

# 秋田県健康環境センター年報

第 10 号

平成 26 年度

ANNUAL REPORT

OF

AKITA RESEARCH CENTER FOR PUBLIC HEALTH AND ENVIRONMENT

第  
10  
号

No. 10 2014

平  
成  
26  
年  
度  
(2014)

秋田県健康環境センター



## は し め に

秋田県健康環境センターは、平成18年度に旧衛生科学研究所と旧環境センターが統合して設立され、今年で10年の節目を迎えています。

当センターの運営は、今後の方向性を定めた「中長期計画」に沿って進めていますが、県民の安全・安心の確保という視点から、「健康被害の防止」と「環境の保全」に向けた取組を基本方針として業務を遂行しています。

具体的には、行政等からの依頼検査として、感染症や食品衛生に係る細菌・ウイルス検査をはじめ、食品中の残留農薬検査、河川・湖沼、工場排水等の水質検査、放射能測定、大気・土壌・騒音測定等広範囲で多数の検査を実施しています。

併せて調査研究では、地域の行政課題やニーズに直結したテーマを取り上げているほか、国の感染症研究所や環境研究所と共同研究するなど全国的な取組にも参加しています。この他、県民への情報提供として感染症発生動向を調査する感染症情報センターの運営、空間放射線量を監視するモニタリングポストの設置、PM2.5等大気汚染物質の常時監視などにより各注意報を発令しているほか、分析等の技術指導や出前講座等を実施し、健康予防や環境保全の意識の醸成や啓発に努めています。

昨年は、デング熱の国内感染が約70年ぶりに発生し、また、西アフリカ諸国ではエボラ出血熱が大流行しました。今年は、韓国のMERSコロナウイルスの感染が拡大し国内への伝搬が危惧されるなど、近年の健康危機が増しています。このため当センターでは、万一緊急事態が発生した場合でも迅速な調査・検査ができるような体制整備に努めています。

この年報は、主に平成26年度に当センターが行った調査研究や業務実績の概要についてとりまとめたものです。本書を通じて多くの皆様に当センターの活動への御理解と関心を高めていただければ幸いです。

平成27年12月

秋田県健康環境センター所長 飯塚 政範





# 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

|                                                              |    |
|--------------------------------------------------------------|----|
| ・ サルモネラの Multiplex PCR 法による血清型別法の確立 .....                    | 21 |
| ・ 小児呼吸器疾患由来検体からの病原体検出状況 .....                                | 25 |
| ・ 強毒型および弱毒型 <i>Orientia tsutsugamushi</i> のマウス血中における推移 ..... | 29 |
| ・ 感染症発生動向調査における胃腸炎ウイルスの検出状況について .....                        | 32 |
| ・ 食品からのウイルス検出法としてのパンソルビン・トラップ法の<br>精度向上に関する研究 .....          | 37 |
| ・ 畜水産物中の動物用医薬品一斉分析法の検討及び妥当性評価について .....                      | 59 |

## IV 発表業績

|                 |    |
|-----------------|----|
| 1. 学会発表 .....   | 70 |
| 2. 他誌掲載論文 ..... | 80 |



# I 健康環境センターの概要



## 1. 沿革

| 年 月    | 事 項                                                                                                                                           |
|--------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 明治35.7 | 衛生試験所を秋田市牛島町に設立。                                                                                                                              |
| 明治末期   | 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。<br>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。<br>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再編し、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再編。理化学部には、理化学班を再編した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班を設置。 |
| 24.4   | 企画管理室の総務・企画班を再編し、総務管理班と企画情報班を設置。保健衛生部の健康科学・管理班を廃止。理化学部の食品理化学班と環境理化学班を統合し、理化学班を設置。                                                             |

## 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 m<sup>2</sup>（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 m<sup>2</sup>

## 3. 組織



総職員数 45 名（正職員 36 名，専門員 4 名，非常勤職員 2 名，臨時職員 3 名）

## 4. 職員名簿

(平成27年4月1日現在)

|           | 職 名                     | 氏 名       |
|-----------|-------------------------|-----------|
|           | 所 長                     | 飯 塚 政 範   |
| 企 画 管 理 室 | 室 長                     | 齊 藤 志 保 子 |
| 総 務 管 理 班 | 主 幹 ( 兼 ) 班 長           | 工 藤 正 博   |
|           | 主 査                     | 朝 倉 由 佳 理 |
|           | 主 査                     | 平 野 進     |
|           | 技 能 主 任                 | 国 安 力     |
| 企 画 情 報 班 | 主任研究員 (兼) 班 長           | 梶 谷 明 弘   |
|           | 主 任 研 究 員               | 藤 谷 陽 子   |
|           | 専 門 員                   | 佐 藤 穰     |
| 保 健 衛 生 部 | ( 兼 ) 部 長<br>(本務企画管理室長) | 齊 藤 志 保 子 |
| 細 菌 班     | 上席研究員 (兼) 班 長           | 圓 子 隆 信   |
|           | 上 席 研 究 員               | 田 中 貴 子   |
|           | 上 席 研 究 員               | 熊 谷 優 子   |
|           | 主 任 研 究 員               | 高 橋 志 保 子 |
|           | 研 究 員                   | 今 野 貴 之 子 |
|           | 研 究 員                   | 檜 尾 拓 子   |
| ウ イ ル ス 班 | 上席研究員 (兼) 班 長           | 斎 藤 博 之   |
|           | 主 任 研 究 員               | 秋 野 和 華 子 |
|           | 主 任 研 究 員               | 佐 藤 寛 子   |
|           | 研 究 員                   | 柴 田 ち ひ ろ |
|           | 研 究 員                   | 佐 藤 由 衣 子 |
| 理 化 学 部   | 部 長                     | 鈴 木 忠 之   |
| 理 化 学 班   | 主任研究員 (兼) 班 長           | 小 林 貴 司   |
|           | 主 任 研 究 員               | 中 村 淳 子   |
|           | 主 任 研 究 員               | 松 渕 亜 希 子 |
|           | 主 任 研 究 員               | 村 山 力 則   |
|           | 専 門 員                   | 佐 藤 晴 美   |
|           | 研 究 員                   | 小 川 千 春   |
|           | 研 究 員                   | 今 野 禄 朗   |
|           | 技 師                     | 佐 藤 理 奈   |
| 環 境 保 全 部 | 部 長                     | 大 渕 志 伸   |
| 環 境 保 全 班 | 上席研究員 (兼) 班 長           | 黒 沢 新     |
|           | 主 任 研 究 員               | 清 水 匠     |
|           | 主 任 研 究 員               | 成 田 修 司   |
|           | 専 門 員                   | 高 嶋 司     |
|           | 専 門 員                   | 大 友 久 利   |
|           | 研 究 員                   | 玉 田 将 文   |
|           | 研 究 員                   | 鈴 木 純 恵   |
|           | 研 究 員                   | 佐 藤 健     |
|           | 研 究 員                   | 生 魚 利 治   |
|           | 研 究 員                   | 佐 藤 清 隆   |

## 5. 業務内容

(平成27年4月1日現在)

|       |       |                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|-------|-------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 企画管理室 | 総務管理班 | <ul style="list-style-type: none"> <li>・人事，服務</li> <li>・予算，決算</li> <li>・庁舎管理，庶務一般</li> </ul>                                                                                                                                                                          |
|       | 企画情報班 | <ul style="list-style-type: none"> <li>・研究の企画，評価，進行管理</li> <li>・センター中長期計画の進行管理</li> <li>・広報，研修</li> <li>・検査業務管理</li> <li>・精度管理</li> </ul>                                                                                                                             |
| 保健衛生部 | 細菌班   | <ul style="list-style-type: none"> <li>・感染症発生動向調査にともなう病原体検査業務</li> <li>・細菌感染症と食中毒の試験検査及び調査研究</li> <li>・結核登録者情報調査</li> <li>・健康づくりに関する調査研究</li> <li>・薬剤耐性菌に関する調査研究</li> <li>・医薬品等に関する検査</li> <li>・収去食品及び環境検体等に関する細菌検査</li> </ul>                                        |
|       | ウイルス班 | <ul style="list-style-type: none"> <li>・感染症発生動向調査にともなう病原体検査業務</li> <li>・ウイルス感染症と食中毒の試験検査及び調査研究</li> <li>・つつが虫病の抗体検査及び調査研究</li> <li>・感染症情報センター業務</li> </ul>                                                                                                            |
| 理化学部  | 理化学班  | <ul style="list-style-type: none"> <li>・食品の安全性に係る試験検査及び調査研究</li> <li>・食品放射能の測定</li> <li>・有害家庭用品試買検査</li> <li>・収去食品の理化学的検査</li> <li>・工場，事業場排水中の化学物質の検査</li> <li>・廃棄物関係検査</li> <li>・環境中の化学物質に関する調査研究</li> </ul>                                                         |
| 環境保全部 | 環境保全班 | <ul style="list-style-type: none"> <li>・公共用水域水質調査</li> <li>・工場，事業場排水基準検査</li> <li>・工場，事業場ばい煙排出基準検査</li> <li>・廃棄物関係検査</li> <li>・生活衛生関係検査</li> <li>・環境放射能の測定</li> <li>・大気汚染常時監視</li> <li>・航空機騒音調査</li> <li>・酸性雨調査</li> <li>・アスベスト環境調査</li> <li>・環境保全に関する調査研究</li> </ul> |

## 6. 主要機器

(平成 27 年 4 月 1 日現在)

| 機 器 名               | 規 格                               |
|---------------------|-----------------------------------|
| ガスクロマトグラフ           | アジレント・テクノロジー 7890A (FID)          |
| 〃                   | アジレント・テクノロジー 7890A (FPD)          |
| 〃                   | アジレント・テクノロジー 6890N (ECD)          |
| ガスクロマトグラフ質量分析計      | 島津 GCMS-QP2010 Ultra              |
| 〃                   | 島津 GCMS-QP2010 Plus               |
| 〃                   | 島津 QP5050A                        |
| 〃                   | 島津 QP5000                         |
| 〃                   | アジレント・テクノロジー 6890N/5973N          |
| ガスクロマトグラフタンデム型質量分析計 | サーモフィッシャー TSQ QuantumGC           |
| 高速液体クロマトグラフ         | 日立製作所 D-7000                      |
| 〃                   | 日立製作所 L-7000                      |
| 〃                   | 日立製作所 L-7000 (GPC)                |
| 〃                   | 日本ウォーターズ 2695                     |
| 〃                   | アジレント・テクノロジー 1200 (DAD・FLD)       |
| 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                 |
| イオンクロマトグラフ          | 日本ダイオネクス ICS-1100                 |
| 〃                   | 日本ダイオネクス DX-320                   |
| 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        | サーモフィッシャー iCAP 6300 Duo           |
| ノルマルヘキサン自動抽出装置      | ラボテック HX-1000-8                   |
| 高速溶媒抽出装置            | DIONEX 社 ASE-200 , ASE-300        |
| オートアナライザー           | ビーエルテック QuAAtro 2-HR              |
| 分離用超遠心機             | 日立工機 CP70MX                       |
| 電子顕微鏡               | 日本電子 JEM-1010                     |
| Ge 半導体検出器付波高分析装置    | セイコー EG&G GEM20P, MCA7            |
| 〃                   | セイコー EG&G GEM25-70, MCA7600       |
| 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      |
| 自動核酸精製装置            | 日本ロシュ・ダイアグノスティクス MagNA Pure LC2.0 |
| モニタリングポスト           | アロカ MAR-22                        |
| 空間放射線量モニタリングシステム    | 東芝 SD22-T                         |
| 低バックグラウンド放射能自動測定装置  | アロカ LBC-4201B                     |
| 大気汚染常時監視テレメータシステム   | NEC 他                             |
| 航空機騒音自動測定装置         | リオン NA-37                         |



## 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24   | 平成25  | 平成26 |
|-----------------|-----------------------------------|----------------------------------|-------------------|--------|-------|------|
| 細菌・ウイルス等の試験検査   | 感染症発生動向調査病原体別検査数                  | ウイルス分離検査                         | 850               | 861    | 1,052 |      |
|                 |                                   | 細菌検査                             | 1,078             | 1,438  | 1,070 |      |
|                 | 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    |      |
|                 |                                   | 肺炎球菌感染源調査                        | －                 | －      | 0     |      |
|                 | 食中毒等検査                            | ノロウイルス検査                         | 407               | －      | －     |      |
|                 |                                   | 胃腸炎ウイルス検査（ノロウイルス等） <sup>*1</sup> | －                 | 755    | 496   |      |
|                 |                                   | 細菌検査                             | 2,699             | 3,282  | 1,798 |      |
|                 | HIV抗体検査                           |                                  | 4                 | 1      | 1     |      |
|                 | HIV抗体確認検査                         |                                  | 4                 | 0      | 1     |      |
|                 | 性器クラミジア抗体検査                       |                                  | 155               | 134    | 122   |      |
|                 | 梅毒抗体検査                            |                                  | 155               | 134    | 122   |      |
|                 | B型肝炎抗原検査                          |                                  | 133               | 124    | 147   |      |
|                 | C型肝炎抗体検査                          |                                  | 133               | 124    | 150   |      |
|                 | 麻疹抗体価検査                           |                                  | 2                 | 0      | 0     |      |
|                 | 麻疹PCR                             |                                  | 23                | 0      | 0     |      |
|                 | 風疹PCR                             |                                  | 3                 | 0      | 0     |      |
|                 | 麻疹・風疹・発疹性ウイルス検査 <sup>*2</sup>     |                                  | －                 | 276    | 218   |      |
|                 | 新型インフルエンザ                         |                                  | 29                | 6      | －     |      |
|                 | 新型インフルエンザ等呼吸器ウイルス検査 <sup>*3</sup> |                                  | －                 | －      | 289   |      |
|                 | 新型インフルエンザタミフル耐性検査                 |                                  | 0                 | 0      | 0     |      |
|                 | SFTSウイルス検査 <sup>*4</sup>          |                                  | －                 | －      | 0     |      |
|                 | デングウイルス検査 <sup>*5</sup>           |                                  | －                 | －      | 7     |      |
|                 | 3類感染症に係わる病原微生物検査                  |                                  | 499               | 490    | 484   |      |
|                 | 地研                                |                                  | カンピロバクター（薬剤感受性試験） | 61     | 37    | 53   |
|                 | レファレンスセンター業務                      |                                  | ジフテリア・百日咳・ボツリヌス   | 223    | 159   | 52   |
|                 | 結核菌RFLP検査，VNTR検査                  |                                  |                   | 96     | 67    | 81   |
|                 | つつが虫病血清検査                         |                                  |                   | 87     | 105   | 104  |
|                 | その他微生物学的検査                        |                                  |                   | 826    | 467   | 404  |
|                 | 食品衛生に係る検査                         | 食品収去検査                           |                   | 1,013  | 953   | 902  |
|                 |                                   | 食中毒菌汚染実態調査                       |                   | 190    | 290   | 293  |
|                 |                                   | 精度管理                             |                   | 3      | 3     | 3    |
|                 | 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     | 32    | 25   |
|                 |                                   | 貸しおしぼり検査                         |                   | 32     | 16    | 16   |
|                 |                                   | 公衆浴場等レジオネラ属菌検査                   |                   | 56     | 121   | 103  |
|                 | 水質汚濁対策                            | 公共用水域水質環境調査                      |                   | 243    | 47    | 47   |
| 八郎湖水質保全調査       |                                   | 84                               | 78                | 79     |       |      |
| 工場・事業場排水基準検査    |                                   | 244                              | 218               | 230    |       |      |
| 廃棄物対策           | 産業廃棄物等基準検査                        |                                  | 20                | 20     | 20    |      |
| マス・スクリーニング      | 先天性代謝異常，内分泌疾患 <sup>*6</sup>       |                                  | 7,362             | 2,617  | －     |      |
| 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）                |                                  | 5                 | 3      | 3     |      |
| 国民健康・栄養調査       | 栄養調査・解析                           |                                  | 828               | 0      | －     |      |
|                 | 食生活状況調査・解析                        |                                  | －                 | 0      | －     |      |
|                 | 身体状況調査・解析                         |                                  | 627               | 0      | －     |      |
|                 | 生活習慣調査・解析                         |                                  | 775               | 0      | －     |      |
|                 | 血液検査                              |                                  | 389               | 0      | －     |      |
|                 | 塩分濃度測定                            |                                  | 120               | 0      | －     |      |
| 合 計             |                                   |                                  | 19,660            | 13,028 | 8,542 |      |

\*1 胃腸炎ウイルス検査（ノロウイルス等）については、平成25年度から新たに項目を起こした。

\*2 麻疹・風疹・発疹性ウイルス検査については、平成25年度から新たに項目を起こした。

\*3 新型インフルエンザ等呼吸器ウイルス検査については、平成26年度から新たに項目を起こした。

\*4 SFTSウイルス検査については、平成26年度から新たに項目を起こした。平成25年度以前のSFTSウイルス検査件数はその他微生物検査に計上している。

\*5 デングウイルス検査については、平成26年度から新たに項目を起こした。平成25年度以前のデングウイルス検査件数はその他微生物検査に計上している。

\*6 マス・スクリーニングについては、平成25年8月から外部委託となった。

## 1.2 保健衛生部一般依頼検査

|                 |                                   | (件数) |      |      |
|-----------------|-----------------------------------|------|------|------|
| 項 目             | 年 度                               | 平成24 | 平成25 | 平成26 |
| 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）                     | 410  | 450  | 365  |
| 細菌・ウイルス等の試験検査   | ウイルス分離等検査                         | 3    | 0    | 0    |
|                 | 食中毒関係等胃腸炎ウイルス検査（ノロウイルス等）          | 0    | 24   | 1    |
|                 | 麻疹・風疹・発疹性ウイルス検査 <sup>*1</sup>     | 0    | 0    | 42   |
|                 | 新型インフルエンザ <sup>2</sup>            | 1    | 3    | —    |
|                 | 新型インフルエンザ等呼吸器ウイルス検査 <sup>*2</sup> | —    | —    | 3    |
|                 | 新型インフルエンザタミフル耐性検査                 | 0    | 0    | 0    |
|                 | SFTSウイルス検査 <sup>*3</sup>          | 0    | 0    | 0    |
|                 | デングウイルス検査 <sup>*4</sup>           | 0    | 0    | 3    |
|                 | 細菌培養同定検査                          | 0    | 13   | 9    |
|                 | 細菌遺伝子解析検査                         | 0    | 0    | 2    |
|                 | HIV抗体確認検査                         | 2    | 0    | 0    |
| 合 計             |                                   | 416  | 490  | 425  |

\*1 麻疹・風疹・発疹性ウイルス検査については、平成26年度から新たに項目を起こした。

\*2 新型インフルエンザ等呼吸器ウイルス検査については、平成26年度から新たに項目を起こした。

\*3 SFTSウイルス検査については、平成26年度から新たに項目を起こした。

\*4 デングウイルス検査については、平成26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24  | 平成25  | 平成26 |
| 基幹・地方感染症情報センター<br>(感染症発生動向調査依頼業務) | 患者情報        | 週報               | 収集   | 468   | 468   | 468   |      |
|                                   |             |                  | 報告   | 52    | 52    | 52    |      |
|                                   |             |                  | 還元   | 52    | 52    | 52    |      |
|                                   |             |                  | 解析   | 52    | 52    | 52    |      |
|                                   |             |                  | 提供   | 468   | 468   | 468   |      |
|                                   |             | 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       | 報告               | 収集   | 52    | 52    | 52    |      |
|                                   |             |                  | ウイルス | 503   | 526   | 563   |      |
|                                   |             | 細菌               | 301  | 310   | 286   |       |      |
|                                   |             | 還元               | 24   | 24    | 24    |       |      |
|                                   |             | 解析               | 24   | 24    | 24    |       |      |
|                                   | 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   | 108   |      |
|                                   |             |                  | 報告   | 12    | 12    | 12    |      |
|                                   |             |                  | 還元   | 12    | 12    | 12    |      |
|                                   |             |                  | 解析   | 12    | 12    | 12    |      |
|                                   |             |                  | 提供   | 108   | 108   | 108   |      |
|                                   |             | 年報 <sup>*1</sup> | 収集   | 9     | 9     | 9     |      |
|                                   |             |                  | 報告   | 1     | 1     | 1     |      |
|                                   |             |                  | 還元   | 1     | 1     | 1     |      |
|                                   |             |                  | 解析   | 1     | 1     | 1     |      |
|                                   |             |                  | 提供   | 9     | 9     | 9     |      |
| 花粉症予防対策依頼業務 <sup>*2</sup>         | スギ花粉予報作成提供  |                  |      | 52    | —     | —     |      |
|                                   | スギ花粉測定数     |                  |      | 221   | —     | —     |      |
|                                   | スギ雄花芽調査数    |                  |      | 15    | —     | —     |      |
|                                   | 花粉症患者調査票数   |                  |      | 80    | —     | —     |      |
| 合 計                               |             |                  |      | 2,895 | 2,559 | 2,572 |      |

\*1 新規結核登録患者数：98人、年末時結核登録者数：223人（平成26年1月～12月）

\*2 花粉症予防対策依頼業務は平成24年度で終了した。

## 1.4 理化学部行政依頼検査

(件数)

| 項 目                        |                         |                       | 年 度 | 平成24   | 平成25   | 平成26   |
|----------------------------|-------------------------|-----------------------|-----|--------|--------|--------|
| 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        |                       |     | 324    | 98     | 273    |
|                            | 残留農薬検査                  |                       |     | 7,782  | 6,537  | 16,878 |
|                            | 食品収去検査（食品添加物等）          |                       |     | 657    | 524    | 558    |
|                            | 精度管理                    |                       |     | 36     | 21     | 21     |
| 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）     |                       |     | 0      | 0      | 0      |
| 家庭用品試買検査                   | 有害物質                    |                       |     | 55     | 51     | 24     |
| 環境放射能水準調査                  | 空間線量                    |                       |     | 2,190  | 2,190  | 2,190  |
|                            | 全ベータ線                   |                       |     | 139    | 156    | 144    |
|                            | 核種分析                    |                       |     | 123    | 123    | 123    |
|                            | 分析確認                    |                       |     | 55     | 110    | 110    |
| 福島原子力発電所事故に伴う<br>緊急環境放射能調査 | 空間線量                    |                       |     | 12     | 12     | 12     |
|                            | 核種分析                    | 蛇口水                   |     | 20     | 20     | 20     |
|                            |                         | 食品等試料                 |     | 219    | 339    | 306    |
|                            |                         | 県産農産物等試料              |     | 1,440  | 642    | 570    |
| 水質汚濁対策                     | 環境調査                    | 公共用水域水質調査             |     | 35     | 36     | 35     |
|                            |                         | 地下水調査                 |     | 0      | 0      | 0      |
|                            |                         | 緊急調査                  |     | 0      | 0      | 0      |
|                            | 工場排水基準検査                |                       |     | 67     | 67     | 59     |
| 土壌汚染対策                     | 汚染土壌処理事業所検査             |                       |     | 22     | 22     | 33     |
| 廃棄物対策                      | 産業廃棄物等基準検査              |                       |     | 198    | 253    | 291    |
|                            | 能代産業廃棄物処理セン<br>ター環境保全対策 | 能代地区周辺環境調査            |     | 860    | 819    | 574    |
|                            |                         | 能代産業廃棄物処理<br>センター関連調査 |     | 1,833  | 3,297  | 2,681  |
| 合 計                        |                         |                       |     | 16,067 | 15,317 | 24,902 |

## 1.5 環境保全部行政依頼検査

|                            |                        |             | (件数)            |                 |                 |
|----------------------------|------------------------|-------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| 項 目                        |                        | 年 度         | 平成24            | 平成25            | 平成26            |
| 大気汚染対策                     | 大気汚染常時監視 <sup>*1</sup> | 一般環境大気測定局   | 57<br>(477,729) | 57<br>(466,452) | 50<br>(422,880) |
|                            |                        | 自動車排出ガス測定局  | 15<br>(129,750) | 15<br>(128,634) | 15<br>(128,966) |
|                            |                        | 工場局         | 74<br>(584,893) | 74<br>(547,254) | 74<br>(530,999) |
|                            | ばい煙排出基準検査              |             | 0               | 29              | 28              |
|                            | 酸性雨調査                  | 酸性雨実態調査     | 1,420           | 1,390           | 1,400           |
|                            | アスベスト対策                | 石綿飛散調査      | 36              | 44              | 60              |
| 福島原子力発電所事故に伴う<br>緊急環境放射能調査 | 核種分析                   | 蛇口水         | 36              | 36              | 0               |
|                            |                        | 環境試料        | 1,251           | 919             | 514             |
|                            |                        | 畜産試料        | 38              | 14              | 0               |
| その他緊急環境放射能調査               | 核種分析                   | 降下物         | 30              | 0               | 0               |
|                            |                        | 浮遊じん        | 30              | 0               | 0               |
| 水質汚濁対策                     | 環境調査                   | 公共用水域水質調査   | 4,107           | 3,814           | 4,257           |
|                            |                        | 地下水調査       | 0               | 0               | 0               |
|                            |                        | 緊急調査        | 519             | 674             | 192             |
|                            | 工場・事業場排水基準検査           | 工場排水        | 2,189           | 1,998           | 1,882           |
|                            |                        | 水浴場水        | 336             | 0               | 0               |
|                            | 八郎湖水質保全対策調査            | 底質調査        | 36              | 36              | 36              |
|                            |                        | 緊急調査        | 158             | 0               | 0               |
|                            | 玉川酸性水影響調査              |             | 336             | 317             | 317             |
|                            | 十和田湖水質保全対策調査           | 十和田湖水質生態系調査 | 240             | 240             | 240             |
|                            |                        | 十和田湖流入河川調査  | 0               | 0               | 0               |
| 土壌汚染対策                     | 汚染土壌処理事業所検査            |             | 36              | 46              | 69              |
| 生活衛生に係る検査                  | 遊泳用プール水質検査             |             | 16              | 24              | 24              |
|                            | 公衆浴場水質検査               |             | 64              | 32              | 32              |
|                            | 食肉衛生検査所自主検査            |             | 20              | 20              | 20              |
| 騒音対策                       | 航空機騒音調査                |             | 758             | 714             | 722             |
| 化学物質対策                     | 化学物質環境調査               |             | 137             | 195             | 274             |
| 廃棄物対策                      | 産業廃棄物等基準検査             |             | 543             | 529             | 505             |
|                            | 能代産業廃棄物処理センター関連調査      |             | 1,322           | 1,221           | 992             |
|                            | 緊急調査                   |             | 0               | 0               | 0               |
| 合 計 （大気汚染常時監視を除く）          |                        |             | 13,658          | 12,292          | 11,564          |

\*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. 研修・学会等

## 2.1 研修等参加

| 年月日         | 研 修 名                                                | 参加者                  | 開催地 |
|-------------|------------------------------------------------------|----------------------|-----|
| 26.05.16    | 平成 26 年度病原体等の包装・運搬講習会                                | 樫尾拓子                 | 東京都 |
| 26.06.12～27 | 機器分析研修                                               | 佐藤 健                 | 埼玉県 |
| 26.06.30    | クロマト基礎セミナー2014                                       | 佐藤清隆<br>今野禄朗<br>中村淳子 | 秋田市 |
| 26.09.04    | 東北食中毒研究会第 27 回全体会議・研修会                               | 保健衛生部員               | 秋田市 |
| 26.09.18～19 | 平成 26 年度地方衛生研究所全国協議会<br>北海道・東北・新潟支部微生物研究部会           | 柴田ちひろ<br>樫尾拓子        | 山形県 |
| 26.09.26    | 第 1 回放射能汚染対策プロジェクト委員会                                | 珍田尚俊                 | 秋田市 |
| 26.10.07～10 | (公財) 結核予防会結核研修所研修<br>平成 26 年度結核行政担当者コース              | 田中貴子                 | 東京都 |
| 26.10.10    | 平成 26 年度食品衛生検査施設信頼性確保部門責任者研修会                        | 岩谷金仁                 | 東京都 |
| 26.10.23～24 | 平成 26 年度地方衛生研究所全国協議会 北海道・東北・<br>新潟支部公衆衛生情報研究部会総会・研修会 | 村山力則                 | 北海道 |
| 26.10.23～24 | 平成 26 年度地研北海道・東北・新潟支部<br>衛生化学研究部会総会                  | 今野禄朗<br>珍田尚俊         | 青森県 |
| 26.10.28～31 | 平成 26 年度環境放射能分析研修                                    | 佐藤清隆                 | 千葉県 |
| 26.11.06～07 | 平成 26 年度秋田県食品衛生監視員等研修会                               | 今野禄朗                 | 潟上市 |
| 26.11.11～19 | 環境放射能分析研修                                            | 小川千春                 | 千葉県 |
| 26.11.28    | 岩手県環境保健研究センター<br>「I-RIEP セミナー・危険ドラッグ研修会」             | 珍田尚俊                 | 岩手県 |
| 27.01.16    | 平成 26 年度指定薬物分析研修会議について                               | 松渕亜希子<br>珍田尚俊        | 東京都 |
| 27.01.26～28 | 平成 26 年度石綿位相差顕微鏡法研修                                  | 佐藤清隆                 | 埼玉県 |
| 27.01.28    | 危険ドラッグ等違法薬物分析ソリューションセミナー                             | 珍田尚俊                 | 岩手県 |
| 27.01.29～30 | 平成 26 年度化学物質環境実態調査環境科学セミナー                           | 佐藤 健<br>玉田将文         | 東京都 |
| 27.02.13～14 | 平成 26 年度衛生理化学分野研修会及び食品化学分野研究<br>者育成研修セミナー            | 今野禄朗                 | 東京都 |
| 27.02.17～18 | 平成 26 年度希少感染症診断技術研修会                                 | 今野貴之<br>佐藤寛子<br>熊谷優子 | 東京都 |
| 27.03.11    | 平成 26 年度放射線監視結果収集調査検討会                               | 今野禄朗                 | 東京都 |
| 27.03.20    | 廃棄物関連試料の分析マニュアル出版記念セミナー                              | 佐藤 健                 | 東京都 |

