

一方、2 価カチオンの Pb^{2+} は、Sch 基質 (X) 表面に存在する OH 基と SO_4^{2-} の配位結合によっ

て生じた $\text{OH}\text{SO}_4^{2-}$ (式 (2)) が Pb^{2+} と錯体を形成する (式 (3)) ことによって吸着される^{4,9)}。



一般に 2 価カチオンは pH 上昇に対応してその吸着能を発現するが、Sch が形成される pH 2.0~4.0 では吸着能は小さいことが報告されている^{4,8,9)}。しかし、多量の SO_4^{2-} が存在する場合、酸性溶液中においても上記のような機構により Pb の吸着が増大するという報告も近年なされている^{4,8,9)}。つまり、中和処理施設放流口の堆積物中に観測された Pb の蓄積は中和処理過程において、源泉由来の多量の SO_4^{2-} が Sch 様化合物表面への吸着を増大させることによってもたらされたものと考えられる。

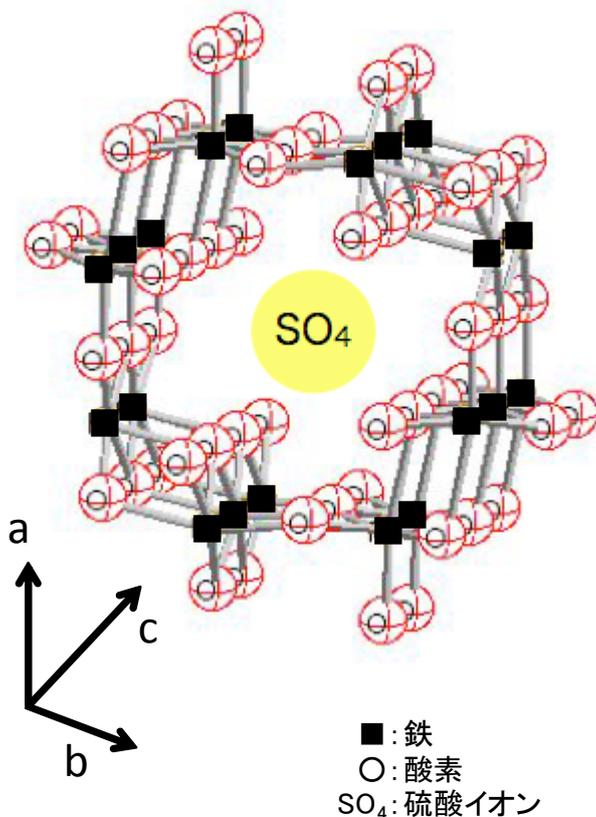


図 6 鉄, 酸素, 硫酸イオンからなるシュベルトマナイトの構造⁵⁾

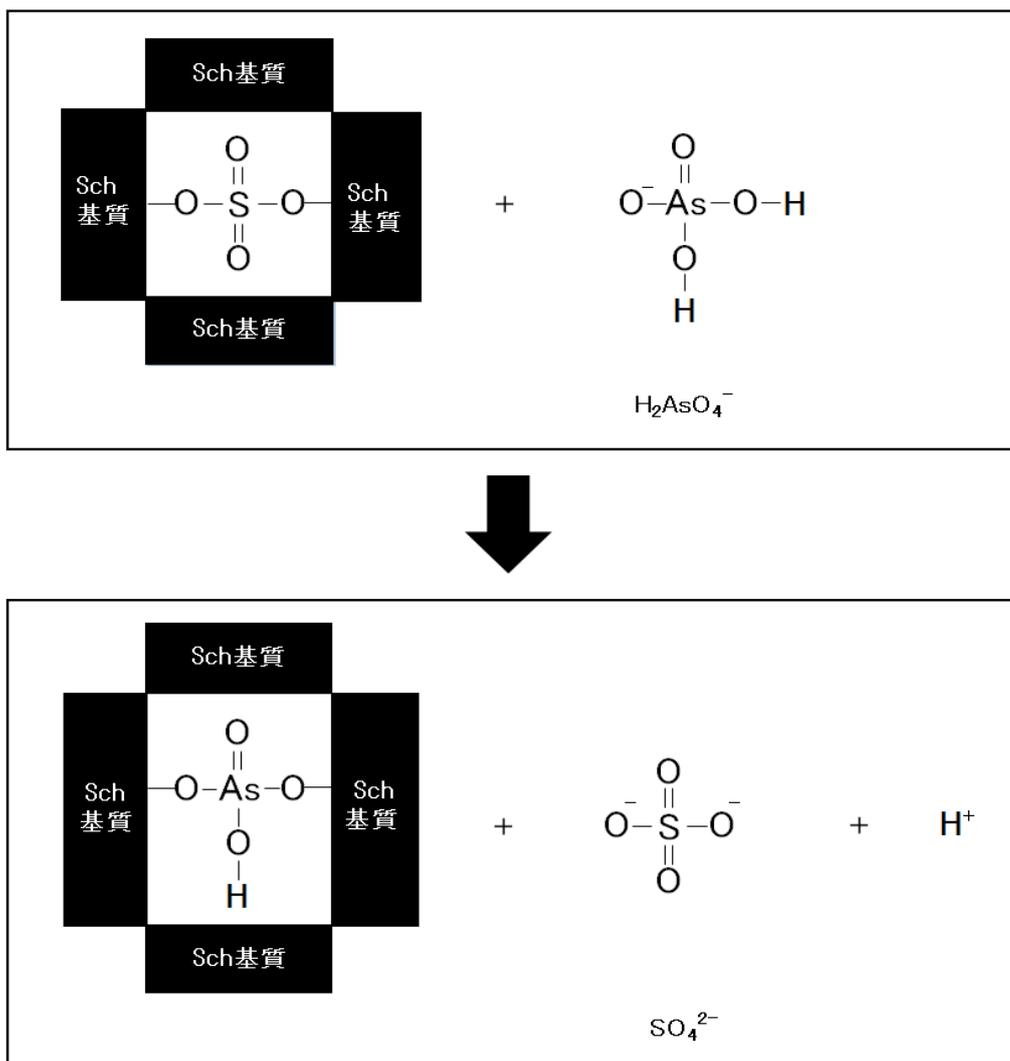


図7 シュベルトマナイトにおけるトンネル構造中のSO₄²⁻とH₂AsO₄⁻の配位子交換反応

参考文献

- 1) 佐藤比奈子, 石山大三, 水田敏夫, 西川 治, 世良耕一郎, 遠田幸生: 秋田県八幡平西部の温泉水と渋黒川水系河川水の化学組成, NMCC 共同利用研究成果報文集 13, 2005, 128-134.
- 2) 大原典子, 和田佳久, 成田修司, 八柳 潤, 布田 潔: 玉川温泉下流域における鉄酸化細菌の生息分布, 水環境学会誌, 32(1), 2009, 29-32.
- 3) 佐久間昂: 平成22年度秋田大学大学院工学資源学研究科修士論文
- 4) 河野元治, 小保方寿峰, 富田克利: シュベルトマナイトの表面反応サイトとイオン吸着モデリング, 粘土科学, 45(4), 2006, 223-232.
- 5) 酒巻真粧子, 赤塚拓也, 金子拓真, 小西健久, 高橋裕一, 水牧仁一郎: シュベルトマナイト結晶化過程における陰イオン種の効果, 萌芽的

研究支援報告書, A1381, 2007, 1-4.