## 2.2 学会等出席

| 年月日         | 学 会 名                                                                    | 出席者<br>(○発表者)                    | 開催地  |
|-------------|--------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|------|
| 26.05.14～16 | 第 23 回環境化学討論会                                                            | ○菅原 剛                            | 京都府  |
| 26.05.15～16 | 第 107 回日本食品衛生学会学術講演会                                                     | 齊藤志保子                            | 東京都  |
| 26.06.14～15 | 第 55 回日本臨床ウイルス学会                                                         | 柴田ちひろ                            | 北海道  |
| 26.06.18～20 | 第 88 回日本感染症学会学術講演会                                                       | ○今野貴之                            | 福岡県  |
| 26.06.26～27 | 衛生微生物技術協議会第 35 回研究会                                                      | 今野貴之<br>八柳 潤<br>○佐藤寛子<br>斎藤博之    | 東京都  |
| 26.08.15～17 | 第 2 回アジア食品安全合同会議<br>The 2nd. AFSA Conference on Food Safety and Security | ○斎藤博之                            | ベトナム |
| 26.08.23    | 第 6 回 J 感染制御ネットワークフォーラム                                                  | 斎藤博之                             | 宮城県  |
| 26.09.17～19 | 平成 26 年度大気環境学会                                                           | 佐藤 健                             | 愛媛県  |
| 26.09.18～19 | 第 35 回日本食品微生物学会学術総会                                                      | 高橋志保<br>○秋野和華子<br>○斎藤博之<br>齊藤志保子 | 大阪府  |
| 26.10.08    | 日本獣医公衆衛生学会（東北地区）                                                         | 齊藤志保子                            | 宮城県  |
| 26.10.16～17 | 第 37 回農薬残留分析研究会                                                          | 今野禄朗                             | 宮城県  |
| 26.10.18    | 第 60 回日本寄生虫学会・日本衛生動物学会<br>北日本支部合同大会                                      | ○佐藤寛子                            | 岩手県  |
| 26.11.08    | 第 38 回秋田県医学検査学会                                                          | ○小川千春<br>○樫尾拓子                   | 秋田市  |
| 26.11.09    | 第 26 回ウイルス性下痢症研究会学術集会                                                    | 斎藤博之                             | 東京都  |
| 26.11.10～12 | 第 62 回日本ウイルス学会学術集会                                                       | ○斎藤博之                            | 神奈川県 |
| 26.11.19    | 第 12 回秋田県公衆衛生学会学術大会                                                      | ○佐藤寛子<br>○田中貴子<br>齊藤志保子          | 秋田市  |
| 26.11.20～21 | 第 51 回全国衛生化学技術協議会年会                                                      | ○珍田尚俊                            | 大分県  |
| 26.11.22    | 第 368 回日本皮膚科学会秋田地方会                                                      | 佐藤寛子                             | 秋田市  |
| 26.11.25    | あきた産学官連携フォーラム 2014                                                       | ○斎藤博之<br>川原和志                    | 秋田市  |
| 26.12.03～05 | 第 108 回日本食品衛生学会学術講演会                                                     | 今野禄朗<br>○斎藤博之<br>齊藤志保子           | 石川県  |
| 26.12.05    | 秋田応用生命科学研究会第 24 回講演会                                                     | ○佐藤寛子                            | 秋田市  |
| 26.12.20～21 | 第 21 回リケッチア研究会研究発表会                                                      | ○佐藤寛子                            | 東京都  |
| 27.02.13～15 | 平成 26 年度日本獣医師会獣医学術学会年次大会                                                 | 齊藤志保子                            | 岡山県  |
| 27.03.16～18 | 第 49 回日本水環境学会                                                            | 小林貴司<br>生魚利治                     | 石川県  |
| 27.03.19～22 | 第 62 回日本生態学会                                                             | ○玉田将文                            | 鹿児島県 |



## 2.3 健康環境センター主催研究発表会

開催日：平成26年7月9日（水）

開催場所：秋田県総合保健センター

|   | 演 題 名                                                                  | 発 表 者 |
|---|------------------------------------------------------------------------|-------|
| 1 | 稀な血清型 Agbeni が同定された 3 件のサルモネラ感染事例の解析                                   | 今野貴之  |
| 2 | 秋田県における食用牛の腸管出血性大腸菌保菌状況と分離株の細菌学的性状に関する研究－2001～2003 年と 2012～2013 年の調査成績 | 八柳 潤  |
| 3 | ウシ早期初乳のウイルス不活化効果に関する検討                                                 | 柴田ちひろ |
| 4 | 雄物川流域におけるアカツツガムシ生息状況調査：2009 年～2012 年                                   | 佐藤寛子  |
| 5 | マツ林に散布された農薬の挙動について                                                     | 小林貴司  |
| 6 | 田沢湖の水質の変遷                                                              | 生魚利治  |
| 7 | 未処理玉川酸性水の中和による pH 改善とそれに伴う効果                                           | 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 |
|----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|-----|
| 27.01.23 | 平成 26 年度保健環境業務研究発表会<br>・感染症発生動向調査における小児呼吸器疾患からの病原体検出状況<br>・患者およびマウスの血中 <i>Orientia tsutsugamushi</i> の定量と重症化に関する考察<br>・有機リン系農薬が混入された冷凍食品の検査について | 柴田ちひろ<br>佐藤寛子<br>今野禄朗 | 潟上市 |

## 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               | 延人数  |
|----------------------------|-----------------------------------|------|-------------------|------|
| 26.05.09～<br>09.04         | スーパーサイエンスハイスクール<br>実験試料の分析        | 高嶋 司 | 横手清陵学院            | 1 名  |
| 26.05.30<br>26.09.30       | パンソルビントラップ法の商品開<br>発に関する助言        | 斎藤博之 | メルク社              | 2 名  |
| 26.06.13～17                | パンソルビントラップ法の導入に<br>関する助言          | 斎藤博之 | 奈良県保健研究センター       | 2 名  |
| 26.07.03～18                | パンソルビントラップ法の導入に<br>関する助言          | 斎藤博之 | 浜松市保健環境研究所        | 5 名  |
| 26.07.14～16                | パンソルビントラップ法の導入に<br>関する助言          | 斎藤博之 | 兵庫県西宮保健所          | 3 名  |
| 26.10.15                   | パンソルビントラップ法の導入に<br>関する助言          | 斎藤博之 | 秋田市保健所            | 1 名  |
| 26.12.03～04<br>27.02.18～20 | もみ殻炭を活用したフィールドで<br>の水質浄化試験へのアドバイス | 成田修司 | 長崎県環境保健研究セ<br>ンター | 8 名  |
| 26.12.26                   | パンソルビントラップ法の導入に<br>関する助言          | 斎藤博之 | 岡山県倉敷保健所          | 1 名  |
| 合 計                        |                                   |      |                   | 23 名 |

## 2.5.2 出前講座

| 出前講座           | 講師氏名  | 実施回数 | 延べ参加者数 |
|----------------|-------|------|--------|
| 油断できない結核       | 田中貴子  | 1 回  | 20 名   |
| 細菌性感染症・食中毒について | 高橋志保  | 2 回  | 43 名   |
| ウイルス性食中毒について   | 斎藤博之  | 2 回  | 197 名  |
|                | 佐藤寛子  | 2 回  | 100 名  |
| ウイルス性感染症について   | 斎藤博之  | 1 回  | 28 名   |
|                | 柴田ちひろ | 1 回  | 35 名   |
| 環境放射能について      | 珍田尚俊  | 1 回  | 30 名   |
| 環境中の大気汚染物質について | 大淵志伸  | 1 回  | 40 名   |
|                | 清水 匠  | 1 回  | 20 名   |
| 合 計            |       | 12 回 | 513 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  |
|---------------------------------------------|-----------------|------|---------------------|-------|
| 廃棄物処理について                                   | 26.05.20        | 小林貴司 | 秋田県立大学              | 4 名   |
| 食品中の残留農薬について                                | 26.05.27        | 小林貴司 | 秋田県立大学              | 4 名   |
| 結核等に関する情報及び健康管理上の<br>予防方法等について              | 26.06.02        | 田中貴子 | 産業技術センター            | 50 名  |
| ウイルス性食中毒の予防対策について                           | 26.08.05        | 斎藤博之 | 秋田市保健所              | 90 名  |
| 特殊災害と保安                                     | 26.08.20        | 斎藤博之 | 消防学校                | 80 名  |
| 感染症アラカルト<br>～細菌からみた感染症～                     | 26.09.26        | 今野貴之 | 秋田地域振興局福祉環<br>境部    | 30 名  |
| 個体の反応                                       | 26.09.30        | 八柳 潤 | 秋田大学医学系研究科          | 150 名 |
| 高齢者の健康と感染症について                              | 26.10.01        | 斎藤博之 | 由利地域振興局福祉環<br>境部    | 140 名 |
| 生活衛生関係営業の感染症対策                              | 26.10.27        | 斎藤博之 | 秋田県生活衛生営業指<br>導センター | 30 名  |
| <i>Orientia tsutsugamushi</i> 培養技術合同研修<br>会 | 26.10.30<br>～31 | 佐藤寛子 | 福島県衛生研究所            | 3 名   |
| 大学院セミナー                                     | 26.11.07        | 生魚利治 | 秋田県立大学              | 50 名  |
| 生活衛生関係営業の感染症対策                              | 26.11.10        | 佐藤寛子 | 秋田県生活衛生営業指<br>導センター | 70 名  |
| 危険性物質等の基礎知識                                 | 26.11.13        | 斎藤博之 | 消防学校                | 19 名  |

|                               |          |      |                 |         |
|-------------------------------|----------|------|-----------------|---------|
| 臨床検査を探求する～イーハトーブから臨床検査を見つめ直す～ | 26.11.23 | 八柳 潤 | 日臨技北日本支部医学検査部会  | 50 名    |
| つつが虫病について                     | 26.11.25 | 佐藤寛子 | 秋田県医師会          | 12 名    |
| 十和田湖の水質の現況について                | 27.01.20 | 生魚利治 | 秋田県生活環境部        | 80 名    |
| 保健情報学 結核の情報管理・統計              | 27.01.22 | 田中貴子 | 秋田大学医学系研究科      | 80 名    |
| 高濃度リン湧出水への適応等                 | 27.01.24 | 成田修司 | あきた環境懇話会        | 60 名    |
| 生活衛生関係営業の感染症対策                | 27.02.23 | 斎藤博之 | 秋田県生活衛生営業指導センター | 40 名    |
| 生活衛生関係営業の感染症対策                | 27.03.02 | 斎藤博之 | 秋田県生活衛生営業指導センター | 30 名    |
| 合 計 20 回                      |          |      |                 | 1,072 名 |

## 2.6 視察・見学等受入

| 参加者区分               | 平成 24 年度 | 平成 25 年度 | 平成 26 年度 |                                                                                  |
|---------------------|----------|----------|----------|----------------------------------------------------------------------------------|
| 小・中学生               | 2 (2)    | 0        | 0        | —                                                                                |
| インターンシップ            | 11 (3)   | 10 (3)   | 17 (3)   | 秋田県立大学生物資源科学部応用生物科学科・生物生産科学科・生物環境学科（3 年生）、秋田高専環境都市工学科・電気情報工学科（3 年生）、本荘高等学校（2 年生） |
| その他の学生              | 37 (4)   | 53 (4)   | 28 (2)   | 秋田大学医学部社会医学実習（3 年生）、聖霊女子短期大学専攻課健康栄養専攻（2 年生）                                      |
| 一般県民                | 0        | 0        | 0        | —                                                                                |
| 業務関係者<br>（医師臨床研修含む） | 9 (3)    | 9 (1)    | 0        | —                                                                                |
| 県外                  | 10 (7)   | 2 (1)    | 5 (4)    | 石川県環境保健研究センター、長崎県環境保健研究センター、麻布大学獣医学部獣医学科（5 年次生）、岩手大学農学部共同獣医学科（3 年次生）             |
| 国外                  | 3 (2)    | 2 (1)    | 2 (2)    | 吉林省白城市環境保護局、吉林省前敦市環境保護局                                                          |
| 合 計                 | 72 (21)  | 76 (10)  | 52 (11)  |                                                                                  |

注）括弧内の数字は団体数

## 2.7 受賞・表彰等

| 受賞日      | 表 彰 名         | 受賞者  | 授 与 機 関   |
|----------|---------------|------|-----------|
| 26.10.22 | 生活と環境全国大会 感謝状 | 大渕志伸 | 生活と環境全国大会 |

### 3. 研究業務実績

#### 細菌班

カンピロバクターの型別方法の検討と分離菌株の特徴－カンピロバクターレファレンスセンター業務－（厚生労働科学研究費補助金「国内の病原体サーベイランスに資する機能的なラボネットワークの強化に関する研究」）（平成25年度～）

#### 研究概要

平成26年は県内の散発下痢症患者由来の47株（*C. jejuni* 46株，*C. coli* 1株）について Penner 法と Lior 法の比較検討を行った。また，型別不能であった株については，PCR 型別法により型別可能か検討した。さらに，薬剤耐性化の傾向を把握するため，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，オフロキサシン，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た。

同様に鶏肉から分離した13株（*C. jejuni* 12株，*C. coli* 1株），食中毒事例から分離した *C. jejuni* 2株についても調査した。

#### 結果

散発下痢症患者由来の *C. jejuni* 46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28株（60.9%），Lior 法では22株（47.8%）であった。*C. coli* はいずれの手法でも単一の血清型には型別されなかった。また，散発下痢症患者由来の *C. jejuni* 42株中33株（78.6%）がキノロン系薬剤に耐性を示した。*C. jejuni* におけるキノロン系薬剤への耐性は，以前は30～40%程度であったが，近年その割合が高くなっており，耐性化の進行が危惧される。一方，第一選択薬のエリスロマイシンについては耐性株は検出されなかった。

鶏肉由来株の一部では，患者由来株と同一の血清型がみられた。集団感染事例では，鶏肉が原因食品と推定された事例もあったことから，鶏肉はカンピロバクターの感染源として重要と考えられる。

Penner 法による血清型別で単一の型に決定で

きなかった21株について，PCR 型別を行ったところ19株で型別可能であり，PCR 型別の有用性が示された。

#### サルモネラ菌の迅速な同定のための検出法及び血清型別法の確立

（平成25年度～平成26年度）

#### 研究概要

サルモネラによる食中毒，感染症の際の迅速な検査体制の構築を目的に，サルモネラの遺伝子解析法による検出法及び血清型別法の確立を行った。

平成26年度は，食肉21検体についてリアルタイムPCR法によるサルモネラ亜種Ⅰの検出を行い，培養による分離同定検査との比較を行った。また，サルモネラの血清型を決定している主要なO抗原7種類，H1抗原12種類，H2抗原7種類について Multiplex PCR 法を検討し，検査法の省力化を行った。

#### 結果

サルモネラが分離されたのは21検体中5検体であり，血清型は Infantis (O7:r:1,5) と1検体からは Manhattan (O6,8:d:1,5) も分離された。リアルタイムPCRでは増菌液3検体からサルモネラ遺伝子が検出され，二次増菌液ではサルモネラが分離された5検体はいずれも陽性となった。1検体については，サルモネラ分離陰性であったが，リアルタイムPCRでは陽性であった。この検討により，リアルタイムPCR法は，サルモネラ検査の初期段階である二次増菌まで行えば，迅速にサルモネラの検出が可能であることが示唆された。

血清型別法については，県内で分離される主要なサルモネラについては，Multiplex PCR により容易に血清型を推定することが可能となった。PCR法による抗原遺伝子の検出は，迅速であることに加え，何らかの原因で抗原が産生されなくなってしまう変異株等においても有効であり，今後の正確な感染症のサーベイランスや食中毒の原因究明等に役立つと考えられる。

## 食中毒事例等で分離された黄色ブドウ球菌の遺伝子型別について（厚生労働科学研究費補助金「食品中の食中毒菌等の遺伝特性及び制御に関する調査」）

（平成 25 年度～平成 27 年度）

### 研究概要

一般に流通している食品における各種食中毒菌の汚染状況及び菌株の型別等の疫学情報は食中毒発生時の原因究明あるいは食品衛生指導等に非常に有用と考えられる。食品検査あるいは食中毒事例において分離された黄色ブドウ球菌を対象に、有用なタイピング方法について検討するため、平成 25 年度は鶏肉汚染実態調査で分離された黄色ブドウ球菌について POT 法、MLVA 法、PFGE 法により遺伝子型別を実施した。またブドウ球菌エンテロトキシンの A～E,G,H,I 型 *sea*～*see*, *seg*, *seh*, *sei* 遺伝子の保有状況について PCR 法により検討した。平成 26 年度は、さらに、実際の食中毒事例における応用の可能性を検討するため、黄色ブドウ球菌食中毒事例由来株、有症苦情事例や他の原因物質事例で検出された黄色ブドウ球菌について同様に検討した。

### 結果

食中毒事例等 25 事例由来 75 株は POT 法で 31 種類、SE 型と POT 型の組み合わせで 35 種類、MLVA 法で 36 種類に型別された。さらに、POT 法と MLVA 法の型別の評価のため、POT 型 24 種（SE:POT 型 27 種）、MLVA 法 27 種に型別された 53 株について PFGE 型別を実施したところ、26 種類に型別された。同じ POT 型、MLVA 型が PFGE 法で細分化される例、逆に異なる POT 型、MLVA 型が同一の PFGE パターンとなる例もみられたが、POT 法と MLVA 法による型別は PFGE 法による型別とほぼ同程度の解析力を有していることが確認された。また、簡便性・迅速性からも POT 型別及び MLVA 型別は有用な型別法であると考えられた。

## 高齢者結核対策支援と薬剤耐性迅速診断法の導入に関する調査研究

（平成 26 年度～平成 27 年度）

### 研究概要

本県の高齢者結核対策の行政対応支援を目的として、結核再燃例の疫学的・分子疫学的特徴に関する知見を集積し特徴を明らかにする。治療面から結核対策を支援するため、分離株のピラジナミドに対する耐性の有無、イソニアジドに対する耐性の有無を迅速・高精度に判定する遺伝子診断技術を導入する。また、高齢者結核対策に活用可能な高齢者の生活パターンに合わせた教材等の指導指針を作成する。

### 結果

結核菌分子疫学調査として、分離株の VNTR 検査を、JATA-12 法により実施した。結核菌薬剤感受性の遺伝子診断では、イソニアジド耐性について、*katG*, *mabA*, *ahpC* 遺伝子の変異の有無を確認した。供試株は平成 24 年 7 月～平成 25 年 6 月受領株 96 株で、そのうち培養試験でイソニアジド耐性であった株 8 株中 5 株に耐性遺伝子変異があった。ピラジナミド耐性遺伝子検査は 48 株について、*pncA* 遺伝子の変異の有無を確認した。PZase(-)の 1 株も含めて、48 株全て *pncA* 遺伝子の変異はなかった。

また、本県の高齢者結核対策支援の一環として、「高齢者福祉施設等における結核対応ガイドブック」の作成に向けたインタビュー調査を実施した。平成 24～25 年に結核患者の発生があった特別養護老人ホーム、老人保健施設、居宅介護支援事業所等の 10 か所を対象に、平成 26 年 12 月～平成 27 年 2 月に調査した。結核患者発生時の不安や困った事は、結核の知識や理解不足による食器消毒、衣類寝具の洗濯等の日常的な作業についてのとまどいであった。過度の不安を持つ職員がいる一方で結核を全く知らず危機意識に乏しい職員もいた。接触者健診では定期的長期的に追跡するため対応の煩雑さに困惑した施設も多かった。しかし、これらの不安解消には保健所の指導助言が大きい役割を果たしていた。施設及び事業所における結核対応ガイドブックの必要性については、全施設及び事業所が認識していた。掲載内容については結核の正しい知識、発生時の具体的対応、日常生活上の一般的情報、保健所との連携等であり、医学用語が少なく理解しやすいもの、1 冊で結核対応が分かるものを希望していた。



## ウイルス班

### 食品からのウイルス検出法としてのパンソルビン・トラップ法の精度向上に関する研究（厚生労働科学研究費補助金「食品中の病原ウイルスの検出法に関する研究」）

（平成 25 年度～平成 27 年度）

#### 研究概要

パンソルビン・トラップ法は、食品検体に含まれるウイルス粒子を黄色ブドウ球菌の表面に吸着させて回収することを基本原理としている。その吸着のための「糊」の役割を果たす捕捉抗体として、これまでは医療用のガンマグロブリン製剤を用いてきた。しかし、医薬品であることから薬事法に伴う制約があり、普及段階においては一般の試薬として購入・使用できる捕捉抗体供給源が望まれた。本研究では、医薬品ではない工業用ガンマグロブリンの導入を検討することで根本的な問題解決を図った。

次に、普及に際して障害となる偽陽性の問題に対して対策を検討した。近年の遺伝子解析技術の高度化に伴い、実験室内で PCR 増幅産物が混入して判定結果に影響を及ぼすリスクが高まったことから、一層の対策強化が求められたので対応策を検討した。

#### 結果

NoV-GI 4, NoV-GI 6, NoV-GII 2, NoV-GII 4, 及び NoV-GII 6 の各型を用いて、工業用と医療用のガンマグロブリンを用いた際の回収率の比較を行ったところ、全てにおいて両者は同等であった。

偽陽性防止のための方策として、dUTP と UNG (Uracil-N-Glycosylase) の組み合わせによる DNA 汚染の無効化と、2nd PCR に real-time PCR を用いて、Ct 値をもって判別する方法が有効であることを示すことができた。

IP 法に使用する抗原の最適化に向けた検討（厚生労働科学研究費補助金「ダニ媒介性細菌感染症の診断・治療体制構築とその基盤となる技術・情報の体系化に関する研究」）（平成 24 年度～平成 26 年度）

#### 研究概要

北海道・東北・新潟ブロックは多くの血清型によるつつが虫病や紅斑熱群リケッチア症など多様なリケッチア症が発生する高リスク地域である。今回、われわれはこれら様々なリケッチア症のうち、つつが虫の血清抗体価測定法について、ブロック内技術研修を行った。研修においては、実習を行うと共に詳細なマニュアルを作成することで、今後も想定される担当者の異動に配慮した診断体制の充実と構築を目指した。また、秋田県における事業として各種啓発活動を行った。当県は高病原性の Kato 型つつが虫病患者が現在も国内で唯一確認されており、今年度も前回（2008 年）の患者感染推定地と同一地点での患者発生が確認された。そのため、媒介種アカツツガムシの生息調査結果（既報）を元に感染推定地の自治体および関連機関へ今後の対策についての説明会を行った。さらに、早期治療が重要とされるつつが虫病について医療機関を対象とした啓発を行った。紅斑熱群リケッチア症については、福島県、新潟県での日本紅斑熱患者発生を受け、他地域での今後の患者発生に備えるため、検査体制構築のための準備を行った。

#### 結果

今回、福島県・青森県の各担当者が異動となったため再度の技術研修を実施したが、本ブロック内における検査体制ネットワークとサポート体制を保持する上で非常に有意義であったと思われる。さらに、秋田県においては啓発に関し充実した対応をとることができたが、今後も各地方の実態と実情に見合った検査体制の整備を進めるとともに、様々なリケッチア症の啓発を継続することが肝要と考えられた。

ムンプスウイルスの流行解析ならびに病原性発現の分子機構解析（厚生労働科学研究費補助金「ワクチンにより予防可能な疾患に対する予防接種の科学的根拠の確立及び対策の向上に関する研究」）

（平成 24 年度～平成 26 年度）

#### 研究概要

我が国では MMR ワクチンの中止以降ムンプ

スワクチンの接種率が低下し、おたふくかぜの流行はいまだに制御できていない。こうした現状を踏まえ、ムンプスワクチンの定期接種化の社会的ニーズが高まっている。一方、欧米先進国においては MMR ワクチン 2 回接種の普及にもかかわらず、おたふくかぜのたび重なるアウトブレイクが問題となっている。

今後ワクチンの導入によっておたふくかぜ流行の制御を確実なものにするためには、ムンプスウイルスの国内における流行動態の把握、抗原性の解析、病原性発現機構の解明など、いくつかの解決すべき課題がある。なかでも、国内での流行動態を網羅的・持続的な分子疫学データの集積が、ワクチン効果を的確に評価し行政上の施策に反映させる上で必須である。しかしながら、それを実現するための全国的なサーベイランスのネットワークシステムはいまだ無く、その構築は急務となっている。そこで、サーベイランスの基礎となるべき病院や地方衛生研究所と国立感染症研とを繋ぐネットワークを構築し、それによってムンプスウイルスの国内流行状況の概要を把握することを目指した。

## 結果

平成 26 年度に当センターにおいて検出されたムンプスウイルス 9 株について遺伝子解析を行ったところ、全て Gw 型であった。研究班に所属する 20 ヶ所地方衛生研究所全体で 27 株の解析を行ったが全て Gw 型であった。平成 25 年度は東日本は Ge 型、西日本は Gw 型と二分されていたが、平成 26 年度は Gw 型のみが検出された。

## 食品のウイルス検査における捕捉抗体の供給源に関する研究(大同生命厚生事業団「地域保健福祉研究助成」助成事業)

(平成 26 年度～平成 27 年度)

### 研究概要

食品検体に付着したウイルスの検出法として、申請者らによって開発されたパンソルビン・トラップ法は、黄色ブドウ球菌の表面にウイルス粒子と抗体の複合体を吸着させて回収することが基本原理である。捕捉抗体の供給源として、医療用ガンマグロブリン製剤が利用で

きるものの、医薬品であることから様々な制約がある。本研究では、制約のない捕捉抗体供給源について検討し、食品のウイルス検査の普及に役立てることを目的とする。

### 結果

ノロウイルス (NoV)、サポウイルス (SaV)、A 型肝炎ウイルス (HAV)、アデノウイルス 41 型 (AdV41) について食品洗滌液からの回収を試みたところ、食中毒の原因ウイルスとして最多の NoV-GII 4 に対して工業用ガンマグロブリンを用いた場合の回収率は 52.0% で、医療用ガンマグロブリン製剤を用いた場合は 46.8% であった。以下、NoV-GII 2 に対しては 38.6%/38.2% (工業用/医療用)、NoV-GII 6: 15.5%/13.3%、NoV-GI 4: 35.7%/37.6%、NoV-GI 6: 12.1%/6.1%、SaV-GI 1: 24.3%/23.7%、SaV-GII 3: 18.1%/17.0%、SaV-GIV 1: 29.7%/25.0%、SaV-GV 1: 29.5%/24.8%、HAV: 17.8%/13.1%、AdV41: 33.0%/32.7% であり、比較した全てにおいて両者は同等であった。

また、実際の汚染食品をモデルとした比較試験においても、工業用ガンマグロブリンを用いた系はポテトサラダで 40.6%、焼きそばで 33.5% と、医療用のそれ (ポテトサラダで 34.7%、焼きそばで 32.4%) と同等以上の回収率を示した。これらのことから、使用において特段の制約の無い工業用ガンマグロブリンを試薬としてパントラ法に導入することは大変合理的であり、汎用性を担保する意味でも積極的な活用と流通ルートの整備が望まれるものと考えられた。

## 乳児喘息、気管支喘息のウイルス・細菌感染状況の把握(市立秋田総合病院との共同研究)(平成 25 年度～平成 26 年度)

### 研究概要

乳児喘息や気管支喘息の患者から検出される病原体と、臨床経過や予後の関連を調査し、治療に役立てることを目的とする。臨床データ取得と細菌検査は市立秋田総合病院が行い、当センターではウイルスの検出を行った。

### 結果

基礎疾患に気管支喘息を持つ小児呼吸器感

感染症患者から採取した 91 検体（検体採取期間：平成 25 年 12 月～平成 27 年 2 月）を対象に、9 種の病原体について検出を試みた。結果、65 検体から何らかの病原体が検出され、検出率は 71.4%であった。本県の感染症発生動向調査における呼吸器由来検体からの病原体検出率（p.25～p.28 参照）と比較し、今回検討対象とした患者群からの検出率は高率であり、気管支喘息患者における易感染性が示唆された。検出された病原体の内訳は、RS ウイルス 39 検体、ライノウイルス 18 検体、ボカウイルス 5 検体、パラインフルエンザウイルス 5 検体（1 型 1 検体、2 型 3 検体、3 型 1 検体）、ヒトコロナウイルス 1 検体であった（重感染例を含む）。かねてから気管支喘息との関連が指摘されていた RS ウイルスおよびライノウイルスの検出が突出して多かったことから、改めて気管支喘息患者に対する両ウイルスの影響が確認された。

## 理化学班

### 食品中の残留農薬及び残留動物用医薬品の 一斉分析法に関する研究

（平成 24 年度～平成 26 年度）

#### 研究概要

食品中の残留農薬及び動物用医薬品の残留基準値による規制は、ポジティブリスト方式が採られており、当センターでは、現在、農薬、動物用医薬品を合わせ、約 240 項目を GC 及び LC-MS/MS を用いて分析している。

昨今の食品の多様化に伴い、使用される農薬等の種類が増え、加工食品の検査の必要性も高まっていることから、更なる検査項目の拡大と、多様な食品に対応できる迅速で高精度な分析法の開発が急がれる。

また、食品衛生法の規格基準への適合を判断するために用いる分析法については、厚生労働省が通知したガイドラインに従い、妥当性評価試験を行うことが必須となった。

本研究では、検査項目数の拡大を図り、加工食品にも応用できる迅速かつ高精度な分析法について検討する。また、検討した分析法の妥当性評価試験を行い、より信頼性の高い方法を確立する。

## 結果

農薬の一斉分析法について、クエッチャーズ法を基に新規分析法を検討した。GC 及び LC-MS/MS の各測定用の 2 法を構築し（以下 GC 法、LC 法とする）、GC 法 275 項目、LC 法 161 項目について、一律基準レベルの測定が可能となった。

新規分析法の妥当性評価試験を、厚生労働省通知のガイドラインに従い、8 食品（りんご、ほうれんそう、玄米、ねぎ、ばれいしょ、キャベツ、レモン、大豆）を対象に実施した。LC 法のねぎ（6 割）を除き、各法で約 8 割の項目が評価基準に適合した。