- 6) 高田盛生, 福士圭介, 佐藤 努, 米田哲朗: シュベルトマナイト鉱物表面における吸着陰イオン種の選択性, 粘土科学討論会講演要旨集, 50, 2006, 108-109.
- 7) 福士圭介: フェリハイドライト・シュベルトマナイトの生成と環境親和物質としての役割, <http://earth.s.kanazawa-u.ac.jp/fukushi/schwertmannite.pdf> (アクセス日 2011/8/18)
- 8) P.J. Swedlund, J.G. Webster: Cu and Zn ternary surface complex formation with SO₄²⁻ on ferrihydrite and shwertmannite, Applied Geochemistry, 16, 2001, 503-511.
- 9) P.J. Swedlund, J.G. Webster, G. M. Miskelly: The effect of SO₄ on the ferrihydrite adsorption of Co, Pb and Cd: ternary complexes and site heterogeneity: Applied Geochemistry, 18, 2003, 1671-1689.

IV 発表業績

1. 学会発表

秋田県内における HPV 感染状況と検出型リスク分類

柴田ちひろ，佐藤寛子，斎藤博之
安部真理子，齊藤志保子

第 59 回東北公衆衛生学会
2010 年 7 月，山形市

平成 21 年 12 月に子宮頸がん予防ワクチンの販売が開始されたが，ワクチン対応型以外のハイリスク型ヒトパピローマウイルス（HPV）も存在することから，秋田県内における HPV 感染状況について調査した。

平成 21 年 5 月～10 月に協力産科医療機関を受診した女性 57 名の子宮頸管スワブ検体について，primer MY09/11 と GP5⁺/6⁺による nested PCR（MY/GP 法）及び L1C1/L1C2M を用いた PCR（LC 法）の 2 法により HPV の検出を試みた。検出された HPV は，ダイレクトシークエンス法による型判定後，リスク分類を実施した。

その結果，57 検体中 18 検体から HPV が検出され，検出率は 31.6%であった。このうち MY/GP 法と LC 法の両法で陽性であったのは 8 検体で，残り 10 検体は MY/GP 法でのみ陽性であった。ダイレクトシークエンスの結果，両法で陽性であった 8 検体のうち，結果が一致したのは 2 検体で，残り 6 検体については異なる型と判定され，重感染の疑いが示唆された。現行ワクチンは 16 型，18 型にのみ対応しているが，今回検出された中でワクチン対応型は 29%に過ぎず，ワクチン非対応ハイリスク型 HPV が 50%を占めていた。また，陽性者 18 名中 7 名にワクチン対応型への感染が確認されたが，このうち 3 名はワクチン非対応ハイリスク型 HPV への重感染が疑われた。同じハイリスク型 HPV であっても型によってがん発生リスクに差があることから，ワクチン普及による子宮頸がん抑制効果は高いと考えられる。しかし，ワクチン非対応ハイリスク型 HPV も広く浸透している現状が確認されたことから，今後はワクチン普及に加え，性感染症予防やがん検診の意識向上にも努めていくことが望ましいと考えられた。

秋田県における男性尿路・性器感染症患者の尿中ヒトパピローマウイルスの検出状況

柴田ちひろ，佐藤寛子，能登 舞^{*1}
能登 彩^{*2}，能登宏光^{*3}

日本性感染症学会 第 23 回学術大会
2010 年 12 月，福岡市

ヒトパピローマウイルス（HPV）は子宮頸がんと密接に関連していることが広く知られているが，主に女性の問題として取り扱われることが多く，男性における感染状況やその問題点等についてはほとんど認知されていない。そこで今回，秋田県の現状把握を目的に，県内の男性尿路・性器感染症患者における HPV 感染状況について調査した。

平成 21 年 6 月～平成 22 年 5 月に秋田泌尿器科クリニックを受診した尿路・性器感染症の自覚症状のある患者 103 名と，性感染症罹患の心配等から受診した自覚症状のない患者 17 名の計 120 名を対象に，初尿検体を採取した。内部標準物質として β -globin の有無を PCR 法で判定し，検出された検体のみを有効検体として以後の検討に用いた。HPV の検出には primer MY09/11 と GP5⁺/6⁺による nested PCR 法を用い，増幅産物をダイレクトシークエンスすることにより型判定を行った。

その結果，自覚症状のある患者尿 103 検体中，82 検体から β -globin が検出され（検出率 79.6%），そのうち 8 検体から HPV が検出された（9.8%）。検出型は 11 型 1 例，16 型 2 例，18 型 1 例，33 型 1 例，52 型 1 例，58 型 1 例，66 型 1 例で，8 例中 6 例ががんと関連が深いとされるハイリスク型 HPV であった。自覚症状のない患者尿においては，17 検体中 16 検体から β -globin が検出されたが（94.1%），HPV は 1 例も検出されなかった。今回，男性においても HPV 感染が確認されたことから，今後は女性だけでなく，男性における HPV 感染についても広く啓発し，感染予防対策に努めていく必要があると考えた。

^{*1}：秋田大学医学部付属病院皮膚科，^{*2}：かづの厚生病院産婦人科，^{*3}：秋田泌尿器科クリニック

1999年～2009年における秋田県内のスギ花粉飛散状況について

岩谷金仁，高山憲男，村山力則，
高階光榮^{*1}，原田誠三郎^{*2}

第8回秋田県公衆衛生学会
2010年10月，秋田市

鼻アレルギーの全国疫学調査によると，我が国の花粉症有病率は29.8%と報告されており，特にスギ花粉による有病率は都市部で約26%前後と近年増加傾向にある。一方，秋田県における有病率は約14.0%と推計されており，全国的には低い方に位置しているが，花粉情報に対する関心は高い。当センターでは，県内における飛散の長期予測やシーズン中の飛散予報を作成し，県民へ情報提供を行っている。そこで，過去11年間のデータを基に，飛散状況の経年変化，気象因子との関係及び地域特性について解析を試みた。

県内3ヵ所における11年間の平均花粉総飛散数は，内陸北部は4,065個，沿岸部は1,730個，内陸南部は3,415個であった。地域により総量は異なるが，増減を繰り返しながら年々増加傾向が見られた。地域間の飛散分布は，観測地点の地形条件とその年の気象要因が加味され総飛散数の差として現れると推察される。また，総飛散数と気象因子の関係については，内陸北部は前年6月上旬の平均最高気温と，沿岸部は前年6月中旬の日照時間と，内陸南部は前年6月中旬の日照時間にそれぞれ正の相関傾向が認められた。このことから，前年の気象因子がある程度雄花芽の成長に影響を与えていると推測される。さらに，雄花芽野外調査による着花指数から，翌春の花粉生産量を推量し，長期予報の解析に欠かせないデータを得ることができた。