LC 法のねぎは、真度が評価基準を下回り、不適合となったものが多かった。対策として精製量を半量にし精製度を高めたところ、回収率が上がり改善することができた。

加工食品（冷凍餃子、冷凍グリーンピース、野菜ジュース）に GC 法及び LC 法を適用し、妥当性評価試験と同じ条件で添加回収試験を行った。回収率、精度ともに良好な結果が得られ、本法は加工食品にも有用であった。

動物用医薬品 115 項目の一斉分析法について検討し、アセトニトリルと 0.1%ギ酸水の混液による抽出及び除タンパク操作を行い、C18 固相カラムで脱脂した後、LC-MS/MS で測定する方法を構築した。7 食品（鶏肉、牛肉、豚肉、サケ、鶏卵、牛乳、はちみつ）を対象に妥当性評価試験を実施した結果、全ての食品で約 8 割以上が評価基準に適合した。

### 1,4-ジオキサン分解菌の培養と長期保存条件の検討（平成 25 年度～平成 27 年度）

#### 研究概要

廃水からの除去が難しい 1,4-ジオキサンについて、活性汚泥生物による円滑な処理方式の構築が必要とされている。本研究では、特異的な処理能力を有する 1,4-ジオキサン分解菌についての最適な培養条件の検討を行い、菌にとっての最適な温度や必要とする栄養源、阻害要因などを評価、考察し、実際の廃水処理施設の管理のための指標データとする。また、菌の長期保存方法を構築することにより種の維持を図り、



運転方法や環境の変化により菌が死滅する等の不測の事態に備える。

## 結果

生物処理槽から採取した活性汚泥について、冷凍による長期保存方法の検討を行った。冷凍前の試料調製は、活性汚泥試料 500 ml を遠心機により脱水後、0, 30, 50%グリセリン溶液で置換し、再度脱水することで行い、-85℃の冷凍庫に保存した。保存後の分解能試験は、活性汚泥試料を 1,4-ジオキサン 2 mg/L, 500 ml 溶液とし、好気条件下で攪拌、24 時間後の 1,4-ジオキサン濃度により減少速度を算出し、評価を行った。冷凍保存 6 ヶ月後の減少速度は、グリセリン濃度 0, 30, 50%すべてにおいて、冷凍前の減少速度とほぼ同じであり、容易に保存可能なことを示す結果となった。冷凍保存試験は継続中であり、より長期的な保存での活性維持を確認していく。

活性汚泥中の 1,4-ジオキサン分解菌を把握するために、次世代シーケンサーにより遺伝子解析を行った。その結果、1,4-ジオキサン分解菌として知られている *Mycobacterium* 属や *Afipia* 属等が検出された。今後も遺伝子解析を継続して行い、分解菌の単離・培養により性質を探る予定である。

## 環境保全班

### 玉川上流部における中和対策の効率化と pH を含む水質改善の促進

(平成 25 年度～平成 27 年度)

#### 研究概要

仙北市にある玉川温泉の源泉は、平成 14 年以降、急激な総酸度の上昇がみられた。この変化に対応するため、図の中和処理施設では石灰石を増量し、処理目標 pH である 3.5 以上を維持して中和処理しているものの、田沢湖の pH 低下が観測されている。この現象を受け、当センターでは、平成 20 から 21 年度の研究によって中和処理施設を経由しない強酸成分と中和処理施設で処理できない鉄、アルミニウムの成分が流下に伴って加水分解し、 $H^+$ を放出することにより、玉川流域及び田沢湖における pH 低下

を引き起こすことを実験的に明らかにしてきた。平成 22 年度からの研究では、それらの対策の手立てを検討し、未処理の強酸成分を処理するための中和技術に一定の目処が立った。その成果を受け、本研究課題では、pH 制御可能な中和により、上記未処理の強酸成分を効率良く弱める技術を確立する。この中和に伴い、田沢湖までの流域で生じている源泉中に含まれる鉄やアルミニウムの加水分解挙動を調査するとともに、現行中和による加水分解エリアの上流側への促進についても併せて検討する。

## 結果

平成 26 年度は、中和処理施設水が放流される玉川支流の渋黒川の合流する図の地点⑤において、MO 酸度 $\div 0$  (pH4.8 以上)を目指した実証試験を 10 月 2 日に実施し、図の地点①～⑧において調査を行った。上記未処理強酸成分 (pH 約 2, 流量 20,000 L/min) 及び中和処理水中の未処理酸性成分を中和するために、アルカリ材として乳化状にした酸化カルシウム (CaO) を④の上流部に 4 時間連続投入した (投入量 300 kg/h)。

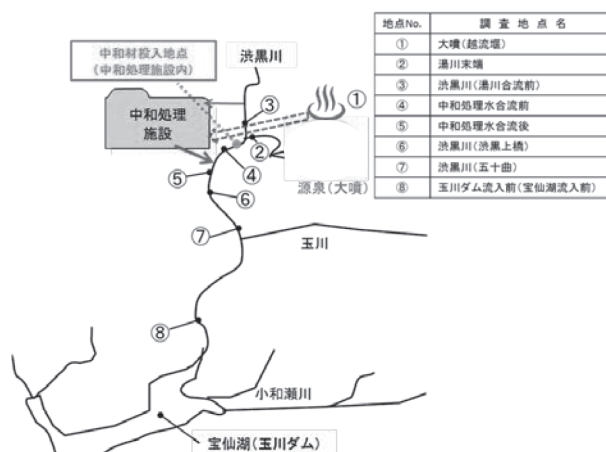


図 玉川上流部の調査地点

上記の条件で中和処理することによって、すべての調査地点で pH が改善していた。しかしながら、地点⑤では、試験前 pH 約 2.5 を pH 約 4.4 まで改善することはできたが、MO 酸度 $\div 0$ となる pH4.8 を達成することはできなかった。また、地点⑧における 3 時間後の pH は約 3.8 となり、平成 25 年度に 2 回実施した時の pH4.1 には到達しなかった。これらの原因は地点②を流れる湯川の総酸度が平成 25 年度と比較して約

3 倍程度増加していたことによると考えられる。

一方、表に示すように MO 酸度について平成 25 から 26 年度の結果を比較したところ、地点 ⑤及び⑧の両地点で H26 年の試験中の MO 酸度が低い値として観測されていることから、pH には反映しない酸性成分の減少が本試験の効果として確認された。

表 中和実証試験における MO 酸度の  
減少挙動

|          | MO 酸 度 (mg/L) |    |          |    |
|----------|---------------|----|----------|----|
|          | 平成 25 年度      |    | 平成 26 年度 |    |
| 調査年度     |               |    |          |    |
| 地点       | ⑤             | ⑧  | ⑤        | ⑧  |
| 試験前      | 155           | 26 | 180      | 26 |
| 試験中 3h 後 | 51            | 19 | 26       | 11 |

### Ⅲ 調查研究報告



サルモネラ菌の迅速な同定のための検出法及び血清型別法の確立（平成 25～26 年度）

## サルモネラの Multiplex PCR 法による血清型別法の確立

今野貴之 高橋志保 樫尾拓子 熊谷優子

平成 25 年度からの調査研究事業では、サルモネラによる食中毒、感染症発生の際の迅速な検査体制の構築を目的に、サルモネラの遺伝子解析法による検出法及び血清型別法の検討を行った。本研究により、血清型別については Multiplex PCR 法を用いて、主要な抗原の遺伝子の検出が可能となり、迅速かつ正確な血清型の同定が可能となった。

### 1. はじめに

サルモネラは、細菌性の食中毒及び感染性胃腸炎の主要な原因菌のひとつである。サルモネラには、菌体表面の O 抗原と 2 つのべん毛抗原の組み合わせ（O:H1:H2）によって 2,500 種類以上の血清型が存在する。中でも、ヒトに病原性を示す *S. enterica* の亜種 I には固有の名称が付与されている。そのため、サルモネラにおける血清型は、重要な疫学的指標となっており、食中毒対策や感染症のサーベイランスに役立っている。

当センターにおいても、食中毒の早期発見や感染症の発生動向を調査するため、サルモネラの血清型別による疫学解析を実施している。しかしながら、複数回の培養を伴う従来の血清型別法は時間を要し、近年、従来法では血清型を特定できない菌株も散見されるようになってきた。そこで、平成 25 年度からの調査研究事業では、より迅速かつ正確なサルモネラ検査体制の構築を目的に、遺伝子解析法によるサルモネラの血清型別法の検討を行ってきた。

本報では、サルモネラの血清型を決定している 3 つの抗原の合成に関与する遺伝子を対象にした Multiplex PCR 法による血清型別法の検討結果とその有用性について報告する。

### 2. 方法

#### 2.1 血清型別

O 群別は、血液寒天培地上の菌を掻き取り、スライドガラス上で各 O 群血清と混和し、特異的な凝集反応を確認した。

H 型別は、増菌した BHI 培養液に 3%ホルマリン加生理食塩水を加えた抗原液と各 H 型血清

を混和し、特異的な凝集反応を確認した。2 つ目の H 抗原を誘導するため、陽性となった H 型の血清を含む相誘導培地に菌を接種し、菌の運動性を確認した。相誘導培地上の菌を BHI 培地に接種し、同様にして 2 相目の H 抗原を特定した。

#### 2.2 PCR 法による抗原遺伝子の解析

菌株からの DNA 抽出は、アルカリ加熱抽出法により行った。

O 抗原の特定、Franklin ら<sup>1)</sup>及び Hong ら<sup>2)</sup>の報告をもとに、Ex-taq HS (Takara) を用いて行った。O9 群の特定には Hirose ら<sup>3)</sup>、O3 群の特定は、Herrera-León ら (2007)<sup>4)</sup>の primer も使用した。

H1 抗原の特定は、Hong ら<sup>2)</sup>、Herrera-León ら (2004)<sup>5)</sup>、Levy ら<sup>6)</sup>、今野<sup>7)</sup>の報告をもとに Ex-taq HS (Takara) を用いて行った。

H2 抗原の特定は、Hong ら<sup>2)</sup>及び Echeita ら<sup>8)</sup>の報告をもとに Ex-taq HS (Takara) を用いて行った。H2 の 1 complex 及び e,n complex の詳細解析は Echeita ら<sup>8)</sup>の報告をもとに Standard taq (グライナー) を用いて行った。

本研究で設計・使用したプライマーは、表 1 のとおり。

### 3. 結果と考察

#### 3.1 PCR 法による O 群別

Multiplex PCR 法により主要な O 抗原である O2 群、O3 群、O4 群、O7 群、O8 群、O9 群、O13 群について、同時検出が可能であった（図 1A）。ただし、O2 群と O9 群は共通の遺伝子を対象にしており、両者の分類には Hirose ら<sup>3)</sup>の O9 群を検出する PCR 法が有効と考えられた。

表1 使用した Primer の一覧

| Mix      | Target        | Primer Sequence (5' to 3')    | PCR conditions                                                                           | Fragment size (bp) | Reference     |
|----------|---------------|-------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|---------------|
| O群       | O2/O9         | F atgggagcgttgggttc           | 2 min at 94°C/ 30 cycles (30 sec at 94°C, 30 sec at 55°C, 1 min at 72°C)/ 2 min at 72°C  | 624                | 2)            |
|          |               | R cgctctccactaccaacttc        |                                                                                          |                    |               |
|          | O4            | F tgaagaatatgtaattgtcagtg     |                                                                                          | 789                | 1)            |
|          |               | R ttccattatctcttctctatcg      |                                                                                          |                    |               |
|          | O7            | F atttcccagttcggttg           |                                                                                          | 341                | 2)            |
|          |               | R ccataaccgacttccatttc        |                                                                                          |                    |               |
|          | O8            | F cgtctataaccgagccaac         |                                                                                          | 397                | 2)            |
|          |               | R ctgctttatcccttcaccg         |                                                                                          |                    |               |
|          | O3            | F gatagcaacgttcggaattc        |                                                                                          | 281                | 2)            |
|          |               | R cccaatagcaataaaccagc        |                                                                                          |                    |               |
| H1-1     | O13           | F ctgaaaaatggtttagttg         | 2 min at 94°C/ 30 cycles (30 sec at 94°C, 30 sec at 55°C, 1 min at 72°C)/ 5 min at 72°C  | 502                | 1)            |
|          |               | R accattggatactgtaactg        |                                                                                          |                    |               |
|          | a/b/d         | F actcaggtctcccgtaacgc        |                                                                                          | 423                | 6)            |
|          |               | R gagggcagcaccatcaagtgc       |                                                                                          |                    |               |
|          |               | R gcttcatacagaccatcttttagttg  |                                                                                          |                    |               |
|          |               | R ggctagtattgtccttatcgg       |                                                                                          |                    |               |
|          | e,h/i/l,v/z10 | F gcagatcaactctcagaccctggg    |                                                                                          | 200                | 5)            |
|          |               | R aacgaaagcgtagcagacaag       |                                                                                          |                    |               |
|          |               | R tagccatctttaccagttccc       |                                                                                          |                    |               |
|          |               | R cctgtcactttcgtggttat        |                                                                                          |                    |               |
|          |               | R gcaactggcgttactcaatctc      |                                                                                          |                    |               |
|          |               | F gtgatctgaaatccagcttcaag     |                                                                                          |                    |               |
| H1-2     | G             | R aagtttcgcactctcggttttg      | 2 min at 94°C/ 30 cycles (30 sec at 94°C, 30 sec at 55°C, 1 min at 72°C)/ 5 min at 72°C  | 532                | 5)            |
|          |               |                               |                                                                                          |                    |               |
|          | c/r/k/y       | F actcaggtctcccgtaacgc        |                                                                                          | 405                | same as a/b/d |
|          |               | R attctgttcgagtcggaat         |                                                                                          |                    |               |
|          |               | R gatcaccagtaatagcagg         |                                                                                          |                    |               |
|          |               | R gtcagtcgcacagcaagett        |                                                                                          |                    |               |
|          |               | R gagcatctttaacgctggca        |                                                                                          |                    |               |
|          |               |                               |                                                                                          |                    |               |
| H2c      | z6            | F agaaagcgtatgatgtagtaag      | 2 min at 94°C/ 30 cycles (30 sec at 94°C, 30 sec at 55°C, 1 min at 72°C)/ 5 min at 72°C  | 399                | This study    |
|          |               | R cagcaatttctgggtctgtaa       |                                                                                          |                    |               |
|          | 1-complex     | F agaaagcgtatgatgtgaaa        |                                                                                          | 294                | 2)            |
|          |               | R attgtgttttagttgcgcc         |                                                                                          |                    |               |
|          | l,w           | F gtggggcaacmctcaataactg      |                                                                                          | 241                | 8)            |
|          |               | R cctgccactttcgtggttgc        |                                                                                          |                    |               |
|          | e,n-complex   | F taactggcgatacattgactg       |                                                                                          | 152                | 2)            |
|          |               | R tagcaccgaatgatacagcc        |                                                                                          |                    |               |
| H2       | 1,2/5/6/7     | F cttatgccrtaaatgtactactctg   | 1 min at 94°C/ 30 cycles (30 sec at 94°C, 20 sec at 58°C, 1 min at 72°C)/ 5 min at 72°C  | 390                | 8)            |
|          |               | R ttgaccaaykymcgscatt         |                                                                                          |                    |               |
|          |               | R gggtacagvagccgtaccag        |                                                                                          |                    |               |
|          |               | R ctctgtacttctgttttggttga     |                                                                                          |                    |               |
|          | 1,6           | R taatcgccattttgtcgag         |                                                                                          | 191                | 8)            |
|          |               | F gtggggcaacmctcaataactg      |                                                                                          |                    |               |
|          | l,w           | R cctgccactttcgtggttgc        |                                                                                          | 241                | 8)            |
|          |               | F ggcaacccgacagtaactggcgatac  |                                                                                          |                    |               |
|          | e,n,x/e,n,z15 | R ccattcctaaaggatacggc        |                                                                                          | 55                 | 8)            |
|          |               | R atcaacggtaacttcattttg       |                                                                                          |                    |               |
| O9 group | O9/O9,46      | F gaggaagggaatgaagctttt       | 2 min at 94°C/ 25 cycles (30 sec at 94°C, 30 sec at 55°C, 30 sec at 72°C)/ 2 min at 72°C | 614                | 3)            |
|          |               | R tagcaaaactgtctccaccatac     |                                                                                          |                    |               |
|          | O9,46         | F gaktataaattgtyagatattcttctc |                                                                                          | 234                | This study    |
|          |               | R ctragctatggcaatcacgc        |                                                                                          |                    |               |
| O3 group | O3,10/O1,3,19 | F taaagtatatgggtctgatttaacc   | 2 min at 94°C/ 25 cycles (30 sec at 94°C, 30 sec at 55°C, 30 sec at 72°C)/ 2 min at 72°C | 345                | 4)            |
|          |               | R gttaaaaatgacagattgagcagag   |                                                                                          |                    |               |
|          | O3,10         | F agccacgaacattcctaactatg     |                                                                                          | 492                | This study    |
|          |               | R gttattaataatacactaatcgccac  |                                                                                          |                    |               |

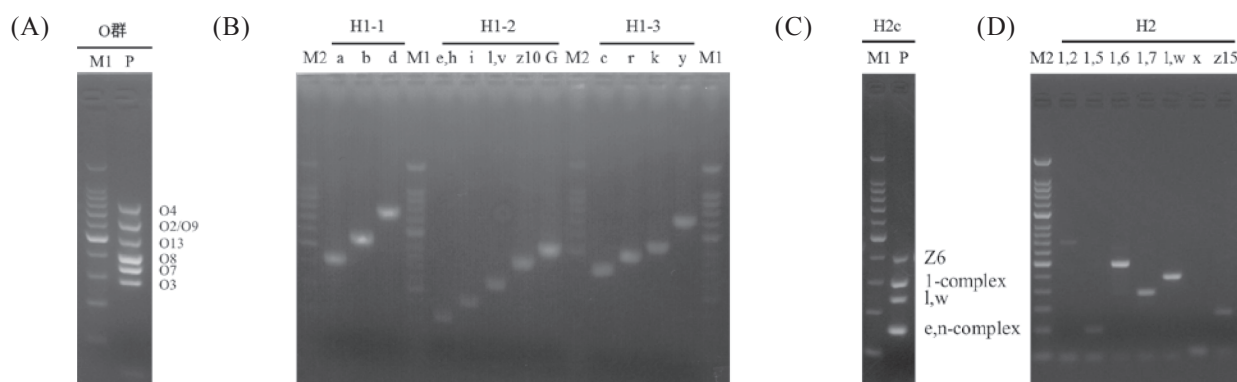


図1 Multiplex PCR 法によるサルモネラの血清型別法

(A) lane M1: 100 bp DNA size ladder, P: Typhimurium (O4), Enteritidis (O9), Agbeni (O13), Hadar (O8), Infantis (O7), Anatum (O3). (B) lane M2: 50 bp DNA size ladder, a: Narashino, b: Paratyphi B, d: Livingstone, e,h: Newport, i: Typhimurium, l,v: Litchfield, z10: Mbandaka, G: Enteritidis, c: Choleraesuis, r: Infantis, k: Thompson, y: Bareilly. (C) P: Weltevreden (z6), Typhimurium (1-complex), Livingstone (l,w), Braenderup (e,n-complex). (D) 1,2: Typhimurium, 1,5: Infantis, 1,6: Anatum, 1,7: Bredeney, l,w: Livingstone, x: Hadar, z15: Braenderup.

O9 群の中には、O9 と O9,46 及び O9,46,27 が存在する。O9 では O 抗原合成遺伝子群中の *H-rpt* 遺伝子が欠損していることから<sup>9)</sup>、この領域を対象に PCR 法を行い、両者の鑑別が可能であることを確認した (図 2)。

O3 群の中にも、O3,10 と O1,3,19 が存在する。本研究では、*wbaK* 遺伝子を対象にした PCR 法により両者の鑑別が可能であることを確認した (図 2)。

O 抗原が不明であった 4 株について PCR 法による O 群別を行ったところ、2 株で O 群が特定できた (表 2)。サルモネラでは培養条件等に

より R 型変異し、O 抗原の特異性を失うことがある<sup>10)</sup>。PCR 法により O 群別が可能であった 2 株のうち、Sa2730 は Abony (O4:b:e,n,x) の培養中に出現した R 型菌であるが、PCR 法では元の血清型と同一であることが確認できた。

サルモネラの血清型の中には、Typhi や Paratyphi A のようにチフス症やパラチフス症の原因となり重症化しやすい血清型も存在する。Typhi では、vi 抗原と呼ばれる莢膜様抗原の影響により O 群別が難しい場合もあり、PCR 法による O 群別は重要な血清型を迅速に推定するのに役立つと考えられる。

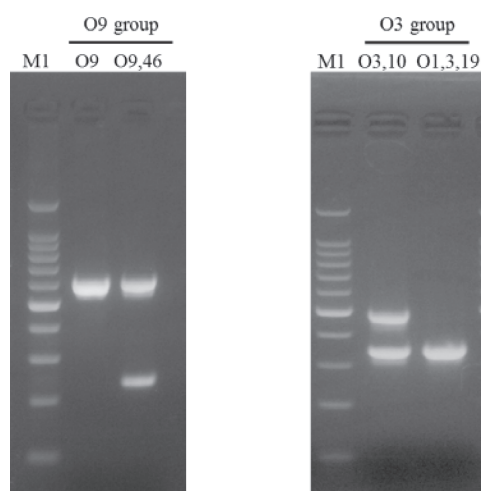


図2 O9 及び O3 group の鑑別

lane M1: 100 bp DNA size ladder, O9: Enteritidis, O9, 46: Hillington (神奈川県衛生研究所より分与), O3,10: Anatum, O1,3,19: Senftenberg.

### 3.2 PCR 法による H1, H2 型別

H1 抗原については、3 つの Multiplex PCR 法により 12 種類の型別が可能であった (図 1B)。ただし、G-complex については、PCR 法による亜型の分類は困難であった。

H2 抗原については、l, w, z6, 1-complex 及び e,n-complex の 4 種類に大別する Multiplex PCR 法に加え、1-complex の亜型 4 種類と e,n-complex の亜型 2 種類も型別可能な Multiplex PCR 法により、合計 8 種類の型別が可能であった (図 1C,D)。

サルモネラは、多くの場合 2 相性を示し、血清型の同定においても 2 種類の H 抗原を特定する必要がある。2 つの相の切り替えは、*fljAB* operon によって制御されており<sup>11)</sup>、培養した菌



では通常、どちらか一方が発現している。2 相目を検出するためには、1 相目で検出された H 抗原に対する抗血清を含む培地に一度接種し、2 相目の発現を誘導する必要がある。従って、2 つの H 抗原の型を決めるには合計 3 回の培養を行う必要があり、数日を要する。PCR 法では、H 抗原を発現させるための培養を行う必要がないため、迅速な同定が可能である。

秋田県でこれまでに分離された非定型的な血清型の PCR 法による型別結果を表 2 に示す。単相変異や H 抗原の発現が確認できない 7 株の内、5 株において PCR 法が有効であり、血清型を推定することが可能であった。我々は、平成 22 年に複数分離された O7:-:1,5 が PCR 法により血清型 Thompson と同定できたことを報告している<sup>7)</sup>。PCR 法による血清型別は、従来法で型別できない菌株についても有効であり、正確な食中毒及び感染症のサーベイランスへの有用性が示唆された。

表 2 非定型血清型の PCR 型別結果

| No.<br>Sa | Antigenic Formulas |    |       | PCR型別 |    |     | 血清型         |
|-----------|--------------------|----|-------|-------|----|-----|-------------|
|           | O群                 | H1 | H2    | O群    | H1 | H2  |             |
| 1440      | O4                 | i  | -     | NT    | NT | -   | 不明          |
| 1558      | -                  | r  | 1,5   | -     | NT | NT  | 不明          |
| 1584      | O13                | y  | -     | NT    | NT | -   | 不明          |
| 1600      | -                  | y  | 1,7   | O13   | NT | NT  | Yarrabah    |
| 1669      | O4                 | i  | -     | NT    | NT | 1,2 | Typhimurium |
| 1671      | O4                 | -  | -     | NT    | b  | 1,2 | Paratyphi B |
| 1684      | O7                 | k  | -     | NT    | NT | 1,5 | Thompson    |
| 1924      | O3,10              | lv | -     | NT    | NT | 1,6 | London      |
| 2165      | O7                 | c  | -     | NT    | NT | -   | 不明          |
| 2605      | -                  | k  | 1,5   | -     | NT | NT  | 不明          |
| 2730      | -                  | b  | e,n,x | O4    | NT | NT  | Abony       |

— : 検出せず, NT: 検査せず

## 参考文献

- Franklin K, Lingohr EJ, Yoshida C, Anjum M, Bodrossy L, Clark CG, Kropinski AM, Karmali MA: Rapid genosero typing tool for classification of *Salmonella* serovars, *J Clin Microbiol*, **49**, 2011, 2954–2965.
- Hong Y, Liu T, Lee MD, Hofacre CL, Maier M, White DG, Ayers S, Wang L, Berghaus R, Maurer JJ: Rapid screening of *Salmonella* enterica serovars Enteritidis, Hadar, Heidelberg and Typhimurium using a serologically-correlative allelotyping PCR targeting the O and H antigen alleles. *BMC Microbiol*, **8**, 2008, 178.
- Hirose K, Itoh K, Nakajima H, Kurazono T, Yamaguchi M, Moriya K, Ezaki T, Kawamura Y, Tamura K, Watanabe H: Selective amplification of *tyv* (*rfbE*), *prt* (*rfbS*), *viaB*, and *fliC* genes by multiplex PCR for identification of *Salmonella* enterica serovars Typhi and Paratyphi A, *J Clin Microbiol*, **40**, 2002, 633–636.
- Herrera-León S, Ramiro R, Arroyo M, Diez R, Usera MA, Echeita MA: Blind comparison of traditional serotyping with three multiplex PCRs for the identification of *Salmonella* serotypes, *Res Microbiol*, **158**, 2007, 122–127.
- Herrera-León S, McQuiston JR, Usera MA, Fields PI, Garaizar J, Echeita MA: Multiplex PCR for distinguishing the most common phase-1 flagellar antigens of *Salmonella* spp., *J Clin Microbiol*, **42**, 2004, 2581–2586.
- Levy H, Diallo S, Tennant SM, Livio S, Sow SO, Tapia M, Fields PI, Mikoleit M, Tamboura B, Kotloff KL, Lagos R, Nataro JP, Galen JE, Levine MM: PCR method to identify *Salmonella* enterica serovars Typhi, Paratyphi A, and Paratyphi B among *Salmonella* isolates from the blood of patients with clinical enteric fever, *J Clin Microbiol*, **46**, 2008, 1861–1866.
- 今野貴之: 秋田県で分離された非定型的な単相性サルモネラ菌の型別法の確立と発生動向の解明, 平成 24 年度大同生命厚生事業団「地域保健福祉研究助成」報告集, 2014, 20–24.
- Echeita MA, Herrera S, Garaizar J, Usera MA: Multiplex PCR-based detection and identification of the most common *Salmonella* second-phase flagellar antigens, *Res Microbiol*, **153**, 2002, 107–113.
- Curd H, Liu D, Reeves PR: Relationships among the O-antigen gene clusters of *Salmonella* enterica groups B, D1, D2, and D3, *J Bacteriol*, **180**, 1998, 1002–1007.
- 坂崎利一, 田村和満: 腸内細菌, 近代出版, 上巻, 1992, 18–58.
- Bonifield HR, Hughes KT: Flagellar phase variation in *Salmonella* enterica is mediated by a posttranscriptional control mechanism, *J Bacteriol*, **188**, 2006, 950–957.



## 感染症発生動向調査事業

## 小児呼吸器疾患由来検体からの病原体検出状況

柴田ちひろ 佐藤由衣子 佐藤寛子 秋野和華子 斎藤博之

感染症発生動向調査事業の一環として、当センターでは病原体定点に指定されている県内の小児科医療機関9施設から提供された検体について、病原体検索を実施している。平成26年度は小児呼吸器疾患患者から採取された咽頭拭い液等の呼吸器由来検体565検体中、重感染例を含め260検体から何らかの病原体が検出された（検出率46.0%）。検出数はライノウイルス（83検体）、RSウイルス（50検体）、パラインフルエンザウイルス（PIV）（44検体）の順に多かった。PIVは7月～9月に検出数の増加が認められ、同時期にはPIVを原因とした高齢者施設における集団感染も2事例報告された。インフルエンザウイルスは県内の患者発生がピークを向かえた1月～2月に採取された検体からはほとんど検出されず、医療現場における迅速診断キット使用による診断確定の有無によって、検体採取に偏りが生じている可能性が示唆された。RSウイルスについても同様に、好発年齢とされる2歳未満と他の年齢群との間で検出率に差は認められず、保険適用による迅速診断キット使用の影響がうかがわれた。このような状況を受け、平成28年4月に施行される改正感染症法では、検体数や検体提供頻度等が厳密に規定されることとなった。これにより、より現状を反映した病原体サーベイランスが可能となることから、今後も医療機関等との連携の下、事業推進に努めていきたい。

## 1. はじめに

国内で発生・流行している感染症の把握を目的に、昭和56年7月より感染症発生動向調査が実施されている。現在は「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律」（平成10年10月成立、平成11年4月施行）に基づき、感染症の発生情報を正確に把握・分析し、的確に情報提供することで感染症のまん延を防止するため、国・地方・医療機関の連携の下、全国的施策として実施されている<sup>1)</sup>。

この事業の一環として、実際にどのような病原体が流行に関与しているのかを探るため、当センターでは病原体定点医療機関に指定されている県内の小児科医療機関9施設から提供された検体について、病原体の検索を実施している。提供される検体は呼吸器疾患を由来としたものが多く、検出される病原体には季節や患者の年齢等によって特徴がある。今回、平成26年度の実施結果についてまとめたので報告する。

## 2. 方法

## 2.1 対象検体

平成26年4月～平成27年3月に病原体定点医療機関から提供された咽頭拭い液等の呼吸器

由来検体のうち、採取時年齢が16歳以上あるいは呼吸器症状を有していない患者由来の検体を除外した565検体を対象とした。

## 2.2 検査

## 2.2.1 対象病原体

検出対象とした病原体は次の10種である。インフルエンザウイルス（Flu）、RSウイルス、ライノウイルス、パラインフルエンザウイルス（PIV）、ヒトボカウイルス、ヒトメタニューモウイルス（hMPV）、アデノウイルス、エンテロウイルス、ヒトコロナウイルス（HCoV）、肺炎マイコプラズマ

## 2.2.2 検査法

MagNA Pure LC 2.0（Roche Diagnostics）を用いて核酸抽出を行い、SLEK 培地に溶出した検体200 μL から50 μL の核酸抽出液を得た。Flu<sup>2)</sup>、RSウイルス<sup>3)</sup>、ライノウイルス<sup>4)</sup>、PIV<sup>3)</sup>、hMPV<sup>5)</sup>、エンテロウイルス<sup>6)</sup>、HCoV<sup>7)</sup>は、LightCycler480 RNA Master Hydrolysis Probes（Roche Diagnostics）と各文献に記載のあるプライマー・プローブセットによるreal-time PCRを行った。同様に、ヒトボカウイルス<sup>8)</sup>とマイ

コプラズマ・ニューモニエ<sup>9)</sup>は、LightCycler480 Probes Master (Roche Diagnostics) と文献記載のプライマー・プローブセットを用いた real-time PCR を行った。アデノウイルス<sup>10)</sup>は、文献記載のプライマーを用いた nested PCR とアガロースゲル電気泳動を行った。

### 3. 結果と考察

#### 3.1 対象検体内訳

検体が採取された患者の内訳について、診断名を表 1、年齢を図 1 に示した。肺炎等の下気道炎が最も多く、6 歳以下の乳幼児が 91.0% (514/565) と大半を占めていた。

表1 診断名内訳

| 上気道炎 | 下気道炎 | 気管支喘息 | その他※ | 計   |
|------|------|-------|------|-----|
| 112  | 335  | 23    | 95   | 565 |

※その他；呼吸器疾患以外の診断名であるが、呼吸器症状を有する（熱性けいれん、川崎病、ほか）。

#### 3.2 病原体検出状況

病原体検出結果を表 2 に示す。重感染例を含め、565 検体中 260 検体から何らかの病原体が検出され（検出率 46.0%）、ライノウイルス（83 検体）、RS ウイルス（50 検体）、PIV（44 検体）の順に検出数が多かった。

表 2 病原体検出結果

| Flu | RS<br>ウイルス | ライノ<br>ウイルス | PIV | ヒトボカ<br>ウイルス | hMPV | アデノ<br>ウイルス | エンテロ<br>ウイルス | HCoV | 肺炎マイコ<br>プラズマ | 不検出 |
|-----|------------|-------------|-----|--------------|------|-------------|--------------|------|---------------|-----|
| 18  | 50         | 83          | 44  | 42           | 19   | 19          | 22           | 6    | 1             | 305 |

表 3 検体採取月別検出結果

|     | Flu | RS<br>ウイルス | ライノ<br>ウイルス | PIV | ヒトボカ<br>ウイルス | hMPV | アデノ<br>ウイルス | エンテロ<br>ウイルス | HCoV | 肺炎マイコ<br>プラズマ | 不検出 |
|-----|-----|------------|-------------|-----|--------------|------|-------------|--------------|------|---------------|-----|
| 4月  | 6   | 5          | 6           | 1   | 4            | 2    | 2           | 0            | 3    | 1             | 29  |
| 5月  | 1   | 2          | 12          | 1   | 5            | 0    | 2           | 0            | 1    | 0             | 34  |
| 6月  | 0   | 1          | 5           | 4   | 10           | 0    | 2           | 0            | 0    | 0             | 27  |
| 7月  | 0   | 0          | 8           | 9   | 12           | 1    | 2           | 3            | 0    | 0             | 48  |
| 8月  | 0   | 3          | 6           | 13  | 7            | 1    | 3           | 12           | 0    | 0             | 22  |
| 9月  | 0   | 6          | 10          | 12  | 0            | 3    | 0           | 2            | 0    | 0             | 22  |
| 10月 | 0   | 8          | 5           | 1   | 1            | 2    | 1           | 1            | 0    | 0             | 27  |
| 11月 | 1   | 9          | 11          | 1   | 0            | 2    | 0           | 3            | 0    | 0             | 18  |
| 12月 | 7   | 14         | 15          | 1   | 1            | 4    | 6           | 1            | 1    | 0             | 24  |
| 1月  | 1   | 1          | 1           | 1   | 2            | 1    | 0           | 0            | 0    | 0             | 23  |
| 2月  | 0   | 0          | 2           | 0   | 0            | 0    | 0           | 0            | 1    | 0             | 20  |
| 3月  | 2   | 1          | 2           | 0   | 0            | 3    | 1           | 0            | 0    | 0             | 11  |
| 計   | 18  | 50         | 83          | 44  | 42           | 19   | 19          | 22           | 6    | 1             | 305 |

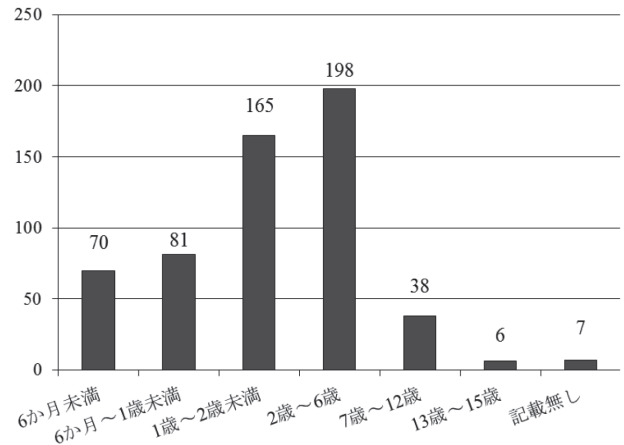


図 1 検体採取患者の年齢区分

#### 3.2.1 季節的特徴

表 3 に病原体検出結果を検体採取月ごとに示した。Flu は流行期である 4 月～5 月および 11 月～3 月に AH1pdm09 型が 1 検体、AH3 型が 10 検体、B 型が 7 検体の計 18 検体から検出された。2014/2015 シーズンを含め、例年県内におけるインフルエンザ患者の発生のピークは 1 月～2 月に認められるが、この時期に採取された検体からはほとんど検出されておらず、2013/2014 シーズン終盤の 4 月と、2014/2015 シーズンの流行が開始した 12 月に検出が集中していた。これは迅速診断キットの普及により、医療現場で容易にインフルエンザとの診断がつくようになったことから、流行期にはすでに診断が確定した患者からの検体採取が抑制され、他の感染症

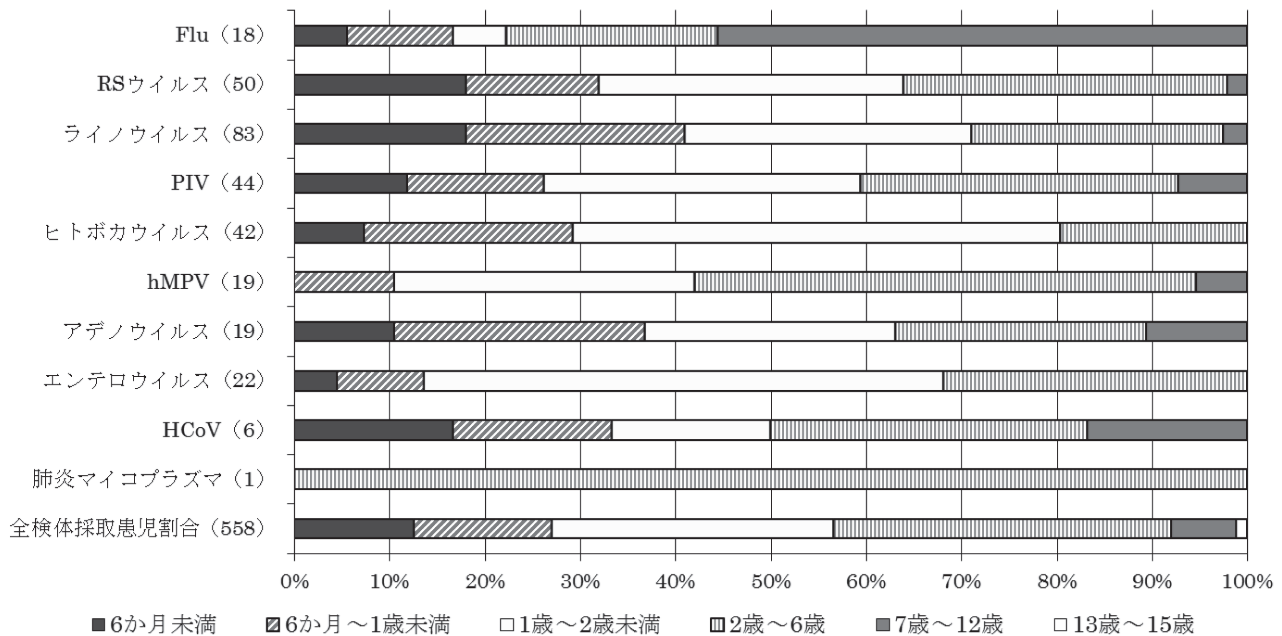


図2 検出病原体別患者年齢割合

患者からの検体採取が優先されている結果と推察された。AH1pdm09 型については薬剤耐性獲得に関わる遺伝子変異は確認されなかった。

エンテロウイルスは7月～12月にかけて22検体から検出された。内訳はA群コクサッキーウイルス2型(CA2)が3検体、CA4が11検体、CA5が1検体、CA10が3検体、B群コクサッキーウイルス5型(CB5)が1検体、エコーウイルス3型が2検体、エコーウイルス11型が1検体であった。エンテロウイルスは夏の代表的な感染症である手足口病やヘルパンギーナを起こす病原体であるが、通常これらの疾患はエンテロウイルスの中でもCAが主な原因となる<sup>11), 12)</sup>。今回検出された22検体についても、本来の流行期である7月～10月に採取された18検体からは全てCA、11月～12月に採取された4検体からはCB5やエコーウイルスが検出されており、型により検出時期に違いが見られた。

その他の病原体は年間を通じて検出されたが、RSウイルスは10月～12月、ヒトボカウイルスは6月～7月、PIVは7月～9月に検出数の増加が認められた。通常PIVは型による違いはあるものの、初夏あるいは秋に流行しやすいとされている<sup>13)</sup>。しかし、2014年は例年と比較して夏季の気温上昇が穏やかで秋の訪れが早かったことなどが影響し、流行期にずれが生じていたと考えられた。また、本調査は小児を対象と

してはいるが、得られる結果には秋田県内における病原体の流行状況が反映される。そのため、この時期には広く県内でPIVが流行していた状況がうかがわれ、小児以外の年齢層でも感染の機会が高まっていたと推察される。実際、9月にPIVを原因とした高齢者施設における集団感染が2事例報告された。

### 3.2.2 年齢的特徴

検出された病原体ごとに採取した患者の年齢割合を図2に示した(年齢未記載の7検体を除く)。Fluは半数以上が7歳以上の検出であったのに対し、ヒトボカウイルスは全て6歳以下の乳幼児から検出された。ヒトボカウイルスは発見から10年程度と比較的新しく<sup>14)</sup>、その疫学情報等が現在集積されつつあるウイルスであるが、本結果では2歳未満がおよそ80%を占めていたことから、この年齢層が好発年齢と推測された。

RSウイルスは乳児の半数以上が1歳までに、ほぼ全ての小児が2歳までに感染を受けるとされているが、検出された年齢区分に特徴的な傾向は認められなかった。1歳未満の乳児については保険適用による迅速診断キットの使用が認められていることから、Flu同様、診断確定の有無により他の年齢群との間で検体採取に偏りが生じている可能性が示唆された。

#### 4. まとめ

今回、平成 26 年度に病原体定点観測事業として実施した呼吸器感染症検体からの病原体検出状況について報告したが、本結果には実際に秋田県内でどのような病原体が流行していたかが反映されている。対象とする病原体に免疫力の低下した高齢者等が感染した場合、重症化や集団感染へ拡大する可能性もあるため、本事業から得られる結果は感染症対策全体に資する有益な情報といえる。しかし、実際の流行状況をより確実に結果へと反映させるためには、流行状況に即した検体採取のバランスが鍵となるが、Flu や RS ウイルスのように、医療現場における診断確定の有無が検体採取に影響を及ぼしている状況が、本県だけではなく全国的にも問題となっている。この状況を打開するため、検体数や検体提出頻度等をより厳格に規定化する改正感染症法が平成 28 年 4 月に施行される<sup>15)</sup>。これにより、より現状を反映した病原体サーベイランスが可能となることから、今後も医療機関等関係機関との連携の下、円滑な事業の推進に努めていきたい。

#### 参考文献

- 1) 厚生省保健医療局長通知健医発第 458 号：感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律の施行に伴う感染症発生動向調査事業の施行について、平成 11 年 3 月 19 日。
- 2) 国立感染症研究所：インフルエンザ診断マニュアル（第 3 版）、平成 26 年 9 月、24-28。
- 3) Templeton K.E., Scheltinga S.A., Beersma M.F.C., et. al.: Rapid and Sensitive Method Using Multiplex Real-Time PCR for Diagnosis of Infections by Influenza A and Influenza B Viruses, Respiratory Syncytial Virus, and Parainfluenza Viruses 1, 2, 3, and 4, J. Clin. Microbiol., **42**, 4, 2004, 1564-1569.
- 4) Lu X., Holloway B., Dare R.K., et. al.: Real-Time Reverse Transcription-PCR Assay for Comprehensive Detection of Human Rhinoviruses, J. Clin. Microbiol., **46**, 2, 2008, 533-539.
- 5) Bouscambert-Duchamp M., Lina B. Trompette A., et. al.: Detection of Human Metapneumovirus RNA Sequences in Nasopharyngeal Aspirates of Young French Children with Acute Bronchiolitis by Real-Time Reverse Transcriptase PCR and Phylogenetic Analysis, J. Clin. Microbiol., **43**, 3, 2005, 1411-1414.
- 6) Nijhuis M., Maarseveen N., Schuurman R., et. al.: Rapid and Sensitive Routine Detection of All Members of the Genus Enterovirus in Different Clinical Specimens by Real-Time PCR, J. Clin. Microbiol., **40**, 10, 2002, 3666-3670.
- 7) Esposito S., Bosis S., Niesters H.G., et. al.: Impact of Human Coronavirus Infections in Otherwise Healthy Children Who Attended an Emergency Department, J. Med. Virol., **78**, 2006, 1609-1615.
- 8) Lu X., Chittaganpitch M., Olsen S.J., et. al.: Real-Time PCR Assays for Detection of Bocavirus in Human Specimens, J. Clin. Microbiol., **44**, 9, 2006, 3231-3235.
- 9) Winchell J.M., Thurman K.A., Mitchell S.L., et. al.: Evaluation of Three Real-Time PCR Assays for Detection of *Mycoplasma pneumoniae* in an Outbreak Investigation. J. Clin. Microbiol., **46**, 2008, 9, 3116-3118.
- 10) Saito-Inagawa W., Oshima A., Aoki K., et. al.: Rapid Diagnosis of Adenoviral Conjunctivitis by PCR and Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis, J. Clin. Microbiol., **34**, 9, 1996, 2113-2116.
- 11) 国立感染症研究所感染症疫学センター：病原微生物検出情報，**26**，9，2006，235-236。
- 12) 国立感染症研究所感染症疫学センター：病原微生物検出情報，**33**，3，2012，55-56。
- 13) 改田 厚，久保英幸，入谷展弘，他：ヒトパラインフルエンザウイルス感染症，臨床とウイルス，**40**，3，2012，142-149。
- 14) Allander T., Tammi M.T., Eriksson M., et al.: Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples, Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, **102**, 36, 2005, 12891-12896.
- 15) 厚生労働省健康局長通知健発第 0928 第 1 号：感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律施行規則の一部を改正する省令の公布及び一部施行について（通知），平成 27 年 9 月 28 日。



厚生労働科学研究費補助金 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業 (H24～26 年度)

## 強毒型および弱毒型 *Orientia tsutsugamushi* の マウス血中における推移

佐藤寛子 柴田ちひろ 秋野和華子 佐藤了悦 斎藤博之 安部真理子 齊藤志保子

つつが虫病の病原体 *Orientia tsutsugamushi* (Ot) の主要 6 型のうち、Shimokoshi 型は弱毒性とされるが、秋田県で 1992 年以降に発生した同型つつが虫病患者 16 例は、全てが軽症とは言えなかった。そこで、16 例のうち急性期の検査所見が高度異常値を示した患者血液から分離された Shimokoshi 型 Matsui 株 (AB742542) について、ICR マウス (クローズドコロニー、免疫正常モデル) および ICR ノードマウス (免疫不全モデル) に対する致死毒性の確認と共にそれぞれの血中 Ot コピー数を経時的に定量した。比較対象には Kato 型 Kakuma-2 株 (強毒型株; AB701788) を使用した。強毒型 Kakuma-2 株 (以下、強毒型株) を接種した ICR マウスおよび ICR ノードマウスはそれぞれ接種後 10～11 日目に死亡した。Matsui 株では、ICR マウスは生存したが、ICR ノードマウスは 16～19 日目に死亡した。マウス血中の Ot 濃度は、強毒型株接種系が Matsui 株接種系よりも増加が顕著であった。さらに ICR ノードマウス死亡時の血中濃度も強毒型株接種系の方が高い傾向にあった。ヒトに対して比較的強い病原性を示した Shimokoshi 型 Matsui 株は ICR マウスに対しては弱毒性であることが確認された。

### 1. 緒言

つつが虫病の病原体 *Orientia tsutsugamushi* (Ot) は、マウスに対する致死性をモデルとしてヒトに対する病原性の強弱が表現されているが、これは血清型でおよそが判別されている<sup>1)</sup>。日本国内で発生するつつが虫病患者から分離される Ot の血清型は主に 6 種で、このうち Shimokoshi 型は弱毒性とされている<sup>1,2)</sup>。しかし、この型の感染症例に関する報告は少なく、分離された株は 2014 年現在、国内で 2 株のみである<sup>3)</sup>。本県ではこの型の患者発生が 1992 年以降 2013 年までに 15 例<sup>3)</sup>、2014 年の 1 例を含めると国内最多の 16 例が確認されている。この中には DIC や脳炎等の併発例はないものの、全例が軽症とは言えず、検査所見からは CRP 値 10.0 mg 以上、AST と ALT が 101 IU/L 以上など、重症とみなし得る数値を示す例も含まれていた<sup>3)</sup>。国内分離例として 2 株目の Shimokoshi 型株である Matsui 株は、重症例から分離された。同じ血清型でも株によっては毒性に差があるといわれていることから、このヒトに対して弱毒ではなかった株のマウスに対する致死毒性の確認をすると共にマウスの血中 Ot コピー数を経時的に定量した。

### 2. 方法

マウス接種には Shimokoshi 型 Matsui 株 (弱毒型: 重症例の患者由来) を使用した。対象として Kato 型 Kakuma-2 株 (強毒型: 野鼠由来) を用いた。両株は、L929 細胞で培養後 DNA 抽出し、real-time PCR<sup>4)</sup>によって Ot コピー数を定量した。その後各株を PBS で  $1.0 \times 10^7$  copies/ml (E7) および  $1.0 \times 10^5$  copies/ml (E5) に希釈調製した Ot 溶液を作成した。各株各濃度の Ot 溶液 100  $\mu$ l を ICR マウスと ICR ノードマウスそれぞれ 2 頭の腹腔に接種した。その後、マウスの外見・行動観察と尾静脈からの採血を 8 日目までは 1 日 1 回行い、9 日目以降は 1～2 日毎に行った。マウス血液の Ot コピー数は、株の場合と同様に DNA 抽出後に定量し、各群の血液 1 ml 当たりに換算した 2 匹の平均値を求めた。

### 3. 結果

#### 3.1 ICR マウスの血中 Ot 濃度 (図 1)

ICR マウスにおける強毒型株接種系で初めて Ot が検出されたのは、E7 を接種した群 (E7 群) が 2 日目、E5 を接種した群 (E5 群) が 4 日目で、その後コピー数は増加し、10 日目に E7 群が、11 日目に E5 群のマウスが衰弱不動となり死亡したため観察を終了した。この時点で E7 群の

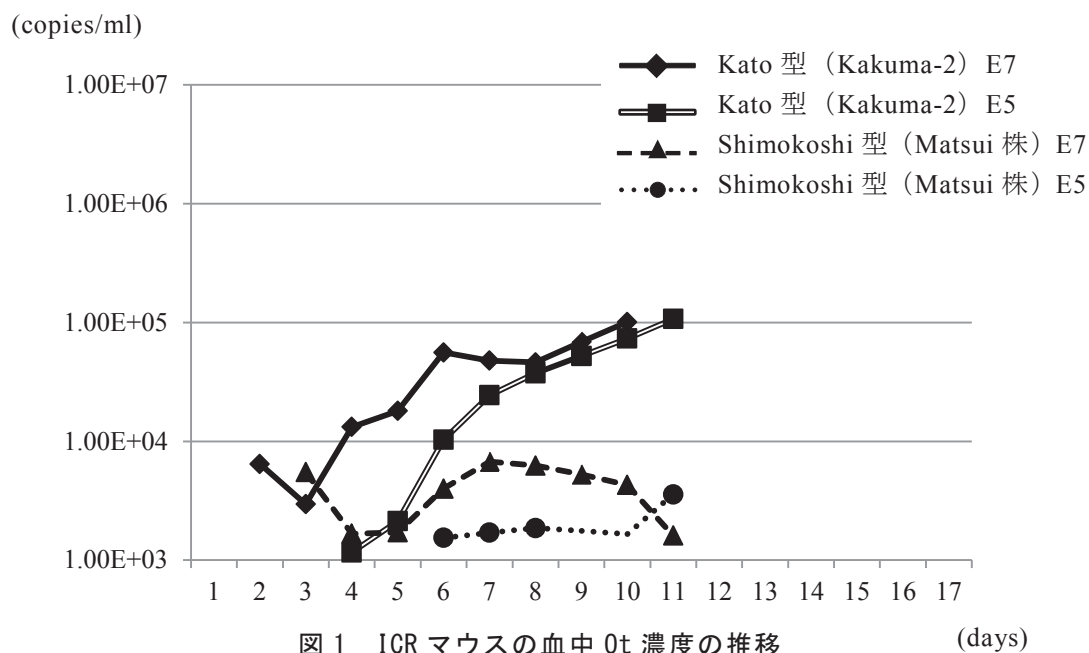


図1 ICR マウスの血中 Ot 濃度の推移 (days)

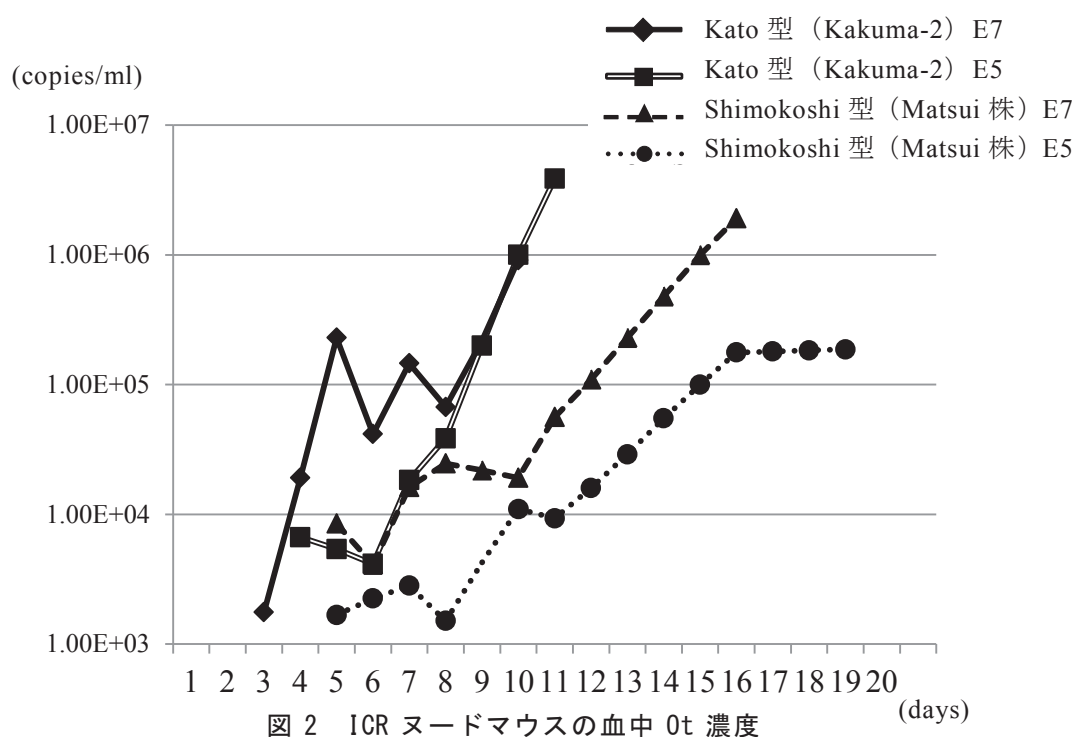


図2 ICR ノードマウスの血中 Ot 濃度 (days)

血中平均 Ot コピー数は  $1.0 \times 10^5$  copies/ml, E5 群は  $1.1 \times 10^5$  copies/ml であった。

一方, Matsui 株接種系で初めて Ot が検出されたのは, E7 群が接種後 3 日目, E5 群が 6 日目であった。その後, 血中コピー数に顕著な増加はなく, E7 群は 7 日目, E5 群は 11 日目 (平均  $7.1 \times 10^3$  copies/ml) を最高値とし, それぞれ 12 日目に降は不検出となった。マウスはその後 1 ヶ月間,

外見と行動に大きな変化がないまま生存した。

### 3.2 ICR ノードマウスの血中 Ot 濃度 (図 2)

ICR ノードマウスで初めて Ot が検出されたのは, 強毒株では E7 群が 3 日目, E5 群が 4 日目で, その後コピー数は ICR マウスよりも顕著な増加を示し, 10 日目に E7 群が, 11 日目に E5 群が死亡した。この時点で血中平均 Ot コピー数

はそれぞれ  $1.0 \times 10^6$  copies/ml,  $2.4 \times 10^6$  copies/ml と同株を接種した ICR マウス死亡時の 10 倍量を示した。Matsui 株において、Ot の検出が初めて確認されたのは両群共に 5 日目で、その後、コピー数は著しく増加し、E7 群は 16 日目、E5 群は 19 日目に死亡した。この時点の血中平均 Ot コピー数はそれぞれ  $1.9 \times 10^6$  copies/ml,  $1.9 \times 10^5$  copies/ml と、同株を接種した ICR マウスにおける最高値の 1000 倍を示した。

#### 4. 考察

臨床検査値から比較的重症と見なし得た患者血液由来の Shimokoshi 型 Matsui 株のマウスに対する致死毒性を確認したところ、ICR マウスにおいて、Matsui 株は強毒性の Kato 型 Kakuma-2 株よりも体内での増殖が非常に緩慢であり、致死性は確認されなかった。これにより、従来の“Shimokoshi 型→弱毒性”というセオリーはこの株においても同様であった。

これまでのマウスを用いた Ot の毒性に関する研究において、マクロファージ内での増殖性の可否や感染初期に TNF 産生の有無が Ot 増殖抑制に関連性することが指摘されている<sup>5,6)</sup>。また、ヒトの急性期血液を調べると、サイトカインが高値を示しており、免疫応答の過剰反応が重症化に関連すると指摘されている<sup>7)</sup>。これらのことは、Ot のヒトに対する病原性は Ot そのものの増殖性の強弱に加えて、宿主側の免疫応答が病原性に影響を与えていることを示している。ヒトの免疫状態は個々様々であるため、本県におけるわずか 16 症例の臨床症状にも多様性が見られたものと思われる。今後より多くの症例が集積されることで、ヒトに対する病原性が明確になるとと思われるが、Shimokoshi 型は発生が稀であるという通説から、ほとんどの検査機関が検査対象としていない。そのため、2014 年現在、国内で Shimokoshi 型の患者発生が確認されているのは、この型をルーチン検査に加えている 5 県（新潟、山形、福島、福井および秋田県）となっており<sup>2,3,8-10)</sup>、これからの国内における検査体制の整備に期待したい。

また、前述のとおり病原性はヒト側の応答も大きく関与することから、つつが虫病は早期に MINO による治療を開始することが最善策であることに変わりはない。今後も県民への啓発を強化

すると共に、分かり易い十分な情報提供を継続し、早期受診を促すことが必要と考えられた。

#### 参考文献

- 1) Norio OHASHI, et al.: Demonstration of antigenic and genotypic variation in *Orientia tsutsugamushi* which were isolated in Japan, and their classification into type and subtype, *Microbiol. Immunol.*, **40(9)**, 1996, 627-638.
- 2) Akira TAMURA, et al.: Isolation of *Rickettsia tsutsugamushi* antigenically different from Kato, Karp and Gilliam strains from patients, *Microbiol. Immunol.*, **28(8)**, 1984, 873-882.
- 3) 佐藤寛子, 他: 秋田県における Shimokoshi 型つつが虫病の遡及的疫学調査, *衛生動物*, vol. **65**, 2014, No.4, 183-188.
- 4) 川森文彦, 他: リケッチア感染症の迅速診断法に関する研究, 静岡県環境衛生科学研究所報告, No.5, 2011, 37-40.
- 5) 多村憲: 恙虫病病原体 *Orientia tsutsugamushi* の微生物学, *日本細菌学雑誌*, **54 (4)**, 1999, 815-832.
- 6) 福原正博: *Orientia tsutsugamushi* の毒力決定因子および感染宿主応答に関する研究, 千葉大学, 博士論文, **58**, 2006. p24-25.  
<http://mitizane.ll.chiba-u.jp/metadb/up/assist1/Y2006-16.pdf>
- 7) 岩崎博道: ツツガムシ病における重症化とサイトカイン産生制御: 厚生労働省 (編): 厚生労働科学研究補助金 (新興・再興感染症事業) リケッチア感染症の国内実態調査及び早期診断体制の確立による早期警鐘システムの構築, 厚生労働省, 2007, 134-144.
- 8) 大谷勝美, 他: 山形県で発生した Shimokoshi 型リケッチア感染によるつつが虫病の一例, *衛生動物*, **60**, 2009, 317-321.
- 9) 竹之下秀雄, 他 Shimokoshi 型 *Orientia tsutsugamushi* 感染によるツツガムシ病の 1 例. *皮膚臨床*, **55**, 2013, 1181-1185.
- 10) Satoshi IKEGAYA, et al.: Tsutsugamushi disease caused by Shimokoshi-Type *Orientia tsutsugamushi*: The first report in western Japan. *Am. J. Trop. Med.* **88**, 2013, 1217-1219.