今後は，半導体レーザーを用いた花粉センサを併用しながらリアルタイムに花粉データを収集し，気象予報を基に解析を加え，迅速かつ精度の高い予報の提供に努めたい。

^{*1}：前健康環境センター，^{*2}：秋田県総合保健事業団

住民健診でのBDHQを用いた食習慣調査の活用について

田中貴子，佐々木ひとみ，村山力則，岩谷金仁，
高山憲男，高階光榮，佐々木恵子^{*1}，
高橋由美子^{*1}，後藤ひとみ^{*1}，佐々木リサ子^{*2}

第8回秋田県公衆衛生学会学術大会
2010年10月，秋田市

我々は，地域で行う食事調査法の一つとして，BDHQ（簡易式自記式食事歴法質問票）を用いた食習慣調査を住民健診に取り入れて実施した。

対象は横手市増田地域に在住の一般住民で，40歳～74歳までの特定健康診査受診者777人とし，BDHQ質問票（A3両面1枚）により，最近1か月間の食習慣等について約80項目を質問した。一連の実施内容と日程は，1.市民健診でのBDHQ食習慣調査の実施（5月7日～26日）健診当日は2～3人で記入内容の確認と回収をした。2.DHQBOX2008システムによるデータ処理（5月10日～6月25日）777人のデータを手入力し，システムを経てデータを送信後24時間で個人の結果が還元された。3.健診結果説明会（6月29日～30日）要受診者及び要保健指導者342人に対し，結果票の見方を約20分，両日で3回集団指導した。その際，共通編（全員）と疾病編（該当者）の教材を組み合わせで個別に配布した。4.集計と結果報告（7月1日～8月31日）「2005年版日本人の食事摂取基準」を基にしているDHQBOX2008システムから得られた判定結果をまとめ，「横手市増田地域局における食習慣調査報告書」として報告した。集計結果の一部を紹介すると「信号の色」でみる脂質の摂取状況は，女性は「要改善」者の割合が男性より多かった。次に，「コマ」でみる副菜（野菜，きのこ，海草等）の摂取状況は，女性よりも男性に摂取量の「少ない」者が目立ち，40歳代～60歳代の男性では約7割が「少ない」状況にあった。BDHQを用いた食習慣調査は約20分程度で記入でき，DHQBOXシステムを介することで，簡便に個人の詳細な判定結果が得られるものであった。さらに，データ全体を集計解析することにより，個人のみならず地域全体の食生活の実態を知る貴重な判断材料になるので

はないかと推測された。

*1: 横手市増田地域局, *2: 横手市福祉環境部

秋田県における最近の結核登録の現状

田中貴子, 高山憲男, 高階光榮

第8回秋田県公衆衛生学会学術大会
2010年10月, 秋田市

健康環境センターでは昭和56年から結核サーベイランス事業を実施している。平成21年度に、本県が結核研究所による結核対策レビュー(実地調査)を受けたことをきっかけに、近年の結核状況を把握し課題を明らかにするため、結核情報の詳細を検討したので報告する。

平成10年以降の新登録結核罹患率(人口10万対)の推移は、平成10年の25.9から平成21年の11.4と減少している。しかし、喀痰塗抹陽性肺結核罹患率は平成10年7.7から平成21年5.1と増減を繰り返し横ばいに推移している。各年齢別の罹患率をみると70歳代の罹患率は19.0、80歳代では53.8と大幅に増加し、さらに90歳代は75.8と最も高かった。潜在性結核感染症は平成19年27人、平成20年32人、平成21年29人である。そのうち30歳以上は平成19年で51.5%、平成20年で59.4%、平成21年で65.5%と徐々に増えている。集団感染には至らないが注意すべき感染事例としては、接触度合いの高い家族内での感染、特に高齢の夫婦間の感染や高齢者から乳幼児への感染、また、病院内や施設内における患者から介護者・医療関係者への感染事例が度々みられている。結核の新登録患者全体は減少しているが、他人にうつす恐れのある喀痰塗抹陽性患者が横ばいに推移していることは今後注意すべきことである。本県では70歳以上の高齢者の患者が多くなっており、高齢者結核の場合は無症状のまま経過し重篤化する危険を秘めているため、日頃から高齢者の健康状態や症状を観察し、疑わしい場合は早期に受診させることが重要と思われる。

結核登録者情報調査における秋田県の現状及び健康環境センターの役割の検討

田中貴子, 成田千秋*1

第32回全国地域保健師学術研究会
2010年11月, 富山市

厚生労働省による結核サーベイランスシステムは時代の変化に合わせて幾度か更新し、平成19年1月からは「結核登録者情報調査システム」が新システムとして運用されている。今回、本システムから得られた情報を解析すると共に、この結核調査事業をとおして当センターの役割について考察した。

平成20年の結核報告数は全数把握感染症434件中159件(潜在性結核感染症を含む)であった。この年に発生した麻疹の集団感染を除くと、例年どおり約7割近くを結核が占めていた。平成10年以降の結核発生状況は、新登録患者自体は年々減少しているが、喀痰塗抹陽性肺結核に関してはほぼ横ばいであった。また、他疾患入院中や他疾患通院中の結核診断を含めると、約8~9割が医療機関で発見されていた。年末登録者中の3年以上登録(長期登録)は21.2%(全国14.3%)であったが、登録者中の長期登録が約4割を占める保健所もあった。

次に、結核調査事業をとおして当センターの役割について検討した。当センターは関連機関と密に連携を取りながら、新システムの定着及び安定した運用を図るため保健所を支援してきた。さらに、これらの集計結果から得られたデータを基に、結核月報・年報管理、情報発信等、有益な資料の提供を目指すべく、結核対策の一助を担ってきた。結核の統計データは、保健所において正しい情報をいかに収集し確実に入力しシステムに反映させていくかが基本であり、出発点となるが、当センターはより精度の高い結核情報を目指し、保健所と協力し事業を進めていくことが重要である。

*1: 秋田県健康福祉部健康推進課

秋田県における *astA* 保有大腸菌の分離状況と病原因子プロファイル

今野貴之, 八柳 潤, 齊藤志保子

第 64 回日本細菌学会東北支部総会
2010 年 8 月, 仙台市

平成 19 年から平成 21 年までの下痢原性大腸菌疑い株のうち, 各下痢原性大腸菌の病原因子は保有せず, *astA* を保有していた菌株は, 平成 19 年が 7 株, 平成 20 年が 15 株, 平成 21 年が 13 株であった。そのうちの 20 株について, その他の病原因子の保有状況を調査した。その結果, 腸管出血性大腸菌で報告された新規の付着因子である *iha* を保有する株が 1 株見つかった。また, *pic* を保有する株も 2 株見つかった。*pap*, *sfa*, *hlyA* は腸管外感染を起こす大腸菌にみられる病原因子であるが, 5 株でそれらのいずれかもしくは複数の保有が確認され, これらの因子を持つ *astA* 保有株は腸管のみならず尿路感染症などの大腸菌としても作用する可能性が示唆された。また, 15 株がヒトの体内での増殖に必要な *irp2* を保有しており, 病原性を持つ可能性が示唆された。