## 感染症発生動向調査事業

## 感染症発生動向調査における胃腸炎ウイルスの検出状況について

秋野和華子 佐藤由衣子 柴田ちひろ 佐藤寛子 斎藤博之

感染症発生動向調査において平成26年度に小児科から採取された糞便検体225検体および感染性胃腸炎疑いで依頼があった行政検査35事例（食中毒8事例、集団感染27事例）について、検出されたウイルスの種類や検出頻度等の集計解析を行った。感染症発生動向調査における胃腸炎ウイルスの検出状況は、ウイルスが検出された57検体のうち、ノロウイルスGII型が27例（47.4%）と最も多く、検出のピークは1月であった。次いで検出が多く認められたサポウイルスは14例（24.6%）で、10～12月に多発していた。食中毒事例からの胃腸炎ウイルスの検出状況は、8事例全てからノロウイルスGII型が検出された。そのうち3事例はGII型とGI型の混合感染であり、この3事例はカキが感染源と確認された事例であった。食中毒8事例中7事例が1月、2月に発生していた。集団感染事例では、27事例中22事例からノロウイルスGII型、2事例からノロウイルスGI型が検出された。検出時期は4～6月、11～2月であった。サポウイルスは10～12月の間に3事例から検出され、発生動向調査による検出状況と同様の傾向が認められた。また、発生動向調査および食中毒等集団事例より、近年秋田県において検出されていない遺伝子型であるノロウイルスGII.17型が検出された。今回の結果から、食中毒等集団事例の発生は、市中における胃腸炎ウイルスの侵淫状態を反映しているものと考えられ、その状況を把握する感染症発生動向調査の結果と関連するものと思われた。

## 1. はじめに

我が国における感染症サーベイランスは、感染症法に基づく感染症発生動向調査事業として、感染症の予防とまん延防止を目的に全国規模で実施されている。当センターでは事業の一環として、病原体定点医療機関より提供された検体からの病原体検出を継続的に行っている。中でも、胃腸炎ウイルスは食中毒や集団感染事例の原因となることから、地域における流行状況の把握は重要と考えられる。今回は、平成26年度に採取された感染性胃腸炎患者の糞便検体に含まれるウイルスの種類や検出頻度について集計解析を行ったので報告する。

## 2. 方法

## 2.1 対象

病原体定点医療機関において平成26年度に小児科から採取された検体1047検体のうち糞便検体225検体および平成26年度に依頼があった行政検査35事例（食中毒8事例：照会事例1事例含む、集団感染症27事例：照会事例1事例含む）を集計対象とした。

## 2.2 対象病原体

感染性胃腸炎の原因となるノロウイルス、サポウイルス、ロタウイルス（A群、C群）、腸管アデノウイルスを対象とした。

## 2.3 検査法

検体からMagNA Pure LC2.0（ロシュ）によりDNAおよびRNAを抽出した。その後、real-time PCR<sup>1-3)</sup>およびconventional nested-PCR<sup>4)</sup>によりウイルスの検出を試みた。検出されたウイルスについては、ダイレクトシークエンスにより塩基配列を決定し、遺伝子型別を行った。

## 3. 結果と考察

## 3.1 感染症発生動向調査における胃腸炎ウイルスの検出状況

提供された糞便検体225検体中57検体（25.3%）からウイルスが検出された。感染症発生動向調査における胃腸炎ウイルスの月別検出状況について、秋田県の状況を表1に、全国の状況を表2に示す。

## 3.1.1 検出胃腸炎ウイルスの内訳

検出された胃腸炎ウイルスの内訳は、ノロイ



表 1 感染症発生動向調査における胃腸炎ウイルスの検出状況（秋田県：平成 26 年度）

|           | 4 月 | 5 月 | 6 月 | 7 月 | 8 月 | 9 月 | 10 月 | 11 月 | 12 月 | 1 月 | 2 月 | 3 月 | 計  |
|-----------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|------|-----|-----|-----|----|
| ノロウイルス    | 4   | 2   | 4   |     |     |     |      |      | 1    | 11  | 4   | 1   | 27 |
| サポウイルス    | 2   |     | 1   | 1   |     |     | 2    | 4    | 4    |     |     |     | 14 |
| A 群ロタウイルス | 5   | 6   |     |     |     |     |      |      |      |     | 2   |     | 13 |
| C 群ロタウイルス |     |     |     |     |     |     |      |      |      | 1   |     |     | 1  |
| 腸管アデノウイルス | 1   |     |     |     |     |     |      | 1    |      |     |     |     | 2  |
| 計         | 12  | 8   | 5   | 1   | 0   | 0   | 2    | 5    | 5    | 12  | 6   | 1   | 57 |

(検体数)

表 2 感染症発生動向調査における胃腸炎ウイルスの検出状況（全国：平成 26 年度）

|           | 4 月 | 5 月 | 6 月 | 7 月 | 8 月 | 9 月 | 10 月 | 11 月 | 12 月 | 1 月 | 2 月 | 3 月 | 計    |
|-----------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|------|-----|-----|-----|------|
| ノロウイルス    | 303 | 272 | 104 | 32  | 37  | 49  | 32   | 256  | 497  | 514 | 464 | 409 | 2969 |
| サポウイルス    | 27  | 31  | 19  | 16  | 13  | 3   | 15   | 60   | 98   | 34  | 24  | 42  | 382  |
| A 群ロタウイルス | 110 | 108 | 35  | 6   | 8   | 5   | 6    | 2    | 13   | 40  | 68  | 155 | 556  |
| C 群ロタウイルス | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0    | 0    | 0    | 1   | 0   | 0   | 1    |
| 腸管アデノウイルス | 23  | 19  | 13  | 8   | 4   | 7   | 6    | 5    | 2    | 7   | 5   | 9   | 108  |
| 計         | 463 | 430 | 171 | 62  | 62  | 64  | 59   | 323  | 610  | 596 | 561 | 615 | 4016 |

出典：国立感染症研究所病原微生物検出情報（H27.8.21 現在）を基に集計

(検体数)

表 3 感染症発生動向調査において検出されたノロウイルスの遺伝子型（平成 26 年度）

|                   | 4 月 | 5 月 | 6 月 | 7 月 | 8 月 | 9 月 | 10 月 | 11 月 | 12 月 | 1 月 | 2 月 | 3 月 | 計  |
|-------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|------|-----|-----|-----|----|
| GII.2             |     |     | 1   |     |     |     |      |      |      |     |     |     | 1  |
| GII.3             |     |     | 1   |     |     |     |      |      |      |     |     |     | 1  |
| GII.4 Sydney 2012 | 3   |     |     |     |     |     |      |      |      | 9   | 3   |     | 15 |
| GII.4 2006b       |     |     |     |     |     |     |      |      |      | 2   | 1   |     | 3  |
| GII.6             | 1   | 2   | 2   |     |     |     |      |      |      |     |     |     | 5  |
| GII.17            |     |     |     |     |     |     |      |      | 1    |     |     | 1   | 2  |
| 計                 | 4   | 2   | 4   | 0   | 0   | 0   | 0    | 0    | 1    | 11  | 4   | 1   | 27 |

(株数)

ルスが 27 例（47.4%）と最も多く、次いでサポウイルスが 14 例（24.6%），A 群ロタウイルスが 13 例（22.8%），アデノウイルスが 2 例（3.5%），C 群ロタウイルスが 1 例（1.8%）であった。ノロウイルスはすべて GII 型で、サポウイルスは人に感染する GI 型（5 例），GII 型（5 例），GIV 型（1 例），GV 型（3 例）の全ての型が検出された。A 群ロタウイルスの 1 例についてはワクチン株であることが確認された。A 群ロタウイルスに比べ C 群ロタウイルスの検出頻度は全国的にも低い傾向にあり<sup>5)</sup>、平成 26 年度は本県で検出された 1 例が全国でも唯一の報告であった。アデノウイルスは上下気道炎、結膜炎、胃腸炎など多様な疾患の原因となりうるウイルスであるが、検出された 2 例は胃腸炎症

状を呈しており、遺伝子型別の分類から腸管アデノウイルス（41 型）と確認された。

### 3.1.2 検出胃腸炎ウイルスの季節的特徴

冬場に流行期を迎えるノロウイルスは 1 月に最も多く検出された。ロタウイルスは例年全国的に 2～5 月にピークを迎えるが<sup>5)</sup>、本県でも 1～5 月に検出が認められた。サポウイルスについては、全国的には年間を通して検出が認められ、そのピークは 12 月であったが、本県においては 10～12 月に多発していた。日本における腸管アデノウイルスの検出は、ノロウイルス、サポウイルス、ロタウイルスと比較し頻度は低いが、年間を通して検出が認められている。本県では 4 月と 11 月に 1 例ずつの検出であった。

表4 食中毒および集団感染事例からの胃腸炎ウイルスの検出状況（平成26年度）

|          |                          | 4月 | 5月 | 6月 | 7月 | 8月 | 9月 | 10月 | 11月 | 12月 | 1月 | 2月 | 3月 | 計  |
|----------|--------------------------|----|----|----|----|----|----|-----|-----|-----|----|----|----|----|
| 食中毒      | ノロウイルス GII 型             | 1  |    |    |    |    |    |     |     |     | 3  | 1  |    | 5  |
|          | ノロウイルス<br>GII 型・GI 型混合感染 |    |    |    |    |    |    |     |     |     | 2  | 1  |    | 3  |
| 集団<br>感染 | ノロウイルス GII 型             | 6  | 5  | 2  |    |    |    |     | 1   | 2   | 1  | 5  |    | 22 |
|          | ノロウイルス GI 型              |    | 1  |    |    |    |    |     |     |     | 1  |    |    | 2  |
|          | サポウイルス                   |    |    |    |    |    |    | 1   |     | 2   |    |    |    | 3  |
| 計        |                          | 7  | 6  | 2  | 0  | 0  | 0  | 1   | 1   | 4   | 7  | 7  | 0  | 35 |

（事例数）

表5 秋田県における食中毒事例の詳細（平成26年度）

| 発生年月        | 推定原因食品         | 原因施設 | 検出ウイルス                 | ノロウイルス遺伝子型                              | 備 考      |
|-------------|----------------|------|------------------------|-----------------------------------------|----------|
| 平成26年<br>4月 | 不明<br>（飲食店の食事） | 飲食店  | ノロウイルス GII 型           | GI.4 Sydney 2012                        |          |
| 平成27年<br>1月 | カキ料理           | 飲食店  | ノロウイルス GII 型           | GI. Mix                                 | 照会事例：千葉県 |
|             | 不明<br>（施設の給食）  | 老人施設 | ノロウイルス GII 型           | GI.4 Sydney 2012                        |          |
|             | カキボン酢          | 旅館   | ノロウイルス GII 型<br>・ GI 型 | GI.4 Sydney 2012,<br>GI.17, GI.4        |          |
|             | 不明<br>（会食料理）   | 飲食店  | ノロウイルス GII 型           | GI.4 Sydney 2012                        |          |
|             | 酢ガキ            | 旅館   | ノロウイルス GII 型<br>・ GI 型 | GI.4 Sydney 2012,<br>GI.17, GI.13, GI.3 |          |
| 平成27年<br>2月 | 蒸しガキ           | 旅館   | ノロウイルス GII 型           | GI.6                                    |          |
|             | 酢ガキ            | 飲食店  | ノロウイルス GII 型<br>・ GI 型 | GI.17, GI.21, GI.4                      |          |

## 3.1.3 検出ノロウイルスの遺伝子型

感染症発生動向調査において検出されたノロウイルスの遺伝子型について表3に示す。2011/12 シーズンに流行した GI.4 Sydney 2012 変異株が15例（55.6%）と最も多く、その検出時期は流行期である1月、2月に多くなっていた。次いで、5例（18.5%）で認められた GI.6 型は4～6月の春先に検出が限局していた。また、近年本県において検出されていなかった GI.17 型が2例（7.4%）から検出された。

## 3.2 食中毒および集団感染事例からの胃腸炎ウイルスの検出状況

食中毒および集団感染事例からの胃腸炎ウイルスの月別検出状況を表4に示す。行政検査として依頼のあった集団事例の原因病原体はノロウイルスとサポウイルスの2種類であった。

## 3.2.1 食中毒事例の内訳

食中毒事例の詳細について表5に示す。8事例全ての事例からノロウイルス GII 型が検出され、また、3事例からノロウイルス GI 型も検出された。混合感染3事例全てカキが感染源と確認された事例であった。この3事例については、遺伝子型が複数検出されており、発生動向調査において検出が認められた GI.17 型も検出された。カキやアサリ等二枚貝の中腸腺には複数の遺伝子型のウイルスが蓄積されることが多いため、二枚貝の喫食が原因となる食中毒では混合感染となる可能性が高いと考えられる<sup>6)</sup>。食中毒事例の発生は1月、2月に集中していた。この期間、カキが原因食品とみられた食中毒が5事例（GII 型感染2事例：内1時事例は照会事例、GII 型・GI 型混合感染3事例）と例年になく多く発生しており、いずれも生食または加熱不十分

表 6 集団感染事例におけるノロウイルスの遺伝子型（平成 26 年度）

|                   | 4 月 | 5 月 | 6 月 | 7 月 | 8 月 | 9 月 | 10 月 | 11 月 | 12 月 | 1 月 | 2 月 | 3 月 | 計  |
|-------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|------|-----|-----|-----|----|
| GII.2             | 1   | 1   |     |     |     |     |      |      |      |     |     |     | 2  |
| GII.3             |     |     | 1   |     |     |     |      |      |      |     |     |     | 1  |
| GII.4 Sydney 2012 | 1   |     |     |     |     |     |      | 1    | 2*   | 1   | 3   |     | 8  |
| GII.4 2006b       |     |     |     |     |     |     |      |      |      |     |     |     | 0  |
| GII.6             | 4   | 4   | 1   |     |     |     |      |      |      |     |     |     | 9  |
| GII.17            |     |     |     |     |     |     |      |      | 1*   |     | 2   |     | 3  |
| GI.2              |     |     |     |     |     |     |      |      |      | 1   |     |     | 1  |
| GI.3              |     | 1   |     |     |     |     |      |      |      |     |     |     | 1  |
| 計                 | 6   | 6   | 2   | 0   | 0   | 0   | 0    | 1    | 3    | 2   | 5   | 0   | 25 |

\* 12 月の 2 事例中 1 事例より GII.4 sydney 2012 型と GII.17 型の 2 種類の遺伝子型を検出 (株数)

分で食されていた。ノロウイルスに汚染されたカキが流通していた可能性が推定される。冬季に二枚貝を喫食する際には十分な加熱処理が感染予防につながると考えられる。

### 3.2.2 集団感染事例の内訳

集団感染 27 事例中 22 事例からノロウイルス GII 型が検出され、2 事例からノロウイルス GI 型が認められた。ノロウイルスの検出時期は 4～6 月、11～2 月であった。サポウイルスは 3 事例で認められ、すべて G V 型であった。検出時期は 10～12 月の間となっており、発生動向調査による検出状況と同様の傾向がみられた。サポウイルスは 6 歳以下の小児への感染が多いウイルスであり<sup>7)</sup>、この 3 事例は保育園および幼稚園での集団感染事例であった。集団感染 27 事例における発生施設の内訳を図 1 に示す。保育園が 14 事例 (51.9%) と最も多く、ついで幼稚園が 4 事例 (14.8%)、小学校が 3 事例 (11.1%)、高齢者施設が 3 事例 (11.1%)、その他が 3 事例 (11.1%) であった。保育園と幼稚園を合わせた発生数が半数以上と圧倒的に多い状況であった。乳幼児や高齢者は、免疫が未熟であったり、低下していたりすることで感染しやすくなっており、特に乳幼児は衛生観念が発達していない<sup>8)</sup>という理由から感染が広がりやすいものと考えられる。

### 3.2.3 集団感染事例における検出ノロウイルスの遺伝子型

集団感染事例において検出されたノロウイルスの遺伝子型を表 6 に示す。感染症発生動向調

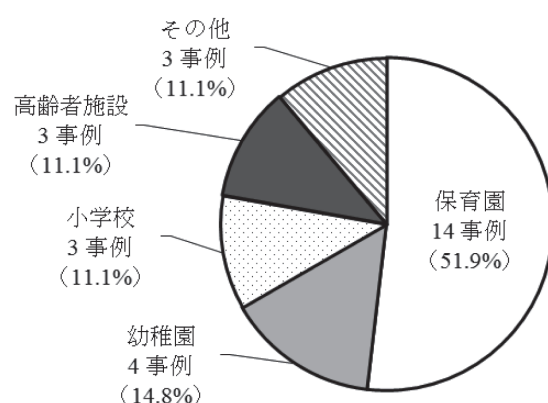


図 1 集団感染事例における発生施設の内訳  
(平成 26 年度)

査の検出状況と同様に、4～6 月の春先に GII.6 型が集中して 9 例 (36.0%) 認められており、11～2 月の流行期には GII.4 Sydney 2012 変異株が 7 例 (28.0%) 検出されていた。また、発生動向調査や食中毒事例においても検出された GII.17 型が 3 例 (12.0%) から認められた。GII.17 型の検出については、本県同様これまで検出例が少なかった大阪市<sup>9)</sup>や三重県<sup>10)</sup>においても平成 26 年度に検出されており、引き続き動向に注意を払う必要があると考える。

## 4. まとめ

小児における感染性胃腸炎の発生動向は、ノロウイルス等による集団発生の報告数の推移と概ね一致するといわれている<sup>11)</sup>。秋田県の平成 26 年度における集計結果からも、食中毒等集団事例の発生は、感染症発生動向調査による胃腸炎ウイルスの検出状況と同様の傾向が認められ

た。食中毒や集団感染事例の発生予防および対策には、市中に流行している病原体の動態を詳細かつ的確に把握することが重要であることから、地域や疾患の種類に偏りが生じない形での検体収集が必要と考えられる。今後も医療機関との連携を図りながら流行状況の把握と情報還元に努めていきたい。

## 参考文献

- 1) Kageyama, T., et al.: Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. *J. Clin. Microbiol.*, **41**, 2003, 1548-1577.
- 2) Oka, T., et al.: Detection of human sapovirus by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. *J. Med. Virol.*, **78**, 2006, 1347-1353.
- 3) Logan, C., et al.: Real-time reverse transcription-PCR for detection of rotavirus and adenovirus as causative agents of acute viral gastroenteritis in children. *J. Clin. Microbiol.* **44**, 2006, 3189-3195.
- 4) Inagawa W. S., et al.: Rapid diagnosis of adenoviral conjunctivitis by PCR and restriction fragment length polymorphism analysis. *J. Clin. Microbiol.*, **41**, 1996, 2113-2116.
- 5) 国立感染症研究所感染症情報センター: 〈特集〉ロタウイルス 2010～2013 年〈特集関連情報〉ロタウイルスの概要, 病原微生物検出情報, **35**, 3, 2014, 1-4.
- 6) 斎藤博之, 他: ノーウォーク様ウイルス (NLV) の検査における一本鎖高次構造多型 (SSCP) 解析の応用, 臨床とウイルス, **30**, 3, 2002, 163-171.
- 7) Oka T., et al.: Comprehensive review of human sapovirus. *J. Clin. Microbiol. Rev.*, **28**, 2015, 32-53.
- 8) 国立感染症研究所感染症情報センター ノロウイルス感染症 ノロウイルス感染症とその対応・予防 (医療従事者・施設スタッフ用) <http://idsc.nih.go.jp/disease/norovirus/taio-b.html>
- 9) 入谷展弘, 他: 集団胃腸炎事例から検出されたノロウイルスの分子疫学的解析および国産市販生カキのウイルス汚染調査, 厚生労働科学研究費補助金 食品の安全確保推進研究事業 食品中の病原ウイルスの検出法に関する研究 平成 26 年度総括・研究分担報告書, 2015, 147-155.
- 10) 国立感染症研究所感染症情報センター: 〈国内情報〉ノロウイルス GII.17 型の流行とその特徴についてー三重県, 病原微生物検出情報, **36**, 5, 2015, 19-20.
- 11) 野田衛, 他: ノロウイルス食中毒・感染症からまもる!!ーその知識と対策ー, 公益社団法人日本食品衛生協会 2013, 16-17.

厚生労働科学研究費補助金 食品の安全確保推進研究事業 (H25～27 年度)

## 食品からのウイルス検出法としての パンソルビン・トラップ法の精度向上に関する研究

斎藤博之 秋野和華子 野田 衛<sup>\*1</sup>

パンソルビン・トラップ法は、食品検体に含まれるウイルス粒子を黄色ブドウ球菌の表面に吸着させて回収することを基本原理としている。その性質上、抽出された RNA には大量の黄色ブドウ球菌由来の遺伝子が混入することになるが、極微量のウイルス RNA を安定的に保持するキャリアーとして働くため、検出感度に対してはプラスの効果が見込める。その一方で、大量の黄色ブドウ球菌の遺伝子の中に含まれるウイルス遺伝子を検出するという特異な条件下での反応であることから、試験機関によって検出精度がバラつくという問題が指摘された。そこで、検出結果に差を生じやすい箇所について反応条件等を最適化する必要があった。このことから、次の事項について検討した。① $\alpha$ -Amylase 粉末に含まれる賦形剤が残留すると、検出感度に影響することから、これをあらかじめ除去した酵素液を調製しておくことで対応した。液化調製品は $-20^{\circ}\text{C}$ で2ヶ月以上安定保存でき、粉末を直接投入した場合と同等の効果があることを確認した。②黄色ブドウ球菌由来 DNA を除去する方法として、RNA 抽出過程でのオンカラム DNase 処理と、RNA 抽出後の易熱性 DNase 処理の2通りを実施できるようにした。いずれの方法を用いても、これまでの DNase 処理で問題となったコピー数の低下は起こらなかった。③逆転写反応は、 $58^{\circ}\text{C}$ での高温逆転写反応が非特異反応による感度低下を抑制するのに有効であった。④PCR 反応は酵素製品の選択が重要であり、特にホットスタート仕様が必須であることが確認された。

### 1. はじめに

ウイルス性食中毒の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<sup>1,2)</sup>。しかしながら、原因として疑われる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た。原因物質としてはノロウイルス (NoV) が大部分を占めているが、他にもサポウイルス (SaV) やアデノウイルス 41 型 (AdV41) に代表される腸管系アデノウイルスも含まれている。さらに、輸入食品等が原因と考えられる A 型肝炎ウイルス (HAV) 感染者の報告が急増するなど、食品中のウイルスを検出する方法の確立が急務となっている<sup>3)</sup>。平成 19～21 年度に実施された厚生労働科学研究費補助金「食品中のウイルスの制御に関する研究」(H19-食品一般-016)において、固形、液状、練り物、油物などの一般的な食品から NoV 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<sup>4-13)</sup>。その後、平成 22～24 年度に実施された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」(H22-食品一般-013)において、市販のガンマグロブリン製剤を利用することで添加抗体の安定供給が図られた他、検出した遺伝子の塩基配列解析も可能な方法として発展させることができた<sup>14-18)</sup>。一方、平成 24 年度に実施した共通試薬と共通検体を用いたコラボ・スタディにおいて、試験機関ごとの結果のバラつきが問題となった<sup>19)</sup>。そこで本研究では、結果に差が生じやすい箇所に着目し、反応系等を最適化することによって検出精度を向上させるための検討を行った。

### 2. 方法

#### 2.1 研究材料

実験に用いる食品として、市販されているきな粉とポテトサラダを用いた。また、検出対象となるウイルスとして、NoV-GII.4 (AB293424) を含む糞便を用いた。

\*1 国立医薬品食品衛生研究所



## 2.2 試薬類

### 2.2.1 食品洗滌液

Tris-HCl (pH8.4) – 0.5 M NaCl – 0.1% Tween20 を調製して使用した。

### 2.2.2 5%ガンマグロブリン製剤

米国 Baxter 社の 5% 静注用ガンマグロブリン製剤「Gammagard」を用いた。Alfresa Pharma 社から購入した。

### 2.2.3 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の懸濁液で、メルク社から購入した。

### 2.2.4 フェノール系 RNA 抽出キット

TRIzol-LS (invitrogen) を使用した。

### 2.2.5 カラム方式の RNA 抽出キット

QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen) を使用した。

### 2.2.6 再懸濁液

2.2.5 の抽出キット添付の AVL 液を用いた。

### 2.2.7 DNase I (RT Grade) 及び RNase inhibitor ニッポンジーンの製品を使用した。

### 2.2.8 Heal-labile double strand specific DNase (HL-dsDNase: 易熱性 2 本鎖特異的 DNase) ノルウェー ArcticZymes 社から購入した。

### 2.2.9 アミラーゼ

枯草菌由来  $\alpha$ -Amylase 粉末 (和光純薬) を使用した。

### 2.2.10 食品処理袋

サニスペックテストバッグ (アズワン) を使用した。

### 2.2.11 conventional PCR 用酵素

表 1 に記載したものを使用した。

### 2.2.12 逆転写酵素

表 2 に記載したものを使用した。

### 2.2.13 抗 Taq モノクローナル抗体

anti-Taq high (東洋紡) を使用した。

### 2.2.14 逆転写反応に用いたプライマー

逆転写反応専用プライマー PANR-G2<sup>18)</sup> を用いた。

### 2.2.15 conventional PCR に用いたプライマー COG2F<sup>20)</sup> / G2SKR<sup>21)</sup>, または G2SKF<sup>21)</sup> / G2SKR のプライマーセットを用いた。

### 2.2.16 conventional PCR 装置

アステック社製「PC-320」を用いた。

### 2.2.17 real-time PCR 装置

ロシュ社製「LightCycler 320S」を用いた。

### 2.2.18 real-time PCR 用酵素

ロシュ社製「LightCycler FastStart DNA Master PLUS Hybridization Probes」を用いた。

### 2.2.19 real-time PCR 反応系

Kageyama<sup>21)</sup>らの方法に従った。

## 2.3 結果の差が生じやすい箇所の想定

試験機関によって結果のバラつきが生じやすい部分として、次の 4 箇所を想定した。この内、(1) はウイルス RNA 抽出段階 (狭義のパントラ法) のものであり、(2) ~ (4) は抽出した RNA の検出段階に相当する。

(1)  $\alpha$ -Amylase 粉末の不溶性成分の残留に関する問題

(2) 抽出した RNA 溶液に対する DNase 処理の問題

(3) 逆転写酵素の選定と反応条件最適化

(4) PCR 酵素の選定と反応条件最適化

なお、プロトコル上の順番は (1) → (4) であるが、最適化にあたっては逐次結果を観察しながら行う必要があるため、検討の順番は (4) → (1) とした。すなわち、最初に (4) の検討と最適化を行い、次に (3) を検討する (最適化済みの (4) を用いて結果を観察する) という順になる。

## 2.4 パンソルビン・トラップ法の全体の手順

図 1 に示した汎用プロトコルに従った。本研究では、各種酵素の選定と反応条件の最適化のために、「パントラ抽出物」による負荷試験を行った。「パントラ抽出物」は、ウイルスを含まない市販のきな粉からパントラ法のプロトコルを用いて調製した。

## 2.5 PCR に関する検討

NoV 検査のために国立感染症研究所より配布されている定量コントロール DNA を蒸留水、及びパントラ抽出物で段階希釈することで、 $10^5 \sim 10^1$  コピー /  $\mu\text{L}$  の NoV 遺伝子配列由来 DNA 断片を含む被検体を調製した。これらを、表 1 に示した 32 種類の PCR 反応系で増幅効率を比較した。プライマーセットは G2SKF / G2SKR を用い、反応容量 25  $\mu\text{L}$  中に上記被検体が 5  $\mu\text{L}$  含まれるようにした。表 1 では、酵素の種別としてファミリー A (pol 型酵素)、ファミリー B ( $\alpha$  型酵素)、及びそれらの混合 (Blend) を示