秋田県における *astA* 保有大腸菌の分離状況と病原因子保有状況について

今野貴之, 八柳 潤, 齊藤志保子

第 59 回日本感染症学会東日本地方会学術集会
2010 年 10 月, 東京都

astA を保有する大腸菌は, 毒素原性大腸菌の耐熱性エンテロトキシンに類似の毒素を産生し, これまでに数例の集団下痢症事例の報告もあることからその病原性が注目されている。今回, 秋田県における *astA* 保有大腸菌による健康被害の実態を把握するため, 散発下痢症患者由来の大腸菌を用いて, その侵淫実態を調査した。また, *astA* 保有大腸菌は分離された菌株によって病原性に違いがあることが指摘されているため, *astA* 以外の病原因子として *daa*, *afa*, *aid*,

aah, *iha*, *pilS*, *shf*, *irp2*, *pet*, *pic*, *pap*, *sfa* および *hlyA* の 13 種類の病原因子の保有状況も併せて調査した。

平成 19 年から平成 21 年までの下痢原性大腸菌疑い株計 2,168 株のうち, *astA* 保有大腸菌は, 計 35 株であった。そのうちの 20 株について, その他の病原因子の保有状況を調査したところ, 腸管出血性大腸菌で報告された新規の付着因子である *iha* を保有する株が 1 株見つかった。また, *pic* を保有する株も 2 株見つかった。*pap*, *sfa*, *hlyA* は腸管外感染を起こす大腸菌にみられる病原因子であるが, 6 株でそれらのいずれかもしくは複数の保有が確認され, これらの因子を持つ *astA* 保有株は腸管のみならず尿路感染症などの大腸菌としても作用する可能性が示唆された。また, 15 株がヒトの体内での増殖に必要な *irp2* を保有しており, 病原性を持つ可能性が示唆された。*astA* 保有大腸菌の病原性については, 未だ不明な部分が多いことから, 今後さらなる研究が必要である。

秋田県におけるアカツツガムシ媒介性つつが虫病について

佐藤寛子, 國生泰範^{*1}, 柴田ちひろ, 佐藤了悦,
斎藤博之, 安部真理子, 齊藤志保子,
高橋 守^{*2}, 藤田博己^{*3}, 角坂照貴^{*4}, 高田伸弘^{*5},
川端寛樹^{*6}, 高野 愛^{*6}, 須藤恒久^{*7}

第18回ダニと疾患のインターフェースに
関するセミナー (SADI)
2010年5月, 佐渡市

夏季に発生する古典型つつが虫病は, 強毒力とされる血清型 Kato の *Orientia tsutsugamushi* (Ot) を特異的に保有するアカツツガムシのみにより媒介される。近年では, 全国的にその患者発生や Kato 型 Ot 分離の報告がなかったが, 2008 年 8 月, 秋田では 15 年ぶりに古典型つつが虫病と確認された患者が発生した。翌 2009 年, 感染推定日の患者の行動等を元に, 野外調査を実施したところ, アカツツガムシの生息を確認し,

さらに野鼠からはKato型Otを分離したので報告する。患者は大曲在住の17歳の女性であった。2008年8月13日、患者は雄物川で釣りをし、帰宅後背中に鋭い痛みを感じた。8月22日、38.5℃の発熱があり、翌23日夜までに合計4箇所の医療機関を受診したが、症状が改善されないため、8月25日、不明熱として入院となった。この時点で発疹はなかったが、体温40.1℃、背中に痂皮状刺し口があり、さらにこれまでの経過等からつつが虫病が疑われた。発熱から7日目(8月28日)に採取した血清の標準3型抗原に対する抗体検査によりKato型Otによる古典型つつが虫病であることが確認された。このことを受け、翌2009年、患者の感染推定地点を含む雄物川流域におけるツツガムシの生息状況とOt検索調査を実施した。調査は4月、7月、8月に計4回行い、野鼠捕獲を主体に、地表面と土壌中からのツツガムシ採集も実施した。その結果、アカツツガムシが7月と8月に捕獲した野鼠、地表、土壌に認められた。また、4月と7月に捕獲した2頭のアカネズミからGilliam型、8月に捕獲した2頭のアカネズミからKato型のOtがそれぞれ分離され、アカツツガムシに加えフトゲツツガムシによるつつが虫病の感染リスクも確認された。また、8月には感染推定地の下流に位置する雄物川河川敷運動公園でもアカツツガムシの生息が確認され、現在も河川流域一帯で古典型つつが虫病感染の可能性のあることが示唆された。今後も当該地域におけるツツガムシの生息調査並びにOt保有状況の実態把握と地域社会へのフィードバックに加え、夏季のつつが虫病の全国的な啓発が必要であると考えられる。

*1: 秋田厚生連平鹿総合病院, *2: 埼玉県立川越高等学校, *3: 大原総合病院附属大原研究所, *4: 愛知医科大学医学部, *5: 福井大学医学部, *6: 国立感染症研究所, *7: 秋田大学

古典型つつが虫病の1症例と野外調査におけるKato型 *Orientia tsutsugamushi* の分離例

佐藤寛子, 國生泰範^{*1}, 柴田ちひろ, 佐藤了悦, 斎藤博之, 安部真理子, 齊藤志保子, 高橋 守^{*2}, 藤田博己^{*3}, 角坂照貴^{*4}, 高田伸弘^{*5}, 川端寛樹^{*6}, 高野 愛^{*6}, 須藤恒久^{*7}

第59回東北公衆衛生学会
2010年7月, 山形市

古典型つつが虫病は、強毒力とされる血清型Katoの *Orientia tsutsugamushi* (Ot) を特異的に保有するアカツツガムシにより媒介される。しかし、近年、全国的にその患者発生やKato型Ot分離の報告がなかった。ところが、2008年8月、秋田では15年ぶりに古典型つつが虫病と確認された患者が発生した。翌2009年、感染推定日の患者の行動を元に、野外調査を実施したところ、アカツツガムシの生息を確認し、さらに野鼠からはKato型Otを分離したので報告する。

患者は大曲市大曲在住の17歳女性であった。2008年8月13日、患者は雄物川で釣りをし、帰宅後背中に鋭い痛みを感じた。8月22日38.5℃の発熱、その後症状が悪化したため、8月25日入院となった。発熱から16日目(9月6日)の回復期の血清では、IgMはGilliam型とKarp型の160倍に対してKato型が640倍、IgGはGilliam型とKarp型の320倍に対してKato型が2560倍に上昇しており、Kato型Otによる古典型つつが虫病であることが確認された。翌2009年、患者の感染推定地点を含む雄物川流域におけるツツガムシの生息状況とOt検索調査を実施した。調査は4月、7月、8月に計4回行い、野鼠捕獲を主体に、地表面と土壌中からのツツガムシ採集も実施した。アカツツガムシは7月と8月に捕獲した野鼠、地表、土壌に認められた。また、4月と7月に捕獲した2頭のアカネズミからGilliam型、8月に捕獲した2頭のアカネズミからKato型のOtがそれぞれ分離された。また、8月には感染推定地の下流に位置する雄物川河川敷運動公園でもアカツツガムシの生息が確認され、現在も河川流域一帯で古典型つつが虫病感染の可能性のあることが示唆された。この地域には全国的に有名な観光地も含まれており、今後、古典型つつが虫病の全国的な啓発が重要であると考えられる。

*1: 秋田厚生連平鹿総合病院, *2: 埼玉県立川越高等学校, *3: 大原総合病院附属大原研究所, *4: 愛知医科大学医学部, *5: 福井大学医学部, *6: 国立感染症研究所, *7: 秋田大学

古典型ツツガムシ病の症例と野外調査における Kato 型 *O. tsutsugamushi* の分離

佐藤寛子, 國生泰範*1, 柴田ちひろ, 斎藤博之, 齊藤志保子, 高橋 守*2, 藤田博己*3, 角坂照貴*4, 高田伸弘*5, 川端寛樹*6, 高野 愛*6

第59回日本感染症学会東日本地方会学術集会
2010年10月, 東京都

夏期に発生する古典型ツツガムシ病は強毒力とされる血清型 Kato の *Orientia tsutsugamushi* (Ot) によるものである。アカツツガムシが媒介する本病は、近年、全国的に患者発生や Kato 型 Ot 分離報告がなかった。ところが、2008年8月、秋田県では15年ぶりに古典型ツツガムシ病と確認された患者が発生したため、翌2009年、患者の感染推定地点において、ツツガムシの生息状況と Ot 検索調査を実施した。

患者は大仙市大曲在住の17歳女性であった。2008年8月13日、患者は雄物川で釣りをした後、背中に痛みを感じた。8月22日、38.5℃の発熱があり、8月25日、不明熱として入院となった。この時点で発疹はなく、体温40.1℃、背中に痂皮状刺し口があり、これまでの経過等からツツガムシ病が疑われ、Minocycline による治療が開始された。発熱から16日目に採取された血清の抗体検査により、Kato 型 Ot による古典型ツツガムシ病であることが明らかとなった。野外調査は野鼠捕獲を主体に4月、7月、8月に計4回実施した。その結果、アカネズミ39頭とハタネズミ9頭からフトゲツツガムシ182、アカツツガムシ115の他4種合計497を採取した。アカツツガムシは7月と8月に認められ、アカネズミ2頭から Gilliam 型、ハタネズミ2頭から Kato 型の Ot が分離された。また、8月には感染推定地より下流に位置する雄物川河川敷運

動公園でもアカツツガムシの生息が確認された。現在も古典型ツツガムシ病が発生する可能性が示唆された。当該地域においては、全国から観光客が集まるイベントが毎年開催されているため、今後もツツガムシの生息調査並びに Ot 保有状況の実態把握と古典型ツツガムシ病の全国的な啓発が必要であると考えられる。

*1: 秋田厚生連平鹿総合病院, *2: 埼玉県立川越高等学校, *3: 大原総合病院附属大原研究所, *4: 愛知医科大学医学部, *5: 福井大学医学部, *6: 国立感染症研究所

秋田県の著名観光スポットにおけるアカツツガムシ生息状況調査

佐藤寛子, 柴田ちひろ, 佐藤了悦, 藤谷陽子, 斎藤博之, 安部真理子, 千葉真知子, 高橋 守*1, 藤田博己*2, 角坂照貴*3, 高田伸弘*4, 川端寛樹*5, 高野 愛*5

第56回日本寄生虫学会・日本衛生動物学会
北日本支部合同総会
2010年10月, 札幌市

2008年8月、秋田県大仙市の雄物川河川敷での感染が推定されるアカツツガムシ媒介性ツツガムシ病患者が15年ぶりに確認されたことを受け、2009～2010年、著名観光スポットを含む同河川流域におけるツツガムシ生息状況を調査したので、その経過を報告する。

調査は野鼠の捕獲を主体に実施した。2009年は4～8月に捕獲したアカネズミ39頭とハタネズミ9頭からフトゲツツガムシ182、アカツツガムシ115の他4種合計497を採取した。また、アカネズミ2頭から Gilliam 型、ハタネズミ2頭から Kato 型のリケッチアを分離した。また、アカツツガムシの生息が著名観光スポットでも確認されたため、翌2010年は8月上旬と下旬に当該地区とその周辺の調査と薬剤による防除試験を実施した。その結果、アカネズミ3頭とハタネズミ6頭からアカツツガムシ617を採取し、ハタネズミ1頭に Karp 型のリケッチアを確認した。防除試験は地

元自治体指定薬剤1種を含む3種を散布,2週間後に効果の判定を試みた。今回は試験期間中の悪天候により,防除効果の明確な判定には至らなかったが,今後とも調査継続の必要性が示唆された。

*1:埼玉県立川越高等学校,*2:大原総合病院附属大原研究所,*3:愛知医科大学医学部,*4:福井大学医学部,

食品検体のノロウイルス検査のためのパンソルビン・トラップ法の開発と拡大適用

齋藤博之,東方美保*1,岡 智一郎*2
片山和彦*2,田中智之*3,野田 衛*4

第58回日本ウイルス学会
2010年11月,徳島市

パンソルビン・トラップ法(パントラ法)は,食品検体からノロウイルス(NoV)を検出するための実践的な手法である。これまでプロトコルの構築を目指してNoV GII/4を用いて検討を行ってきた。本学会では,NoV GII/4以外のNoV genotypeに対応させるため,プール血清やブロードレンジ・モノクローナル抗体(MAb)の使用を試みた。また,将来の実用化を目指し,プロトコル簡略化を検討した。

NoV 陽性の糞便で汚染させた市販のポテトサラダと焼きソバを被検体とした。汚染食品からウイルスを洗い出すための食品洗滌液として,0.1%Tween20加 Tris-HCl (pH8.4)-0.5M NaClを用いた。食品10gを食品洗滌液50mLで乳剤とする際に,専用の処理袋に入れて10~15分間の超音波処理を行った。食品乳剤に α -Amylaseを加えて炭水化物を分解し,さらにNoVウイルス様粒子(VLPs)で作製した抗血清,またはMAbを添加してNoVと抗体の複合体を作らせ,それをパンソルビン(黄色ブドウ球菌の菌体)に吸着させて回収した。この段階で,全ての試薬を同時添加した場合との比較も行った。菌体に付着したNoVからRNAを抽出し,Real-time PCRを行うことによって回収率を評価した。

プロトコルの新規改良点として,食品洗滌液

へのNaCl添加,超音波によるNV遊離,及び α -Amylase処理があり,各々3~4割の回収率向上が見込めた。また, α -Amylase,抗体,パンソルビンを同時添加して15分間反応させた場合の回収率は,それぞれ30分ずつ段階的に処理した場合と差が無かったため,プロトコルの簡略化が可能となった。現在利用可能な抗血清はGIについては1,2,3,4,8,11型,GIIについては1~8,10,12,14,15,17型であり,これら19種をプールしたものをを用いることで,GI/1,2,3,4,8,11,GII/1,2,3,4,5,6,7,8,10,12,18の型が検出できることを確認した。GII/18は血清プールに含まれていないが交差反応で回収されたものと思われる。ブロードバンドMAbは4種類のカクテルを用いてGII/4型に用いたところ9.1%の回収率であった。この数値は,今後ハイブリドーマの大量培養・濃縮等で抗体価の高いMAbを作製することで向上が見込まれる。パントラ法に用いる抗体には多くの選択肢があるが,プロトコルとしての骨格が確立しているため,NoVのみならず他の食品媒介ウイルスにも適用可能と考えられた。