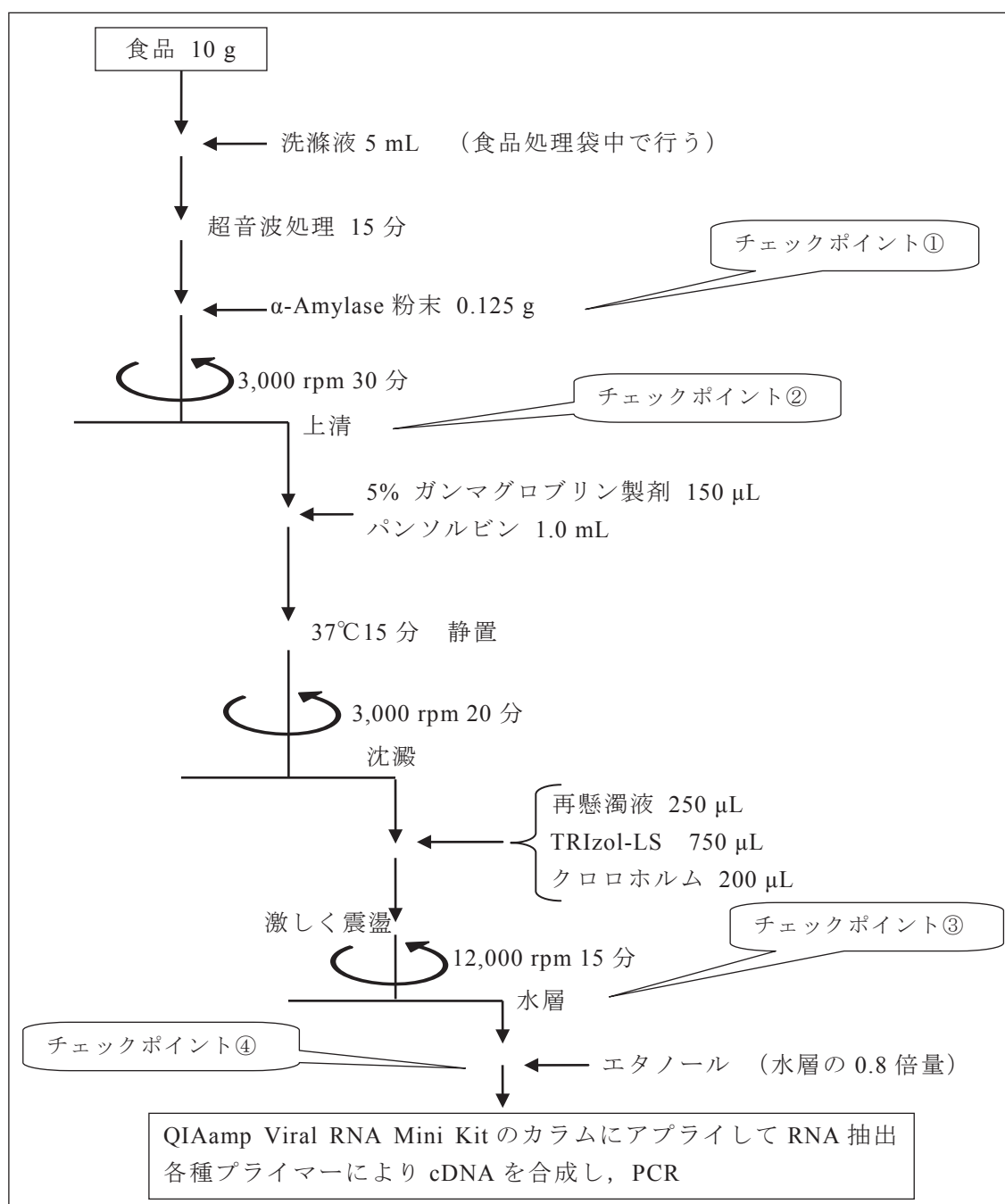


図1 パンソルビン・トラップ法の操作手順

※①～④のチェックポイントは α-Amylase 液化調製法で参照する。

した。また、ホットスタート仕様の有無（“H”，及び“—”）と Mg の終濃度（mM）も記載した。例えば、「A/H/1.5 mM」の表記は「ファミリー A に属する酵素が用いられ、ホットスタート仕様で、Mg 濃度は 1.5 mM で反応を行う」という意味になる。また、将来的に偽陽性対策を講ずる布石として、基質に dUTP を用いた反応系も同時に比較した。PCR 装置の温度プログラムは、次に示すと通りのタッチダウン PCR を基本としたが、denature 温度と時間、及び extension 温

度と時間は酵素の添付説明書に従って設定した。反応 buffer は酵素添付のものを基本とし、さらに MgCl<sub>2</sub> を追加して Mg<sup>2+</sup>を増加させたものも検討した。

#### 【タッチダウン PCR】

95℃2 分 1 サイクル

95℃30 秒－（55→50℃）30 秒－72℃30 秒 5 サイクル：下線部がタッチダウン設定

95℃30 秒－50℃30 秒－72℃30 秒 40 サイクル

72℃7 分 1 サイクル



表 1 比較検討した PCR 用酵素と反応系（次頁へ続く）

| No. | メーカー<br>品名<br>(反応系への追加)                                                                  | ファミリー / ホットスタート / Mg 濃度 | No. | メーカー<br>品名<br>(反応系への追加)                                                    | ファミリー / ホットスタート / Mg 濃度 |
|-----|------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|-----|----------------------------------------------------------------------------|-------------------------|
| 1   | <u>greiner</u><br>Taq DNA Polymerase, Standard                                           | A / - / 1.5 mM          | 11  | <u>Roche Diagnostics</u><br>FastStart High Fidelity PCR System             | A / H / 1.8 mM          |
| 2   | <u>greiner</u><br>Taq DNA Polymerase, Hot Start                                          | A / H / 1.5 mM          | 12  | <u>Roche Diagnostics</u><br>AptaTaq Fast PCR Master<br>(抗 Taq モノクローナル抗体添加) | A / H / 2.5 mM          |
| 3   | <u>greiner</u><br>Taq DNA Polymerase, High Yield                                         | A / - / 2.0 mM          | 13  | <u>TaKaRa</u><br>TaKaRa Taq                                                | A / - / 1.5 mM          |
| 4   | <u>greiner</u><br>Taq DNA Polymerase, High Yield<br>(抗 Taq モノクローナル抗体添加)                  | A / H / 2.0 mM          | 14  | <u>TaKaRa</u><br>TaKaRa Taq HS                                             | A / H / 1.5 mM          |
| 5   | <u>greiner</u><br>Taq DNA Polymerase, High Yield<br>(抗 Taq モノクローナル抗体添加)<br>(Mg 増量→4.5mM) | A / H / 4.5 mM          | 15  | <u>TaKaRa</u><br>TaKaRa Ex Taq                                             | Blend / - / 2.0 mM      |
| 6   | <u>greiner</u><br>Taq DNA Polymerase, High Fidelity                                      | Blend / - / 2.0 mM      | 16  | <u>TaKaRa</u><br>TaKaRa Ex Taq HS                                          | Blend / H / 2.0 mM      |
| 7   | <u>greiner</u><br>Pfu-X DNA Polymerase                                                   | B / - / 2.0 mM          | 17  | <u>TaKaRa</u><br>TaKaRa Z-Taq                                              | Blend / - / 3.0 mM      |
| 8   | <u>TOYOBO</u><br>KOD FX Neo                                                              | B / H / 2.0 mM          | 18  | <u>TaKaRa</u><br>TaKaRa Z-Taq<br>(抗 Taq モノクローナル抗体添加)                       | Blend / H / 3.0 mM      |
| 9   | <u>Agilent Technologies</u><br>PfuTurbo Cx Hotstart DNA Polymerase                       | B / H / 2.0 mM          | 19  | <u>TaKaRa</u><br>Tks Gflex DNA Polymerase                                  | B / H / 2.0 mM          |
| 10  | <u>Roche Diagnostics</u><br>FastStart Taq DNA Polymerase                                 | A / H / 2.0 mM          | 20  | <u>TaKaRa</u><br>MightyAmp DNA Polymerase Ver.2                            | A / H / 4.0 mM          |

## 2.6 逆転写反応に関する検討

糞便検体より抽出した NoV の RNA を蒸留水、及びパントラ抽出物で段階希釈した被検体を調製した。DNase 処理は行わずに、逆転写反応専用プライマー PANR-G2 と表 2 に示す逆転写酵素を用いて cDNA を合成した。反応温度は、添付説明書に記載があるとおりの 37℃、42℃、55℃、58℃、及び 60℃にて行った。反応容量は 20  $\mu$ L で、上記被検体が 10  $\mu$ L 含まれるようにした。30 分の逆転写反応後、蒸留水を 20  $\mu$ L 加えたもの（2 倍希釈）を 5  $\mu$ L 取り、real-time PCR と先に最適化を済ませた conventional PCR（プライマーセットは COG2F / G2SKR）の反応系により増幅効率を比較した。conventional PCR で増幅バンドが観察された場合は切り出して塩基配列

を確認した。

## 2.7 DNase 処理に関する検討

糞便検体より抽出した NoV の RNA 溶液に対して、DNase I 処理（37℃ 10 分）を行い、75℃ 5 分加熱する反応系を基本（一般的に行われている方法）とした。さらに、加熱をしない反応系として、DNase I と易熱性酵素である HL-dsDNase を用いた場合を比較した。また、パントラ法で RNA 抽出を行う途中で DNase I を作用させる「オンカラム DNase I 処理」についても検討した（図 7）。これらの方法で DNase 処理を行った後、先に最適化を済ませた逆転写反応系により cDNA を合成し、real-time PCR でコピー数を測定した。

表 1 (前頁からの続き)

| No. | メーカー<br>品名<br>(反応系への追加)                                                                                  | ファミリー / ホットスタート / Mg 濃度 | No. | メーカー<br>品名<br>(反応系への追加)                                                       | ファミリー / ホットスタート / Mg 濃度 |
|-----|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|-----|-------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|
| 21  | New England BioLabs<br>Taq DNA Polymerase with ThermoPol Buffer                                          | A / - / 2.0 mM          | 27  | KAPA BIOSYSTEMS<br>KAPA2G Robust HotStart PCR Kit, buffer A<br>(Mg 増量→4.5 mM) | A / H / 4.5 mM          |
| 22  | New England BioLabs<br>Taq DNA Polymerase with ThermoPol Buffer<br>(抗 Taq モノクローナル抗体添加)                   | A / H / 2.0 mM          | 28  | KAPA BIOSYSTEMS<br>KAPA2G Fast HotStart PCR Kit                               | A / H / 1.5 mM          |
| 23  | New England BioLabs<br>Taq DNA Polymerase with ThermoPol Buffer<br>(抗 Taq モノクローナル抗体添加)<br>(Mg 増量→4.5 mM) | A / H / 4.5 mM          | 29  | KAPA BIOSYSTEMS<br>KAPA2G Fast HotStart PCR Kit<br>(Mg 増量→4.5 mM)             | A / H / 4.5 mM          |
| 24  | Nippongene<br>THUNDER Taq Gold DNA Polymerase LD                                                         | A / H / 1.5 mM          | 30  | BIOLINE<br>HybriPol DNA Polymerase                                            | A / - / 2.0 mM          |
| 25  | Nippongene<br>THUNDER Taq Gold DNA Polymerase LD<br>(Mg 増量→4.5 mM)                                       | A / H / 4.5 mM          | 31  | BIOLINE<br>HybriPol DNA Polymerase<br>(抗 Taq モノクローナル抗体添加)                     | A / H / 2.0 mM          |
| 26  | KAPA BIOSYSTEMS<br>KAPA2G Robust HotStart PCR Kit, buffer A                                              | A / H / 1.5 mM          | 32  | BIOLINE<br>HybriPol DNA Polymerase<br>(抗 Taq モノクローナル抗体添加)<br>(Mg 増量→4.5 mM)   | A / H / 4.5 mM          |

## 2.8 $\alpha$ -Amylase 処理に関する検討

図 10 に示したとおりの手順で  $\alpha$ -Amylase 粉末を液化調製した。-20℃にて 2 ヶ月保存した後、効果の確認を行った。炭水化物除去効果確認のために、0.1%馬鈴薯デンプン液（蒸留水にて加温糊化）とポテトサラダ 10 g を 50 mL の蒸留水に懸濁して食品処理袋のフィルターを通した濾液を用いた。これらの被検体 50 mL に  $\alpha$ -Amylase 粉末 0.125 g、または液化調製品 1 mL を添加して、37℃ 15 分静置し、3,000 rpm 30 分遠心した上清を 5 mL 分取し、そこに日本薬局方「ヨードチンキ」50  $\mu$ L を加えてヨウ素デンプン反応を観察した。

次にパントラ法を実施する上での影響を検討するために、食品洗滌液に NoV を添加したもの（食品は入れない）に対して、次の操作を行い、RNA 抽出液を得た。

(1) 図 1 のチェックポイント①で  $\alpha$ -Amylase 粉末 0.125 g を加え、チェックポイント②において、スポイトを用いて上清を別チューブに丁寧に分取したもの

(2) 図 1 のチェックポイント①で  $\alpha$ -Amylase 粉末 0.125 g を加え、チェックポイント②において、上清をデカントにより別チューブに移したものの

(3) 図 1 のチェックポイント①で  $\alpha$ -Amylase 粉末 0.125 g を加え、その後の遠心を行わなかったものの

(4) 図 1 のチェックポイント①で  $\alpha$ -Amylase 液化調製品 1 mL を加え、チェックポイント②において、上清をデカントにより別チューブに移したものの

抽出した RNA を鋳型として先に最適化を済ませた逆転写反応系で cDNA を合成し、real-time PCR で検出を試みた。

## 3. 結果

### 3.1 PCR に用いる酵素の選定と反応条件最適化

NoV 遺伝子配列由来 DNA を蒸留水で段階希釈した被検体を鋳型とし、通常のデオキシヌクレオチド (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) を基質として PCR を行った場合には酵素製品間の差

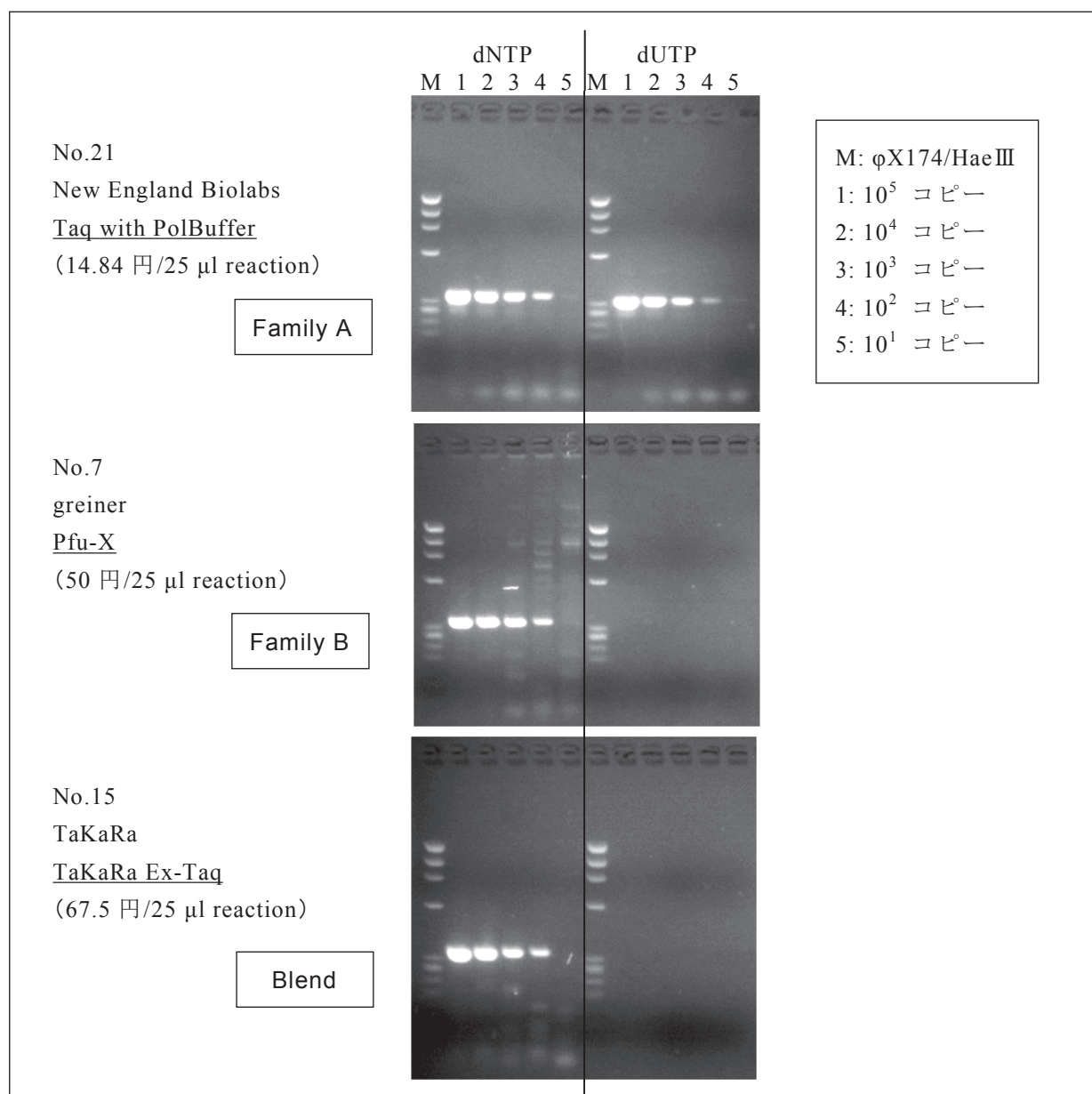


図 2A 蒸留水で段階希釈した NoV 1st. PCR 産物に対する 2nd. PCR

“dNTP”と表記してある反応は dATP, dGTP, dCTP, dTTP を各 200 μM にて使用

“dUTP”と表記してある反応は dATP, dGTP, dCTP, を各 200 μM, dUTP を 600 μM にて使用

はほとんど認められなかった。一方、dTTP を dUTP に置換した場合には、ファミリーA に属する酵素製品のみが有効で、ファミリーB に属する酵素製品、及びファミリーA とファミリーB の混合製品では増幅が起こらなかった(図 2A に一部を示す)。例外として、表 1 の No.9 はファミリーB に属するが、dUTP を取り込めるように酵素蛋白が改変されている。また、表 1 の No.20 はファミリーA であることから、理論的に dUTP を用いることが可能だが、製品構成として buffer とデオキシヌクレオチドがプレミックスされていることから dUTP に置換すること

ができなかった。

一方で、NoV 遺伝子配列由来 DNA をパントラ抽出物で段階希釈した被検体を鋳型とした場合には酵素製品間で大きな差が生じた。例えば、表 1 の No.21 は蒸留水による希釈(図 2A)では良好な遺伝子増幅が得られたが、図 2B 左(パントラ抽出物による希釈)では感度が著しく低下していた。同じ酵素製品に抗 Taq モノクローナル抗体を加えて “ホットスタート化” すると、図 2B の No.22 に示すとおり蒸留水で希釈した場合と同等に感度が回復した。一方、基質の中の dTTP を dUTP に置換した反応系では感度が

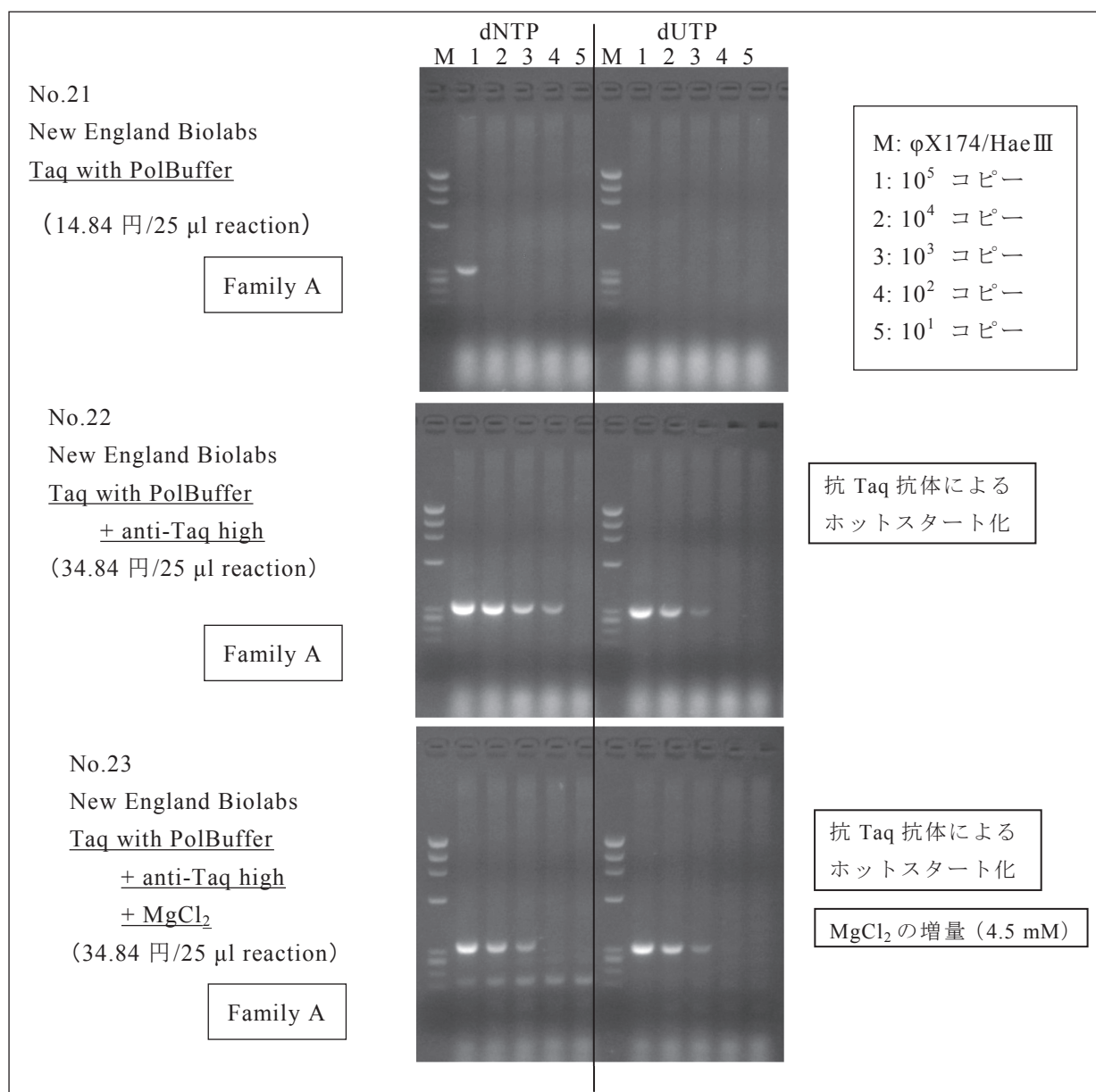


図 2B パントラ抽出物で段階希釈した NoV 1st. PCR 産物に対する 2nd. PCR (1)

“dNTP”と表記してある反応は dATP, dGTP, dCTP, dTTP を各 200 μM にて使用

“dUTP”と表記してある反応は dATP, dGTP, dCTP, を各 200 μM, dUTP を 600 μM にて使用

やや低いものの、No.23 のように Mg 濃度を 4.5mM まで増量することである程度の改善が見られた。そこで、ホットスタート仕様であることと、Mg を増量することに着眼し、基質として dUTP を用いてもなお図 2A の上段右と同等の感度を得られる反応系を検討したところ、図 2C に示す 3 つ（表 1 の No.12, No.27, No.32）が選択された。この内、No.12（図 2C 下段）については最初から dUTP が組み込まれたプレミックス製品であり、基質を入れ替える必要がないことから第一選択とした。この酵素製品は、55℃を境に酵素活性

が ON / OFF される仕組み（アプタマー）が導入されていて反応特異性の向上に寄与しているが、PCR の第一サイクルだけは、より高温のホットスタートが望ましいため抗 Taq モノクローナル抗体を添加することで補完した。

### 3.2 逆転写酵素の選定と反応条件最適化

NoV RNA を蒸留水で段階希釈した被検体を鋳型とした場合には表 2 に示した酵素製品間の差はほとんど認められなかった。しかし、パントラ抽出物で段階希釈した被検体では製品間で差が生じ、RNA が低濃度になるにつれ

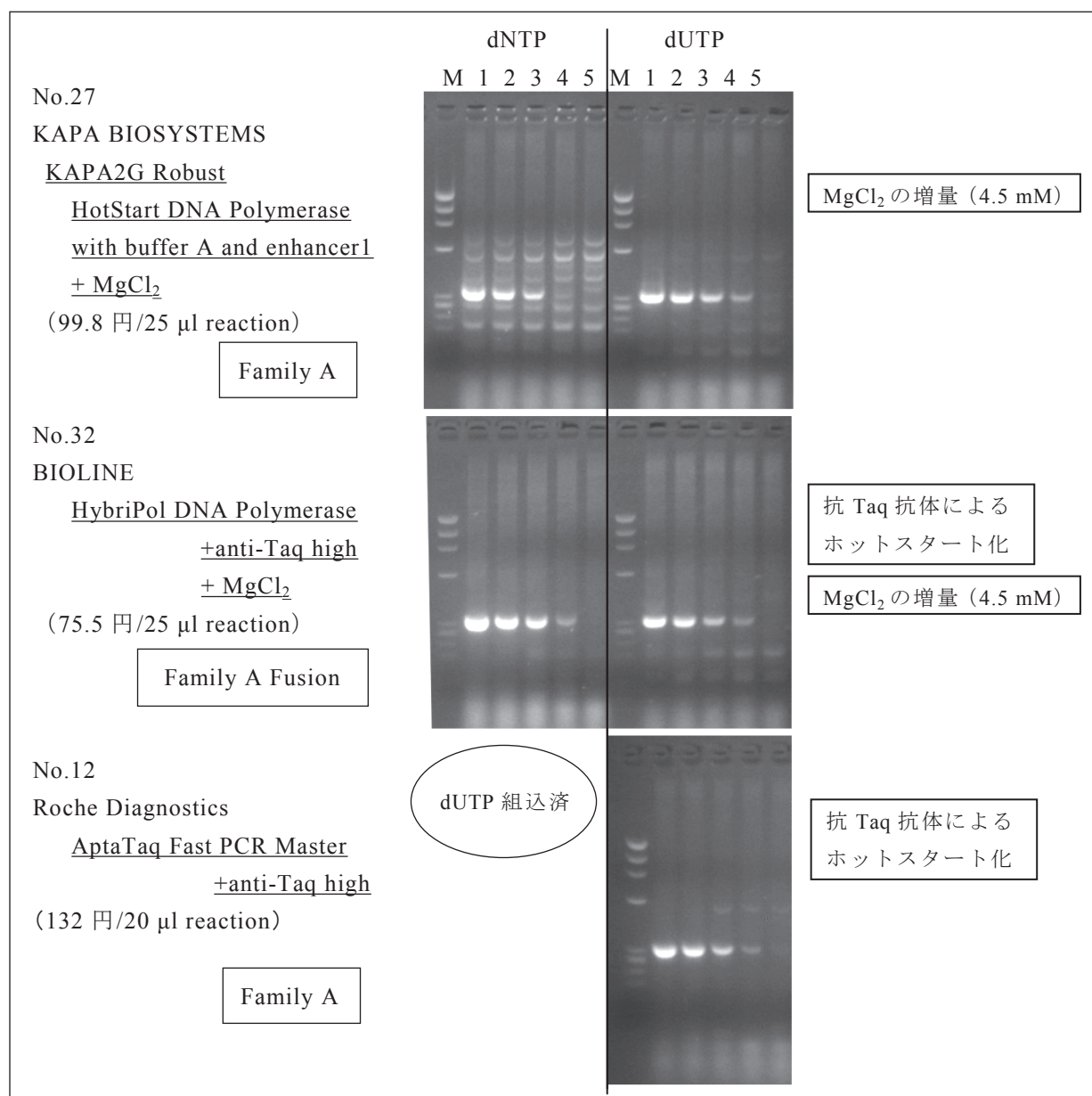


図 2C パントラ抽出物で段階希釈した NoV 1st. PCR 産物に対する 2nd. PCR (2)  
 “dNTP”と表記してある反応は dATP, dGTP, dCTP, dTTP を各 200  $\mu$ M にて使用。  
 “dUTP”と表記してある反応は dATP, dGTP, dCTP, を各 200  $\mu$ M, dUTP を 600  $\mu$ M にて使用

表 2 比較検討した逆転写酵素と反応温度

| No. | メーカー                | 品名                          | 反応温度 (°C) |
|-----|---------------------|-----------------------------|-----------|
| 1   | New England BioLabs | M-MLV Reverse Transcriptase | 37        |
| 2   | TOYOBO              | ReverTra Ace                | 42        |
| 3   | TaKaRa              | PrimeScript                 | 42        |
| 4   | Roche Diagnostics   | Transcriptor                | 55~65     |
| 5   | invitrogen          | SuperScript II              | 42        |
| 6   | invitrogen          | Thermoscript                | 55~65     |

その差は顕著となった。図 3A には  $10^5$  コピー/ $\mu$ L の RNA を被検体とした場合の増幅曲線を示したが、37°C で反応を行う逆転写酵素 (表

2 の No.1) では明らかに増幅効率が落ちていた。 $10^3$  コピー/ $\mu$ L (図 3B),  $10^2$  コピー/ $\mu$ L (図 3C) と濃度が低い被検体になると 42°C で反応



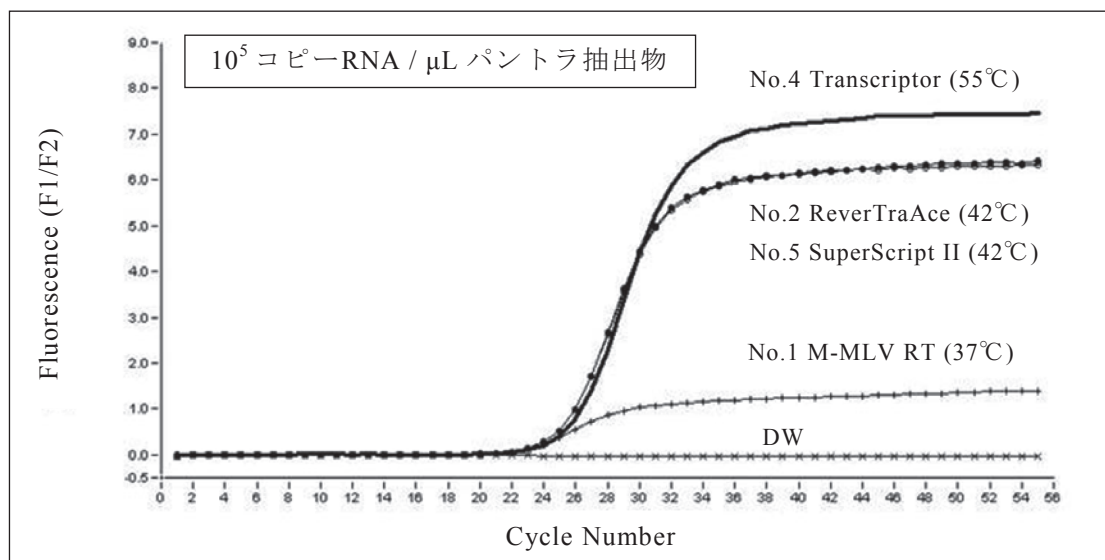


図 3A 逆転写酵素の比較 (1)