*1:福井県衛生環境研究センター,*2:国立感染症研究所,*3:堺市衛生研究所,*4:国立医薬品食品衛生研究所

食品検体のノロウイルス検査を目的としたパンソルビン・トラップ法の開発

齋藤博之,東方美保*1,岡 智一郎*2
片山和彦*2,田中智之*3,野田 衛*4

第31回日本食品微生物学会
2010年11月,大津市

ウイルス性食中毒の大部分を占めるのがノロウイルス(NoV)であることがわかっているにもかかわらず,原因として疑われる食品からウイルスを検出できた例はカキを除けば極めて稀少である。その理由として,ウイルスを含む食品乳剤をPCRで用いる量まで減量濃縮するには多大な労力と時間とコストを要し,多検体を取り扱うのは事実上不可能であるという実状がある。こうした困難な状況を打開するために,固

形、液状、練り物、油物等の一般的な食品から NoV を検出する手法の開発を行った。

蒸留水で希釈した糞便で各種食品を汚染させて食中毒モデル食品とした。モデル食品を洗滌液に懸濁させた後、3,000 rpm 30分遠心することで固形物を除去した。食品の遠心上清（濁質を含む）に抗体（抗 NoV ウサギ血清またはモノクローナル抗体）及びパンソルビン（IgG 結合性プロテイン A を持つ黄色ブドウ球菌の菌体）を加えて NoV-IgG-菌体の複合体を形成させた後、遠心分離により NoV を回収した。NoV が吸着した菌体を少量の緩衝液で再懸濁したものをフェノール抽出し、水層から市販精製キットを用いて RNA を抽出した。以上の基本プロトコールにおいて、洗滌液の組成、食品乳剤作成方法、抗体の種類と添加量、抗原抗体反応とパンソルビン吸着反応の時間、及び抽出した RNA に対する逆転写反応の条件等について、Real-time PCR の数値を基に最適化を図った。

食品洗滌液の組成を検討したところ、0.1M Tris・HCl-0.5M NaCl-0.1% Tween20 (pH8.4) が最適であり、さらに α -アミラーゼ粉末を 2.5 mg/mL になるように添加することで、反応妨害物質である炭水化物を分解除去できた。抗体とパンソルビンは別々に反応させる必要はなく、同時添加 15 分の処理で十分な回収結果が得られた。回収率は NoV の血清型や食品種別によって異なるが、焼きソバにウサギ単味抗血清を用いた例で 30~90%であった。本法はどのような食品であっても共通の工程で検査が行えるため、今後は実際の運用面における利便性を追究していく予定である。

*1: 福井県衛生環境研究センター, *2: 国立感染症研究所, *3: 堺市衛生研究所, *4: 国立医薬品食品衛生研究所

地方都市における淋菌および性器クラミジアの咽頭感染の実態

佐藤寛子, 柴田ちひろ, 能登 彩*¹
能登 舞*², 能登宏光*³

第 22 回日本性感染症学会
2010 年 12 月, 福岡市

淋菌 (NG) や性器クラミジア (CT) の咽頭感染は、感染症発生動向調査の対象に含まれていないため実態は不明である。本県の現状を把握し、保健所における性感染症相談等での指導に活用しやすい、より現場に沿った資料を作成するため調査を実施した。

2009 年 6 月~2010 年 5 月までの 1 年間に尿路・性器感染症を発症あるいは危惧し秋田泌尿器クリニックを受診した Oral sex 経験者 124 名 (男性 115 名, 女性 9 名, 平均年齢 31.4 歳) を対象とした。咽頭検体 (うがい液, スワブ) と初尿を採取し, NG と CT を Real-time PCR (TaqMan assay) により定量解析した。尿検体では NG 陽性 32 例 (25.8%), CT 陽性 47 例 (37.9%) で, 15 例 (12.1%) が重複感染であった。咽頭検体は NG 陽性 14 例 (11.3%), CT 陽性 7 例 (5.6%) で, 1 例 (0.8%) が重複感染であった。尿 NG 陽性例中 13 例 (40.6%), 尿 CT 陽性例中 5 例 (10.6%) は咽頭検体も陽性であった。うがい液, スワブの平均コピー数は NG が 10^5 copies/ml, CT は 10^3 copies/ml であり, うがい液はスワブ検体より陽性例が多く, CT は全てうがい液からの検出であった。患者自身が Oral sex をした 106 例中 17 例 (16.0%) は咽頭検体陽性で, NG 陽性 12 例, CT 陽性 6 例, 重複 1 例と NG 陽性率が高かった。性交渉相手だけが Oral sex をした 18 例中, 10 例 (55.6%) が尿検体陽性で, 内 3 例は咽頭検体も陽性 (NG 2 例, CT 1 例) であった。咽頭検体陽性 20 例の性交渉相手は, 特定のパートナーが 3 例, CSW を含めた非特定パートナーが 17 例であった。咽頭淋菌感染 11.3%, クラミジア感染 5.6% と, 一地方都市でも咽頭における NG, CT の高い感染率が確認され, コピー数の高さから感染ルートとして重要であることも裏付けられた。咽頭検体としては, スワブよりうがい液の有用性が高いと考えられた。咽頭の検査体制の充実と共に咽頭に関する性感染症予防教育も喫緊の課題と考えられた。

*1: かづの厚生病院産婦人科, *2: 秋田大学医学部附属病院皮膚科, *3: 秋田泌尿器科クリニック

玉川源泉下流域及び田沢湖における pH 低下機構の解明

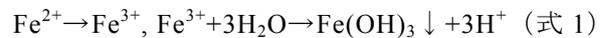
成田修司, 和田佳久, 佐々木典子, 八柳 潤,
布田 潔^{*1}, 大下哲生^{*1}, 佐久間昂^{*1}

第 45 回日本水環境学会
2011 年 3 月, 札幌市

秋田県仙北市にある玉川源泉の大噴は、pH 約 1.2 の強酸性水を湧出し、その強酸性水は、下流域に多大な影響を与え、導入された田沢湖では pH が 4 台にまで低下した。この酸性水対策として、平成元年には石灰中和処理施設が運転を開始し、源泉の約 9 割を pH 約 3.5 まで処理した後、河川に放流することにより田沢湖の pH 改善が進んできた。しかし、平成 14 年ごろから下流の田沢湖において pH 低下が観測されるようになった。そこで本研究では、中和放流水の pH を約 3.5 に維持してきたにもかかわらず、田沢湖の pH が低下する現象の機構を明らかにすることを目的に調査を行った。

県が実施している調査結果によると平成 14 年頃から同源泉の総酸度が急激に上昇している。総酸度は強酸成分と弱酸成分により構成されている。強酸成分に関しては大部分を同施設で処理しているが、一部、天然記念物である北

投石の涵養のため湯川に流入し、pH2 の酸性水として上流部での pH を低下させていた。また、弱酸成分に含まれる Fe^{2+} 及び Al^{3+} の濃度は、それぞれ、それ以前の約 3 倍、2.5 倍に増加しているがこれら成分に関して同施設では処理できず透過している。その影響を受けたと考えられる変化は、同施設より 5 km ほど下流で中和放流水（約 pH3.5）よりも低い pH が観測されるとともに、河床に赤褐色沈殿がみられるようになったことである。この赤褐色沈殿は、流域における（式 1）が進行し、 $\text{Fe}(\text{OH})_3$ の形成が目視で確認されたものと考えられる。著者らはこの反応への鉄酸化細菌の関与について、水環境学会誌（Vol.32, 2009）で報告した。



また、同施設を透過した Al^{3+} は理論的に pH5 付近、つまり玉川ダムから田沢湖付近で、（式 2）が進行し、同湖の pH 改善を阻止する要因として作用すると考えられる。



以上の結果より、未処理の湯川の強酸成分及び Al^{3+} と Fe^{2+} 等からなる弱酸成分が同源泉下流域を流下する過程において田沢湖を含む下流域の pH を低下させる可能性が高いことが明らかとなった。

^{*1}：秋田大学大学院工学資源学研究所

2. 他紙掲載論文

結核は現代の病気です

—秋田県における結核の発生状況と予防—

田中貴子

健康あきた（秋田県総合保健事業団広報誌），
48，2010，2-7.

県民の皆さんの結核予防の一助になれば幸いと思い、秋田県における結核の発生状況と結核予防のポイントについて述べる。

平成20年の全数把握感染症の中で、約7割近くを結核が占めており、結核は今なお最大の感染症と言える。過去から現在までの本県の結核患者の発生状況を見ると、昭和40年の新登録患者数は2,642人であったが、その後減少し、平成20年は129人の新登録患者の発生があった。新登録患者自体は年々減少しているが、人に感染させる可能性の高い喀痰塗抹陽性肺結核に関しては、近年ほぼ横ばいに推移している。次に患者の発見方法別状況を見ると、高齢者が多いこともあり、他疾患で入院や通院していた際に結核が見つかる場合も多く、約8～9割が医療機関で発見されている。喀痰塗抹陽性肺結核患者における職業を見ると、ディンジャーグループと言われる医療従事者や教員等の職業からの発症も少なからず見られ、注意を要する状況にある。本県における集団感染事例は多くはないが、平成10年以降は施設及び事業所等から6例の集団感染があった。

結核予防のポイントは、1. 普段から健康的な生活を心がけ、結核に対する抵抗力をつけておくことが大事である。また、疲労を避け、ストレスを解消し、栄養バランスのとれた食生活を心がける。2. せき、たん、発熱、だるさ、体重減少、胸痛等の症状が2週間以上続いたら、早めに医療機関を受診する。3. 結核は健診で見えるので、症状がなくても年に一度は職場や地域で行われている健診を受ける。4. 結核を発病しやすい人（糖尿病や腎臓病で免疫力の低下している人、高齢者や乳幼児等）は、特に注意す

る。以上のように、一人ひとりが結核に関心をもち、病気を理解し予防することが大切である。

サーベイランス情報を用いた秋田県における結核疫学分析

田中貴子，高山憲男，高階光榮，成田千秋^{*1}

秋田県公衆衛生学雑誌，8，1，2010，9-21.

本県では平成22年1月に結核研究所による「自治体における結核対策レビュー」を受けた。このことをきっかけに、秋田県の結核の現状を把握し今後の結核対策に活かすべく結核情報について検証した。

結核の蔓延状況についてみると、本県の結核新登録罹患率は昭和40年から徐々に減少し平成2年を除き全国の罹患率を下回っていた。平成21年の患者発見方法では、約8割が医療機関で発見されていた。有症状肺結核患者の発見の遅れをみると、受診の遅れが14.1%、診断の遅れが20.5%であった。コホート法を用いた治療成績では治療成功率は45.3%（全国50.5%）、死亡は20.6%（全国14.1%）、12か月を超える治療は13.4%（全国10.2%）であった。本県における集団感染事例は平成10年から平成21年までに6事例発生していた。一方、最近では集団感染には至らないが接触度合いの高い家族内での感染、特に高齢の夫婦間の感染や高齢者から乳幼児への感染がみられ、また医療従事者や施設内における感染事例が度々みられていた。本県における結核減少の背景には、結核予防計画の策定や、保健所を中心として医療機関、市町村、事業所、結核予防会等の関係者及び関連機関が一丸となって綿密な結核対策を展開し、実践を積み重ね地道に取り組んできた結果がここに大きく実を結んだのではないかと推察される。高齢者施設においては職員が正しい知識と予防技術を身につけることが大切であり、施設内に感染症対策委員会の設置や感染症予防リーダーを育成するなど、組織として感染症対策を強化していくことが望まれる。

^{*1}：秋田県健康福祉部健康推進課

1999年～2009年における秋田県内のスギ花粉飛散状況について

岩谷金仁, 高山憲男, 村山力則,
高階光榮^{*1}, 原田誠三郎^{*2}

秋田県公衆衛生学雑誌, **8**, 1, 2011, 22-25

我が国の花粉症有病率は29.8%と報告されている。一方、秋田県における有病率は約14.0%と推計されており、全国的には低い方に位置しているが、近年増加傾向にある。また、花粉情報に対する関心が高いことから、当センターでは県内における長期予測やシーズン中の飛散予報を作成し、広く県民へ情報提供を行っている。そこで、過去11年間のデータから飛散状況の経年変化、気象因子の関連性及び地域特性について解析を試みた。

県内における11年間の平均花粉総飛散数は、内陸北部では4,065個、沿岸部は1,730個、内陸南部は、3,415個であった。地域により総量は異なるものの、増減を繰り返しながら年々増加傾向が見られた。地域間の飛散分布や総飛散数の違いは、地形条件やその年の気象要因によるものと推察された。また、総飛散数と気象要因の関係については、特に前年6月上旬から中旬の平均最高気温や日照時間に正の相関傾向が認められた。このことから、前年の気象要因がある程度雄花芽の成長に影響を与えていると推測された。さらに、雄花芽野外調査の着花指数から翌春の花粉生産量を推量しうるデータを得ることができた。今後は、半導体レーザーを用いた花粉センサを併用しながら、リアルタイムに花粉データを収集し、気象予報を基に解析を加え、迅速かつ精度の高い予報の提供に努めたい。

^{*1}: 前健康環境センター, ^{*2}: 秋田県総合保健事業団

秋田県における麻しんワクチン接種率向上のための検討一次に接種するワクチンの検索

村山力則, 田中貴子, 高階光榮,
石井 淳^{*1}, 滝本法明^{*1}, 八幡裕一郎^{*2}

病原体検出情報 (IASR), **32**, 2, 2011, 46-47.