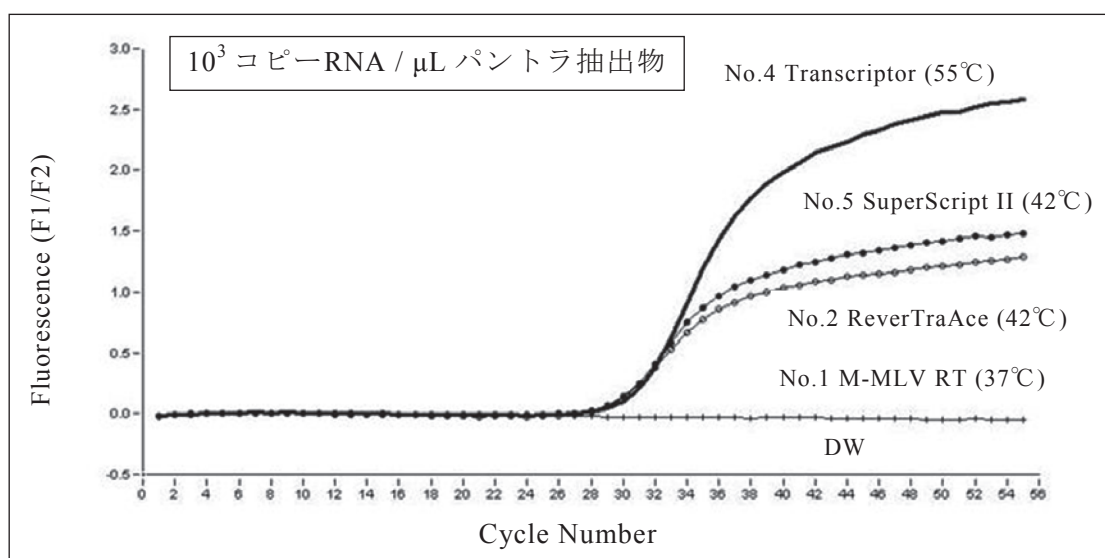


図 3B 逆転写酵素の比較 (2)

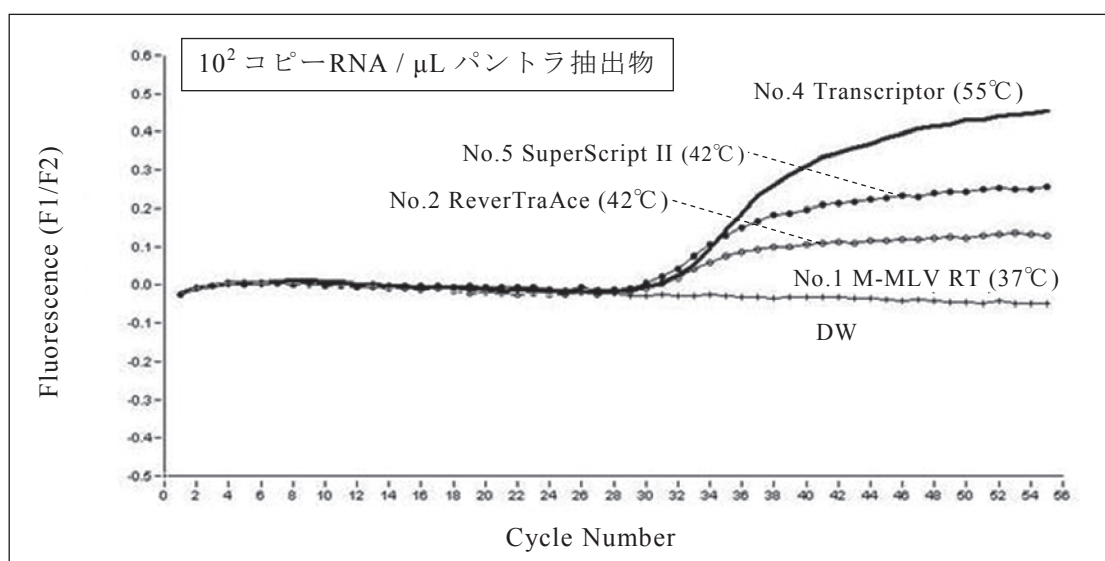


図 3C 逆転写酵素の比較 (3)

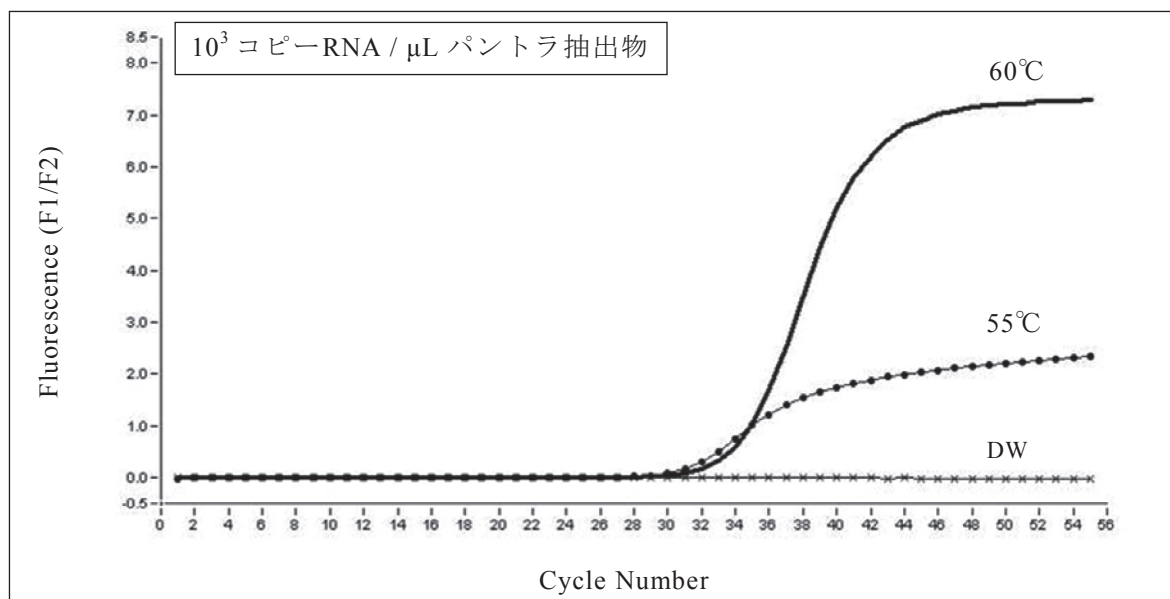


図 4A Transcriptor の反応温度比較 (1)

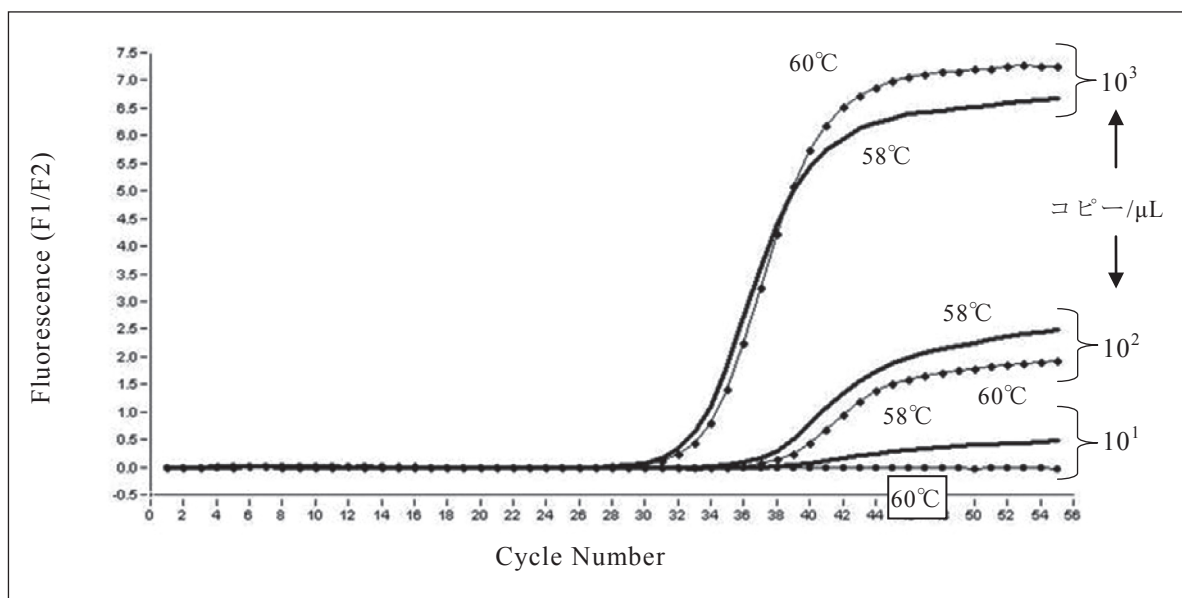


図 4B Transcriptor の反応温度比較 (2)

を行う逆転写酵素（表 2 の No.2, No.5）においても増幅効率の低下が観察された。図 3A～図 3C の増幅曲線では、横軸からの立ち上がりサイクルを見る限り製品間の差はほとんどなく、被検体に含まれる RNA のコピー数もほぼ同じに算定されたが、縦軸（増幅効率）において差を生じており、検出限界に影響が及んでいた（37℃で反応を行う酵素では図 3B と図 3C においては、もはや増幅が見られない）。以上のことから、逆転写反応においては反応温度が重要であることがわかったため、温度をさらに上昇させた場合について検討した。高温反応に対応した逆転写酵

素（表 2 の No.4）を用いて、55℃と 60℃で反応させた場合、後者の増幅効率がより高かった（図 4A）。次に反応温度を 58℃と 60℃で比較したところ、低濃度の被検体になるほど前者の増幅効率が高かった（図 4B）。反応温度が 58℃で最適化されたことから、高温反応に対応した逆転写酵素間での比較検討を行った（表 2 の No.4 と No.6）。図 5A と図 5B のとおり、両者の比較では表 2 の No.4 に示した逆転写酵素の増幅効率が高かった。比較対照として、42℃で反応を行う逆転写酵素（表 2 の No.3）も同時に用いたが、前述のとおり 58℃の高温逆転写酵素よりも



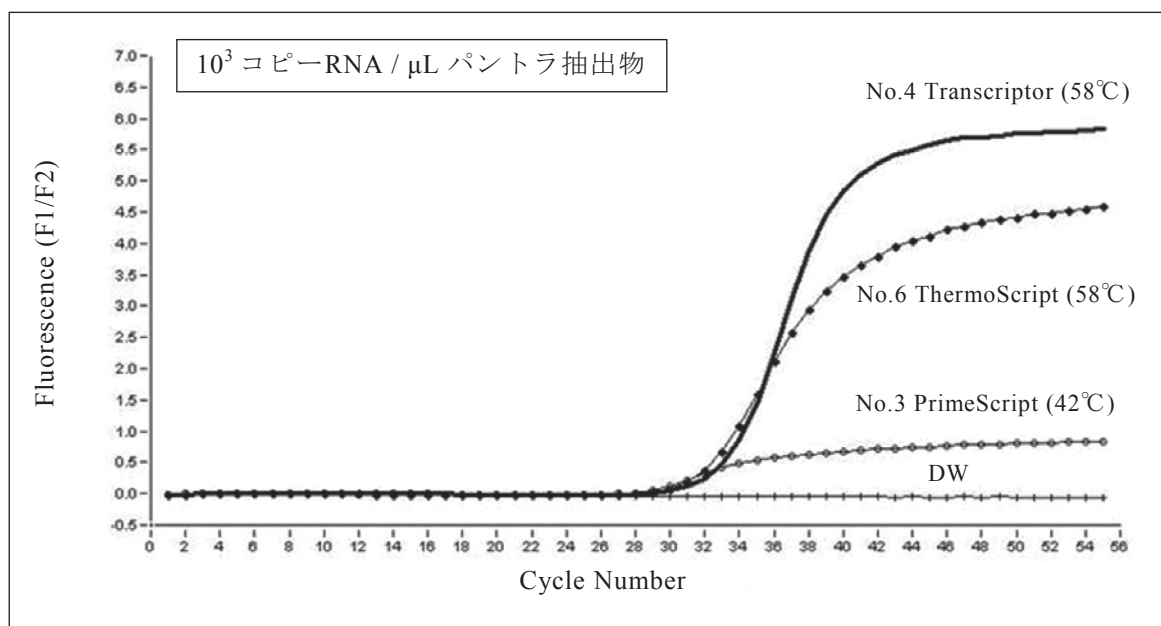


図 5A 高温逆転写酵素の比較 (1)

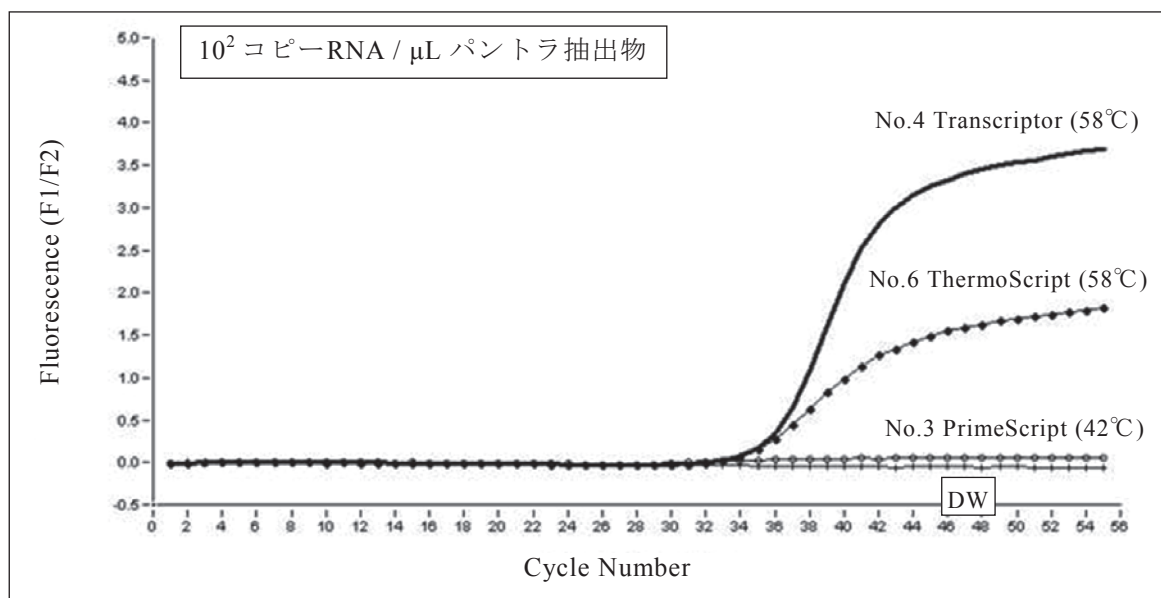


図 5B 高温逆転写酵素の比較 (2)

増幅効率は低かった。

次に図 3～5 において real-time PCR で検討した被検体を、先に最適化を済ませた conventional PCR で増幅して、非特異反応の有無を確認した (図 6)。37℃で反応を行う酵素ではバンドが観察されず (図 6 左), 42℃で反応を行う酵素では低濃度の被検体になると黄色ブドウ球菌のバンド (16s リボソーム) が出現した (図 6 中列)。高温逆転写酵素を用いた場合 (図 6 右列), 55℃の反応では黄色ブドウ球菌のバンドが若干認められたものの, 58℃では NoV のバンドのみが観察された。

### 3.3 抽出した RNA 溶液に対する DNase 処理法の検討

高温逆転写反応によって, 黄色ブドウ球菌由来の遺伝子等に起因する非特異反応を抑制することが可能となったが, 陰性検体を semi-nested PCR で再増幅した場合に, NoV とは無関係のバンドが出現することがあった。こうした非特異バンドは, real-time PCR (ハイブリ試験に相当) では反応しないことから誤判定には至らないものの, 増幅サイズによっては一時的な混乱をきたすおそれがあるため, 逆転写反応の前に DNase 処理を行うことが推奨されている。一方で, 一般に広く用いられている DNase I を用い

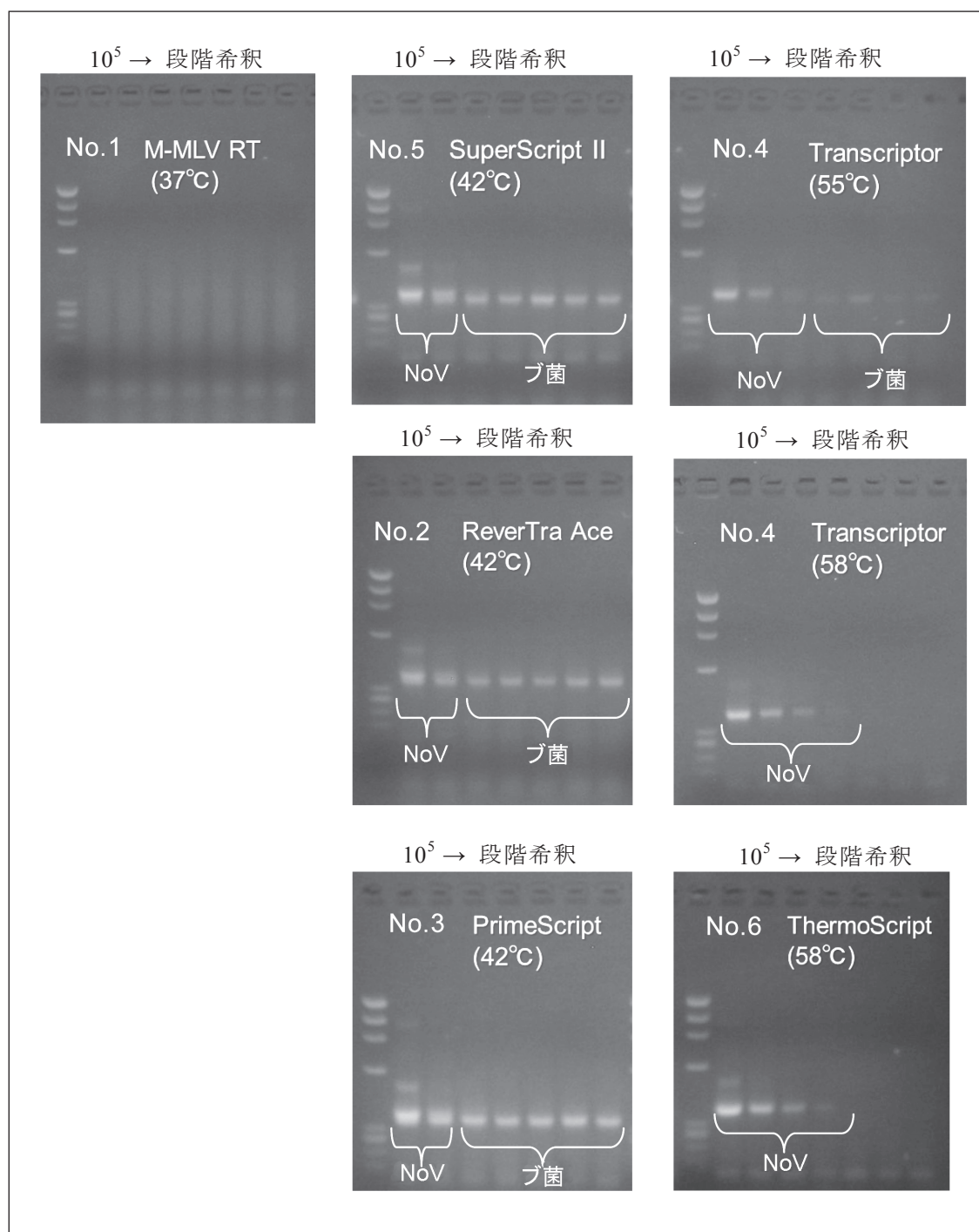


図6 増幅バンドにおける逆転写酵素と反応温度の影響

・10<sup>5</sup>コピー/μLのNoV RNAをパントラ抽出物で段階希釈したものを、各種酵素で逆転写し、COG2F/G2SKRのプライマーセットとAptaTaq（抗Taq抗体添加）によりPCRを行った。各No.は表2に記載した酵素を示す。増幅したDNA断片をシーケンスすることでNoVのバンドであるか否かを確認した。

たプロトコルでは、反応後に不要となったDNase Iを失活させるために75°C 5分の加熱処理が必要であり、そのことがウイルスRNAの分解をもたらすというジレンマが指摘されている。加熱によるRNA分解は、リボースのOH基の求核置換反応に由来するものであり、純粋

に化学的であることからRNase inhibitorの添加では防ぐことができない。従って、解決策として加熱を行わない方法を考案する必要がある。方法の1つとして、北極海に生息するエビ由来の易熱性DNase (HL-dsDNase)の有用性に着目した。この酵素は37°Cで2本鎖DNAを特異的

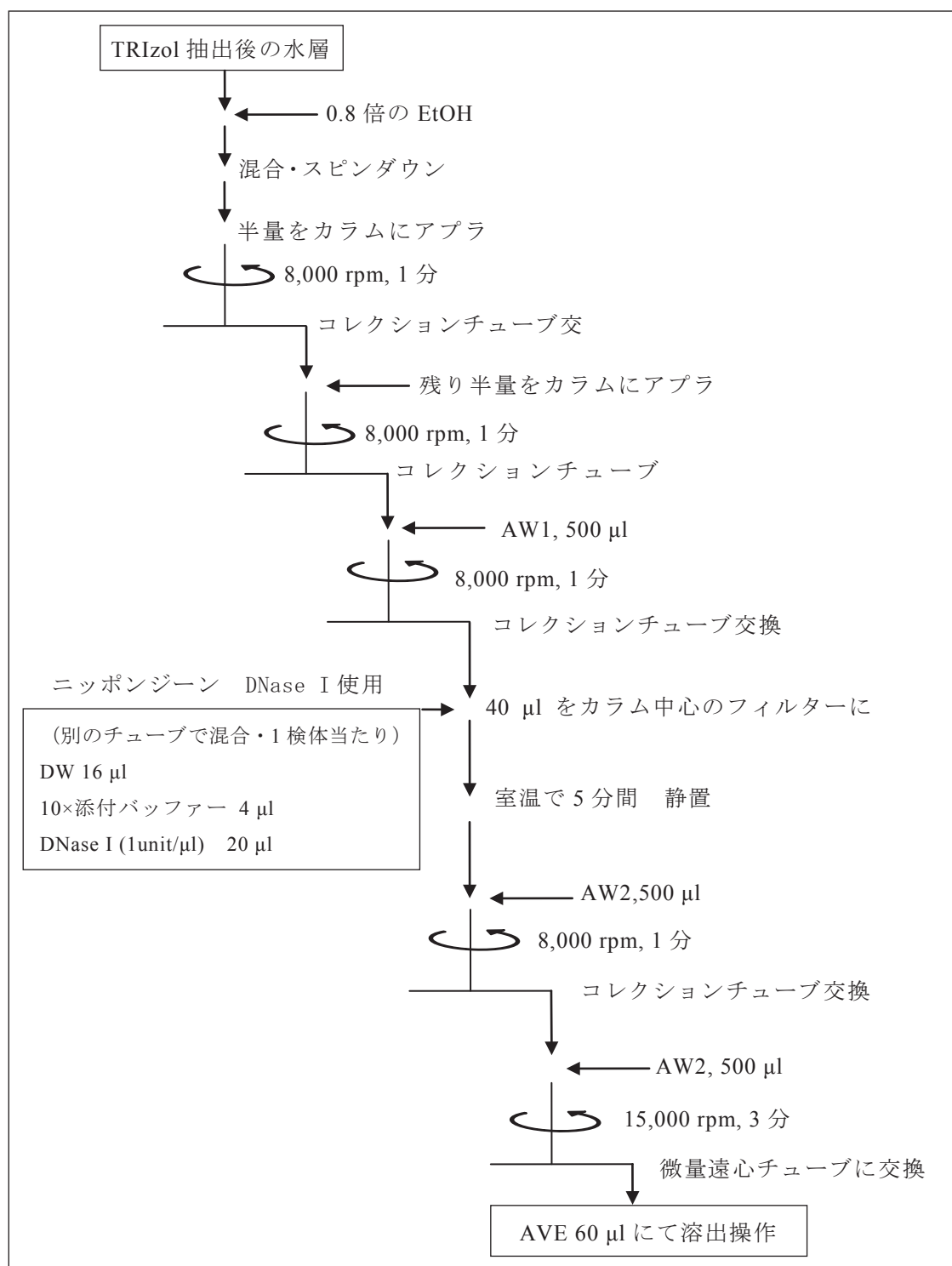


図 7 QIAamp Viral RNA Mini Kit へのオンカラム DNase I 処理の組み込み

に分解し、50℃で活性を示さなくなり、55℃で不可逆的に失活する性質を有している。従って、先に最適化を済ませた 58℃での高温逆転写反応を組み合わせるならば、DNase 処理後に 75℃の加熱を行う必要はなくなる。なお、この酵素はまだ我が国では流通していないため、ノルウェーの ArcticZymes 社から直接取り寄せる必要

がある。そこで、一般的に流通している DNase I を用いた上で、加熱を行わない方法としてオンカラム処理を考案した。別メーカーの RNA 抽出キットの中には、オンカラム DNase I 処理工程が組み込まれているものもあるが、「QIAamp Viral RNA Mini Kit」にはそのプロセスがないため、改めて組込んだプロトコルを図 7 に示した。

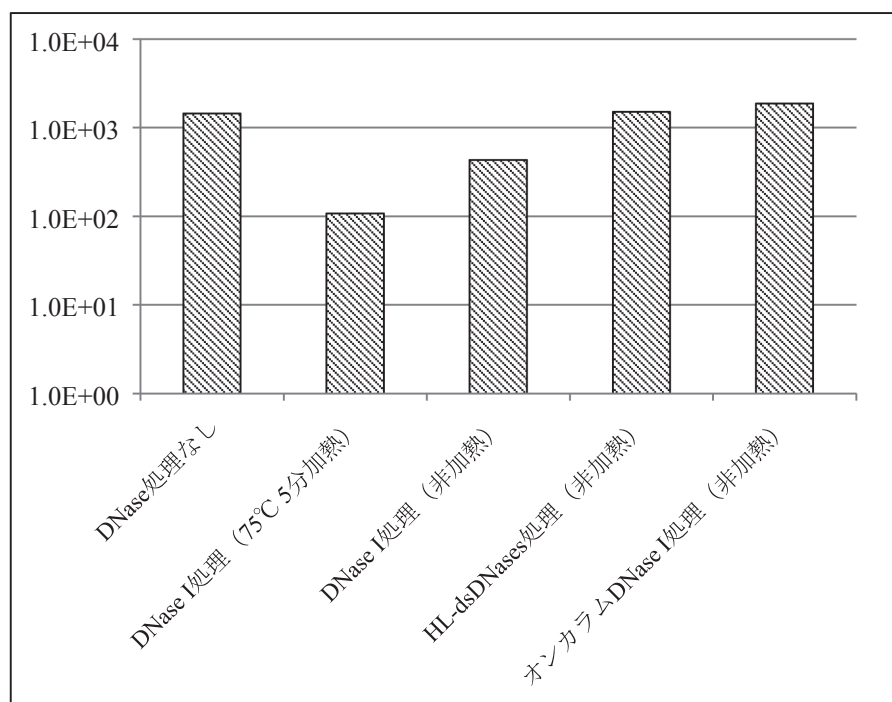


図 8A 蒸留水中の NoV RNA 量に及ぼす DNase 処理の影響

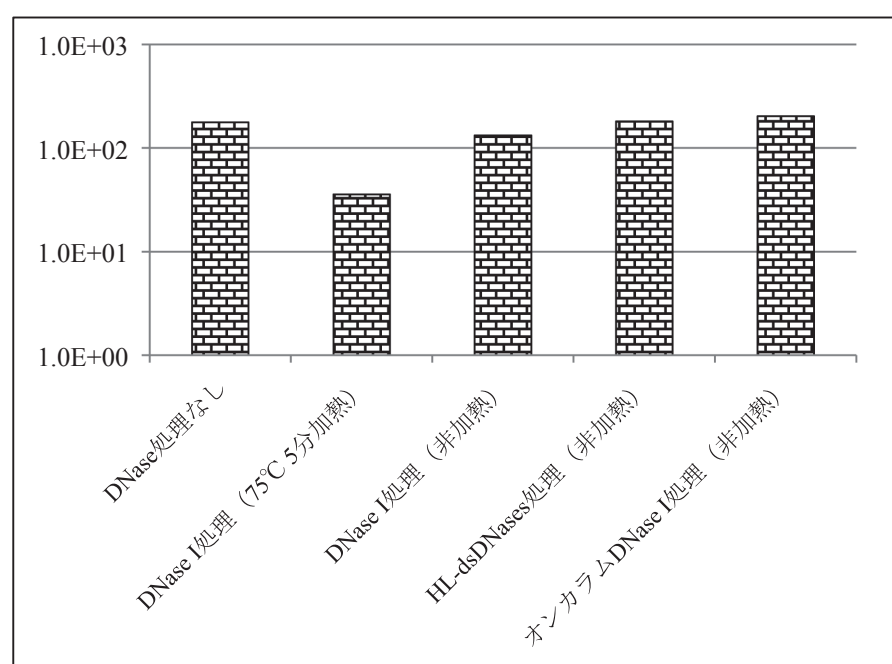


図 8B パントラ抽出物中の NoV RNA 量に及ぼす DNase 処理の影響

NoV RNA を含んだ蒸留水，またはパントラ抽出物に対して上記の DNase 処理を行い，先に最適化を済ませた高温逆転写反応(表 2 の No.4)によって cDNA を合成した後，real-time PCR でコピー数を測定した結果を図 8A と図 8B に示した。DNase 処理を行わなかった場合と比較して，75°C 5 分の加熱を伴う DNase I 処理ではコピー数が 1/5～1/10 に減少した。単純に加熱を省い