2001年の調査時点で、秋田県の麻疹ワクチン接種率は81%であった。この接種率はWHOの麻疹排除計画の目標の一つである95%には到達していなかったため、県内の麻疹ワクチン接種率を95%以上に向上させ、維持することを目指し、質問紙調査を実施した。また、質問紙調査ではカバーできない事項に関してはフォーカス・グループ・インタビュー (FGI) を実施した。

これらの結果に基づいて、政策実現として可能な事項を健康推進課とともに検討し、2006年4月より「接種するワクチンの順番を簡単にインターネット上で検索するシステム」を構築し、「居住自治体以外での接種を可能にする相互乗り入れ (秋田市, 井川町2市町を除く)」を麻しんワクチンに限り実施した。

「ワクチン接種の検索」については、携帯電話とインターネット上で検索を可能とした。ワクチン接種の検索には秋田県感染症情報センターホームページ (<http://idsc.pref.akita.jp/kss>) より 予 防 接 種 検 索 (<http://idsc.pref.akita.jp/kss.SearchSelect.html>) から携帯電話およびパソコンで検索が可能である。今後、本検索システムは秋田県のみならず全国の保護者に活用され、国内での麻疹をはじめとするワクチン接種率の向上に利用されることを期待する。

^{*1}: 秋田県健康福祉部健康推進課, ^{*2}: 国立感染症研究所感染症情報センター

Application of a Multilocus Variable Number of Tandem Repeats Analysis to Regional Outbreak Surveillance of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 Infections

Takayuki Konno, Jun Yatsuyanagi, Shioko Saito

Japanese Journal of Infectious Diseases,
64, 1, 2011, 63-65.

A total of 18 strains of EHEC O157:H7 were

isolated from distinct cases in Akita Prefecture, Japan from July to September 2007. The genetic relatedness of these isolates was investigated by performing a multilocus variable number of tandem repeats analysis (MLVA) and a pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) analysis using XbaI. The PFGE analyses allowed us to group these 18 isolates into three major clusters. The MLVA results correlated closely with those obtained by PFGE, although some variants were found within the clusters obtained by PFGE, thus highlighting the utility of this technique for determining a precise classification when it is difficult to differentiate between isolates with indistinguishable or very similar PFGE patterns. In addition, MLVA is a much easier and more rapid method than PFGE for analysis of the genetic relatedness of strains. Thus, as a second molecular epidemiological subtyping method, MLVA is useful for the regional outbreak surveillance of EHEC O157:H7 infections.

秋田県において 15 年ぶりに確認された古典型つつが虫病の 1 例

佐藤寛子, 國生泰範^{*1}, 柴田ちひろ, 斎藤博之, 齊藤志保子, 藤田博己^{*2}, 須藤恒久^{*3}

感染症学雑誌, **84**, 4, 2010, 454-56.

つつが虫病は病原リケッチアの *Orientia tsutsugamushi* (以下Ot) を保有するツツガムシの幼虫に刺咬されることによって感染・発病する疾患である。我が国では毎年、ほとんどの都府県から合計300~400例の患者届出があり、発生時期は、各地域におけるツツガムシの種類や分布、幼虫の発生時期と密接に関係している。

古典型つつが虫病は、夏季に幼虫が発生するアカツツガムシ媒介性のKato型のOtによるものであり、かつて秋田県雄物川流域の他には山形県と新潟県の一部河川流域で多発する風土病とされていた歴史がある。しかし、このOtによるつつが虫病患者の発生は、秋田県では1993年を最後に認められていない。また、かつての

発生地においても最近では患者の発生報告が激減しており、Kato型Otの検出報告もない。ところが、2008年8月、秋田県では15年ぶりに、患者の感染推定日の行動に加え、血清抗体検査から古典型つつが虫病と確認された患者が発生したので、その症例と感染推定地におけるツツガムシ生息調査結果およびKato型Otの分離について報告した。

^{*1}: 秋田厚生連平鹿総合病院, ^{*2}大原総合病院附属大原研究所, ^{*3}秋田大学

夏季の古典型つつが虫病症例と感染推定地周辺におけるツツガムシの生息状況調査—秋田県

佐藤寛子, 國生泰範^{*1}, 柴田ちひろ, 佐藤了悦, 斎藤博之, 安部真理子, 齊藤志保子, 高橋 守^{*2}, 藤田博己^{*3}, 角坂照貴^{*4}, 高田伸弘^{*5}, 川端寛樹^{*6}, 高野 愛^{*6}, 須藤恒久^{*7}

病原微生物検出情報, **31**, 5, 2010, 123-124.

秋田県では、例年春と晩秋につつが虫病患者の届出がある。患者の血清抗体価は Karp 型あるいは Gilliam 型に高値を示す場合がほとんどであることから、フトゲツツガムシ媒介性の *Orientia tsutsugamushi* (Ot) による新型つつが虫病であることが推察される。夏季に発生する古典型つつが虫病は、アカツツガムシ媒介性 Kato 型 Ot によるもので、かつて秋田県雄物川流域の他に山形、新潟県の一部河川流域で多発する風土病とされていた。近年、その患者報告はなく、秋田県での患者発生は 1993 年が最後であった。ところが 2008 年 8 月、間接免疫ペルオキシダーゼ法 (IP 法) による血清抗体検査において、古典型つつが虫病患者が確認された。検体は血清のみで、Ot の検出はできなかったが、血清抗体価を当センターで測定した結果、Kato 型に対する抗体が最も高値となり、Kato 型 Ot 感染による古典型つつが虫病であることが判明した。患者は発病の 9 日前、雄物川河川敷で釣りをしていたことから、翌 2009 年 4 月、7 月、8 月上旬、8 月下旬の計 4 回、感染

推定地点を中心に雄物川流域5カ所において、感染推定現場のツツガムシの生息調査と病原体の検索を捕獲野鼠寄生ツツガムシ幼虫(以下ツツガムシ)の同定、野鼠の抗体検査(IP法)と脾臓からのOt分離(マウス接種法と培養細胞L929を用いたShell vial法)、PCRにより実施した。その結果、感染推定地点およびその下流に位置する河川敷草地ならびに河川敷運動公園においてアカツツガムシを確認した。さらに、感染推定地で捕獲した頭のハタネズミからKato型のOtを分離した。今回アカツツガムシの生息が確認された河川敷運動公園では、毎年8月、全国から観光客が集まるイベントが開催されており、そのイベント参加が感染要因と推定されたつつが虫病患者が秋田県内では19名届出られている。患者発生は1993年が最後であるが、再び患者が発生する可能性がゼロではな

い。また、夏季のつつが虫病に馴染みのない県外からの観光客が感染し、帰郷後に発症した場合においては、治療開始の遅れによる重症化が危惧される。したがって、改めて夏季の古典型つつが虫病と感染予防の全国的な周知が必要であり、ツツガムシ生息状況やOt保有状況などの基礎データ集積によるさらなる実態把握が重要であろう。また、つつが虫病は地方によって疫学的特長、媒介ツツガムシの分布が多彩であることから、今後一層、国立感染症研究所と各地方衛生研究所、研究機関の密接な情報共有と連携が肝要である。

*1: 秋田厚生連平鹿総合病院, *2: 埼玉県立川越高等学校, *3: 大原総合病院附属大原研究所, *4: 愛知医科大学医学部, *5: 福井大学医学部, *6: 国立感染症研究所, *7: 秋田大学

秋田県健康環境センター年報
第6号 2010

発行日 平成23年11月

発行所 秋田県健康環境センター

〒010-0874 秋田市千秋久保田町6番6号

TEL: 018-832-5005

FAX: 018-832-5938