た場合でも減少が見られた。一方，HL-dsDNase 処理とオンカラム DNase I 処理ではいずれもコピー数の減少は認められなかった。

### 3.4 $\alpha$ -Amylase 粉末の不溶性成分の残留に関する検討

食品中に多く含まれる炭水化物は物理化学的挙動が核酸（ポリリボース）と類似しているこ

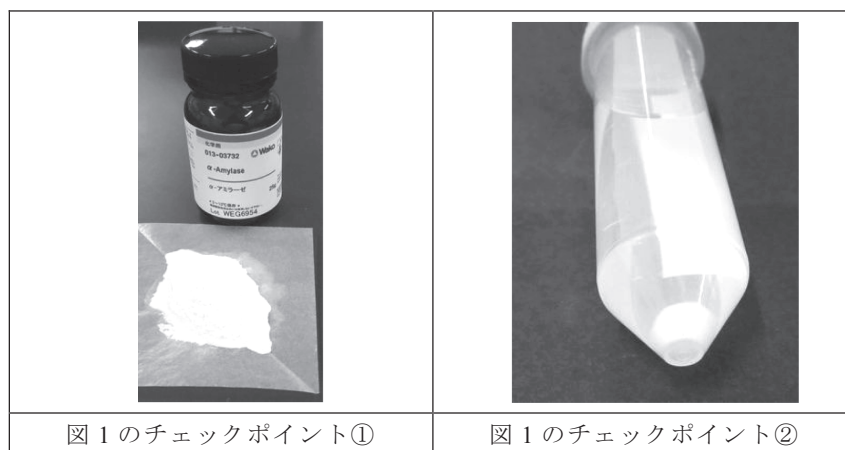


図 9 α-Amylase 粉末の不溶性成分

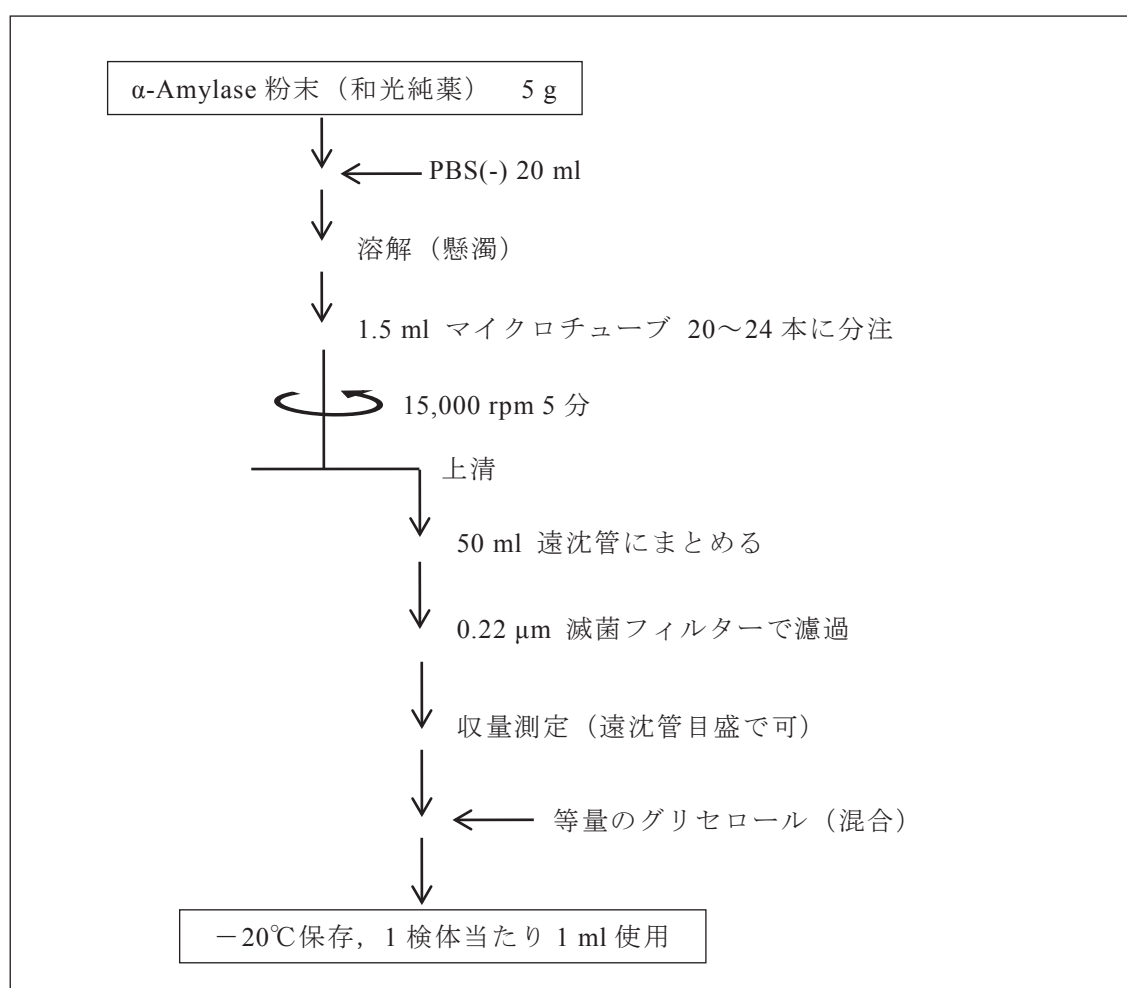
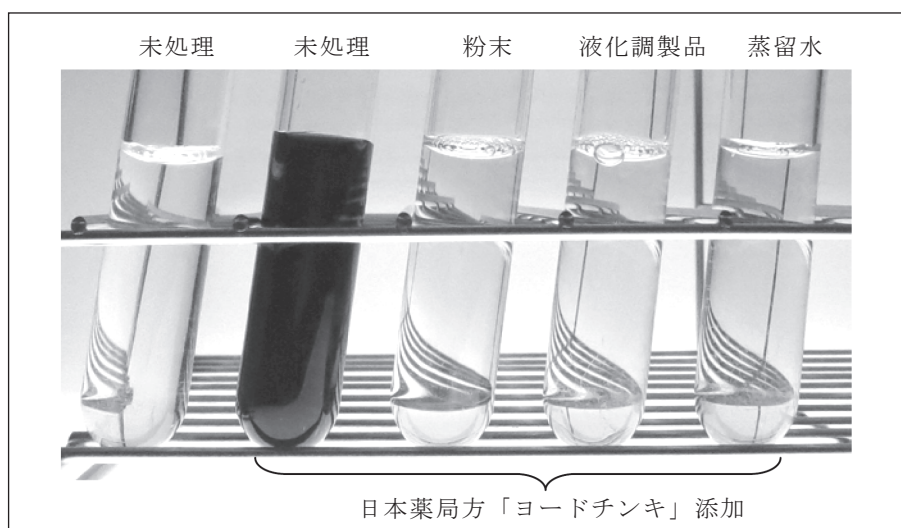
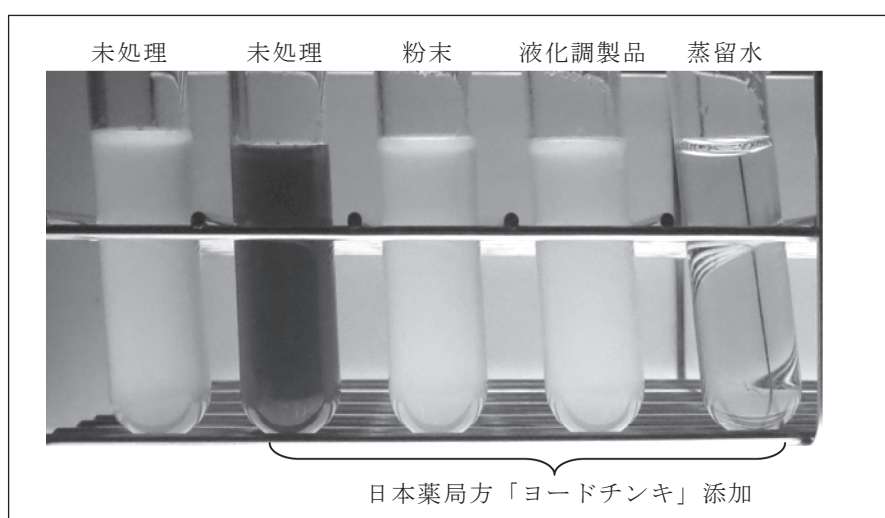


図 10 α-Amylase 粉末の液化調製手順

とから、PCR の阻害物質とされている。カキの検査法においても、混入しているグリコーゲンを分解するために α-Amylase 粉末が用いられている。パントラ法では、図 1 に示すとおりの α-Amylase 粉末を添加するプロセスがある。しかし、この粉末には不溶性成分が含まれており、

図 9 に示したとおり遠心によって沈澱してくる。メーカーに問い合わせたところ、不溶性成分は錠剤などの製造に使う賦形剤ということであった。具体的な成分は非公開であったが、一般的にメチルセルロースや無水ケイ酸などが用いられることが多い。遠心後に上清を丁寧に別チ



図 11A  $\alpha$ -Amylase 液化調製品の効果の確認 (ヨウ素デンプン反応・デンプン液)図 11B  $\alpha$ -Amylase 液化調製品の効果の確認 (ヨウ素デンプン反応・ポテトサラダ)

ューブに移し、不溶性成分を完全に取り除くようにすれば問題は起こらないが、手間がかかることからデカントで済ませるケースも想定されるこの場合、 $\alpha$ -Amylase の不溶性成分が以後の工程に残留することになり、最終的な検出精度に影響を及ぼすことがわかったため、その解決策を検討した。 $\alpha$ -Amylase をグリセロール溶液とした液体酵素製品もあるが、20  $\mu$ L 程度の反応系を想定しているため、50 mL のパントラ法のプロトコルで用いるにはコスト面において現実的ではない。そこで、 $\alpha$ -Amylase 粉末を液化調製する方法を考案した(図 10)。この  $\alpha$ -Amylase 液化調製品を  $-20^{\circ}\text{C}$  に 2 ヶ月保存した後、デンプンの分解効果を観察した。デンプン液(図 11A)とポテトサラダ(図 11B)のい

ずれにおいても、液化調製品を添加することによってヨウ素デンプン反応が消失した。

次にパントラ法のプロトコルにおいて、不溶性成分が残留した場合と、あらかじめ不溶性成分を取り除いた液化調製品を用いた場合とで検出結果への影響を比較した。図 12A の No.2 と No.3 は不溶性成分が認められた。TRIzol 抽出後の水層(図 1 のチェックポイント③)は無色透明であったが、カラムにアプライする直前にエタノールを添加したところ(図 1 のチェックポイント④)、不溶性成分に由来する白濁が生じた(図 12A)。一方、 $\alpha$ -Amylase 液化調製品を添加した場合にはこのような白濁は生じず、円滑に RNA 抽出工程を終えることができた。抽出した RNA を鋳型として、先に最適化を済ませた高



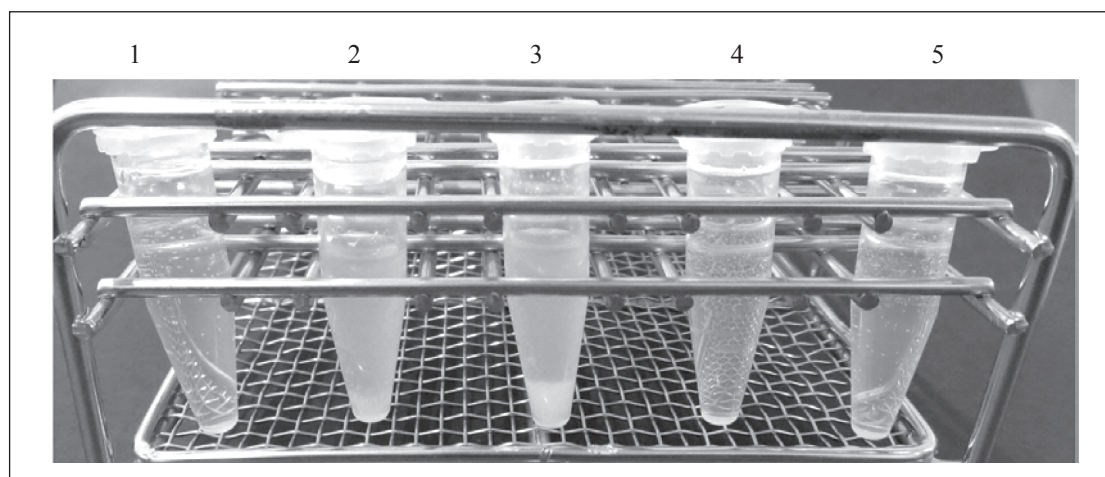


図 12A  $\alpha$ -Amylase 液化調製品の効果の確認 (RNA 精製カラムへのアプライ時)

- 1: 図 1 のチェックポイント①で  $\alpha$ -Amylase 粉末を加え、チェックポイント②において、スポイトを用いて上清を別チューブに丁寧に分取したもの
- 2: 図 1 のチェックポイント①で  $\alpha$ -Amylase 粉末を加え、チェックポイント②において、上清をデカントにより別チューブに移したもの
- 3: 図 1 のチェックポイント①で  $\alpha$ -Amylase 粉末を加え、その後の遠心を行わなかったもの
- 4: 図 1 のチェックポイント①で  $\alpha$ -Amylase 液化調製品を加え、チェックポイント②において、上清をデカントにより別チューブに移したもの
- 5: 蒸留水

温逆転写反応により cDNA を合成し、real-time PCR で検出を試みた結果を図 12B に示した。不溶性成分が残留した状態では、図 12A で白濁を生じただけではなく、PCR も阻害された。不溶性成分をあらかじめ除去した液化調製品を用いることで、こうした不都合がなくなり、検出結果を正常化することができた。

#### 4. 考察

##### 4.1 結果のバラつきが起こりやすい箇所

本法はすでに複数の実事例において食品からの NoV の検出に成功していることから、プロトコルとしては完成の域にあるものと考えられる。しかし、実施する機関が増えるにつれて、検出精度にバラつきを生じることになるため、あらかじめ対策を講じておくことが必要である。当初、結果のバラつきを生じやすい箇所として、パンソルビンの輸送中の凍結や、RNA 精製カラムにアプライする際に添加するエタノールの量についても想定していた。前者については、意図的に凍結融解を繰り返したパンソルビンを用いても結果に影響しないことが確認された。後者については、添加するエタノールの量を段階的に変えても結

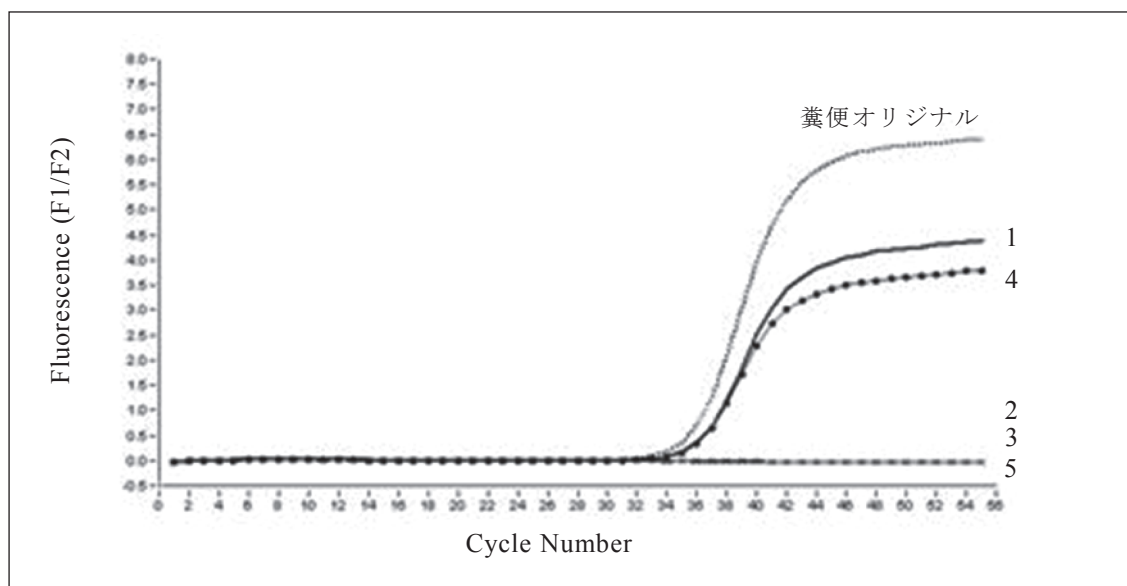
果は同じであった。そこで本研究では、結果に影響を及ぼすと考えられる箇所を次の 4 点に絞り、それぞれにおいて最適化を図った。

- (1)  $\alpha$ -Amylase 粉末の不溶性成分の混入
- (2) DNase 処理にともなう RNA 分解
- (3) 逆転写反応系の最適化
- (4) PCR 反応系の最適化

最適化は結果を逐次観察しながら行う必要があるため。検討の順番はプロトコルとは逆に (4) → (1) とした ((1) → (4) の検討では、最適化されていないプロセスを経た結果を見ることになり不正確)。

##### 4.2 PCR 反応系の検討

Real-time PCR に用いる試薬の比較検討は平成 24 年度に行っていることから、本研究では conventional PCR の試薬選定と反応条件の最適化について検討した。検討にあたっては、PCR を行う直前の段階である cDNA 合成までは問題がないことを前提としなければならなかった。そこで、結果に影響が及ぶ要因を排除するために、ウイルスを含まない食品から調製したパントラ抽出物をベースとし、そこに NoV の遺伝子

図 12B  $\alpha$ -Amylase 液化調製品の効果の確認 (増幅曲線)

※サンプル 1～5 の内容は図 12A を参照

配列由来の DNA 断片を加えた被検体を用いた。検出感度の検討のために段階希釈試験が一般的に行われているが、ここでは蒸留水で希釈する代わりにパントラ抽出物を使うことで、大量の黄色ブドウ球菌遺伝子の存在下という負荷的条件を設定している。また、将来的に偽陽性対策も視野に入れる必要があり、偽陽性の最大のリスク要因である遺伝子解析作業（電気泳動やゲルからの切り出し精製）と両立させるために、基質として dUTP を使えるように検討を進めた。PCR で用いる酵素（DNA polymerase）は、由来によってファミリー A とファミリー B に大別される。後者には、反応中に間違った塩基が取り込まれた場合にやり直すという校正活性があるが、前者にはない。しかし、同時にファミリー B に属する酵素には dUTP を取り込めないという性質もある。図 2A に示したとおり、dUTP を基質として用いることができる酵素はファミリー A に属するものだけであった。ファミリー A には校正活性がないため、塩基の読み間違いが発生（数万塩基に 1 つ）し、遺伝子解析の正確さが損なわれる懸念もある。しかし、通常行われている PCR 産物のダイレクトシーケンスでは、こうしたエラーはバックグラウンドノイズに含まれて顕在化しないため問題はないと考えられる。表 1 の反応系から dUTP を取り込んだものを抜き出し、さらにパントラ抽出物で負荷をかけた条件で検討したところ、図 2B

に示したとおり、ホットスタート仕様が必須であった。これは、大量に存在する黄色ブドウ球菌への非特異反応を抑えることが重要であることを示している。また、基質として dUTP を使用する場合には  $Mg^{2+}$  濃度を増やす必要があることも示された。dUTP は本来の塩基である dTTP よりも取り込み率が落ちることから、反応系に 3 倍量を加えることで対応している（dTTP:200  $\mu$ M, dUTP:600  $\mu$ M）。ヌクレオチドには弱いながらもキレート効果があるため、 $Mg^{2+}$  の実効濃度が低下する分だけ増量する必要があるものと考えられる。dUTP を用いた上で、蒸留水による段階希釈結果と同等の感度を有する反応系として、最終的に図 2C に示す 3 つが選択された。さらに利便性を考慮し、表 1 の No.12 を第一選択とした。dUTP を取り込んだ増幅断片は、Uracil-N-Glycosylase を作用させることで選択的に分解除去が可能であるため、偽陽性の防止に有効であるものと考えられる。

#### 4.3 逆転写反応系の検討

PCR 反応系の最適化の場合と同様に、逆転写反応直前の段階までは問題がないことを前提として検討を行う必要があることから、NoV RNA をパントラ抽出物で段階希釈した被検体を用いた。表 2 に示した酵素を用いて逆転写反応を行った後は、最適化の済んだ real-time PCR, または conventional PCR で結果を比較検討した。表

2 に示した逆転写酵素は、至適反応温度によって3つに分けられる。M-MLV（モロニー・マウス・白血病ウイルス）由来の逆転写酵素は、37℃で反応が行われる（表2のNo.1）が、これを改変して、反応温度を42℃に高めたものがNo.2, No.3, No.5である。一方、もともと至適反応温度が高いAMV（トリ骨髄芽球症ウイルス）由来の逆転写酵素を改変して、さらに高温反応を行えるようにしたものがNo.4とNo.6である。図3A, 図3B, 図3Cでは、RNAが低濃度であるほど、高温逆転写反応が有効であることが示されている。横軸からの立ち上がりサイクルに大きな違いはないものの、縦軸の蛍光強度に差が見られることから、高温になるほど増幅効率が高くなっているといえる。図3Aのように高濃度のRNAを増幅して検体中の初期コピー数（横軸に依存）を算定しても違いが現れないが、蛍光強度が低い（増幅効率が低い）反応系では検出限界において不利となる（図3B, 図3C）。次に高温逆転写反応の最適化を行ったところ58℃による反応が最も増幅効率が高かった（図4A, 図4B）。高温になるほど非特異反応は減るものの、プライマーのアニーリング効率も下がるため、総合的な増幅効率は両者のバランスで決まる。58℃という温度条件は、そのバランスの上に成り立っているものと考えられるが、高温逆転写反応が可能な酵素同士（表2のNo.4とNo.6）を比較したところNo.4の増幅効率が高かった（図5A, 図5B）。No.4の酵素にはRNaseH活性が残存しており、No.6の酵素では除去されているという違いがある。cDNA合成後は、鋳型となったRNA鎖は不要となり、むしろPCRの効率を悪くすることからRNaseH活性が残存している方が有利であるものと考えられる。

続いて、real-time PCRを用いて行った検討内容をconventional PCRにて行い、非特異反応の程度を比較した（図6）。37℃による逆転写反応系では増幅バンドが認められないが、これは図3A~図3Cにおいて蛍光強度が低かった結果と一致している。42℃の反応系では、高濃度のNoV RNAに対しては正しく増幅できるものの、低濃度では黄色ブドウ球菌の非特異増幅が優位となっている。このことは、図3B, 図3C, 図5A, 図5Bにおいて蛍光強度が低かった理由と

なる。このような黄色ブドウ球菌に対する非特異反応は55℃では若干残るものの、58℃では完全になくなり、NoV遺伝子だけが効率的に増幅できている。すなわち、real-time PCRにおいて蛍光強度が高かった結果を裏付けているものと考えられる。

#### 4.4 DNase 処理法の検討

これまでにカキ等のウイルス検査において、カキ本体由来のDNAを除去するために逆転写反応の前にDNase処理を行うことが推奨されてきた。パントラ法で抽出されたRNAにも大量の黄色ブドウ球菌由来のDNAが混入することから、非特異反応を抑制するためにもDNase処理は有効な手法と考えられる。しかし一方で、DNase処理で一般的に用いられる酵素であるDNase Iは、反応後の失活に75℃5分の加熱を必要とすることから、肝心のウイルスRNAが分解・減少してしまうという難点があった（図8A, 図8B）。極微量のウイルスRNAを扱う食品検査において、この問題は看過し得ないものと考えられる。また、単純に加熱を省いただけでは、残存するDNase Iによって、合成されたcDNAも損傷を受けるため根本的な解決にはなり得ない。そこで、50℃で活性がなくなり、55℃で不可逆的に失活する易熱性DNase（HL-dsDNase）を用いることで、75℃5分の加熱を行わずに逆転写反応に移行することができた。このプロセスを実行するためには、先に最適化を済ませた58℃の高温逆転写反応と組み合わせることが必須であり、42℃の逆転写反応は、活性を発現させたDNaseによってcDNAが損傷を受けるため不適当である。なお、この酵素は我が国で流通していないため、ノルウェーから直接取り寄せる必要がある。そこで一般的に用いられているDNase Iを用いた方法として、図7に示したオンカラム処理法を考案した。パントラ法のRNA抽出工程に組み入れることができるため、最も利便性が高いが、DNAウイルスであるアデノウイルスが想定されるケースでは使用できない。易熱性DNase処理とオンカラムDNase I処理のいずれにおいてもウイルスRNAの減少は認められなかった（図8A, 図8B）ことから、各機関の実状に合わせて選択することが可能である。



#### 4.5 $\alpha$ -Amylase の不溶性成分の影響に関する検討

パントラ法では食品中の炭水化物を分解除去するために  $\alpha$ -Amylase 粉末を添加しているが、この粉末には賦形剤が含まれているため完全には溶解しない（図 9）。その後の工程において、3,000 rpm 30 分の遠心によって食品残渣を沈澱除去する際に、この不溶性成分も一緒に取り除くことが可能であるが、そのためにはスポイトで上清を丁寧に別チューブに分離する必要がある。検体数が多い場合には、この操作はかなりの負担となり得る。しかし、デカントによって簡便に上清を分離した場合には、不溶性成分の残留は避けられず、精製カラムにアプライする直前にエタノールを添加した際に白濁を生じ（図 12A の No.2, No.3）、検出結果にも影響する（図 12B の No.2, No.3）。そこで、本研究では  $\alpha$ -Amylase 粉末から不溶性成分を除去して液化調製（図 10）することで問題解決を図った。液化調製した  $\alpha$ -Amylase は、粉末と同様に炭水化物を分解できることが確認された（図 11A, 図 11B）。また、精製カラムにアプライする工程において白濁せず（図 12A）、検出結果もこれまでの粉末を添加する方法と同等であった（図 12B）。これらの結果は、 $-20^{\circ}\text{C}$  で 2 ヶ月間保存した後の液化調製品を用いて得られたものであり、あらかじめ十分量を調製しておいても不都合はないことを示している。カキのウイルス検査の工程にも  $\alpha$ -Amylase 粉末が用いられているが、液化調製品に置き換えることで簡便化が図られるものと考えられる。

#### 4.6 今後の課題

本法は実際の食中毒事例に適用され、食品からのウイルス検出に成功しており<sup>22-25)</sup>、厚生労働省通知<sup>26)</sup>や食品衛生検査指針<sup>27)</sup>に記載されたことから、今後の普及が見込まれる。その一方で、実験室内汚染による偽陽性の問題が浮上してくることが想定される。本研究により効率的に遺伝子解析可能な DNA 断片を得ることができるようになったが、それは両刃の剣であることに留意する必要がある。すなわち、遺伝子解析を積極的に実施すれば、それだけ作業環境中の PCR 増幅産物汚染が蓄積されて、新規の食品検査において悪影響を及ぼすというジレンマである。これまでは、作業する実験室を分けて、

器具や試薬を分別使用するなど、実験操作を慎重に行うということ以外に積極的な偽陽性対策は取られてこなかった。しかし、食品のウイルス検査が現実的なものとなった段階では、その社会的な影響に鑑みて、一層の偽陽性対策を講じる必要があるものと考えられる。本研究により最終的に得られる DNA 断片にウラシルが含まれるようにデザインすることができたため、Uracil-N-Glycosylase 処理による偽陽性防止策を取ることが可能である。その方法の評価は今後の課題とする。

さらに、本法が有効に活用されるためには、適切な食品サンプルの確保が重要である。具体的には、実際に食卓に供せられる段階の検食（調理から盛り付けのプロセスを経たもの）を保存するという原則を、事業者に周知する必要がある。また、ウイルスは食品中では増えず付着するのみであることから、分取した食品サンプルに付着していなければ陰性となってしまう。そのため、サンプリングプランや、スケールアップの方法についても検討する余地が残されている。

#### 5. まとめ

本研究で得られた知見を総括すると次の 4 点に集約される。

第一に、パントラ法に添加する  $\alpha$ -Amylase はあらかじめ液化調製したものを用いる方が簡便で、その後のトラブルを防止できる。

第二に、黄色ブドウ球菌の DNA を除去するためには RNA 抽出時にオンカラム DNase I 処理を行うか、抽出後に易熱性 DNase 処理を行うことが有効である。いずれの方法も非加熱であるため、RNA の分解・減少は起こらない。

第三に、 $58^{\circ}\text{C}$  の高温逆転写反応を行うことで、黄色ブドウ球菌由来の RNA（16s リボソーム）に対する非特異反応を抑制できる。

第四に、PCR の反応系を適切に選択（酵素の種類、ホットスタート仕様、Mg 濃度）することで、増幅効率を最適化でき、将来的な偽陽性対策の布石として dUTP を用いることができる。

#### 参考文献

- 1) 国立感染症研究所感染症情報センター、国立感染症研究所ウイルス第二部:ノロウイルス

集団発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.

- 2) 丸山務(監修): 改訂 ノロウイルス現場対策, 2007, 35-36.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 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(第1報), 福井県衛生環境研究センター年報, 7, 2008, 69-72.
- 8) 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.
- 9) 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.
- 10) 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.
- 11) 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.

- 12) 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.
- 13) 斎藤博之, 他: 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, 秋田県健康環境センター年報, 6, 2010, 59-69.
- 14) 斎藤博之, 他: 食品検体の病原ウイルス検出を可能にした汎用型パンソルビン・トラップ法の開発, 秋田県健康環境センター年報, 7, 2011, 43-53.
- 15) 斎藤博之, 他: パンソルビン・トラップ法による食品からのウイルス検出法, 病原微生物検出情報, 32, 12, 2011, 4-5.
- 16) 斎藤博之, 他: 食品中のウイルス検査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 食品の安全確保推進研究事業 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 総括・分担研究報告書, 2011, 45-57.
- 17) 斎藤博之: 食品のノロウイルス検査の汎用化を目指したパンソルビン・トラップ法の開発, 日本食品微生物学会雑誌, 29, 1, 2012, 32-37.
- 18) 斎藤博之, 他: パンソルビン・トラップ法によって食品検体から検出されたノロウイルスの遺伝子解析法の開発, 厚生労働科学研究費補助金 食品の安全確保推進研究事業 食品中の病原ウイルスのリスク管理に関する研究 平成24年度 総括・分担研究報告書, 2013, 35-48.
- 19) 野田衛, 他: パンソルビン・トラップ法が多機関評価試験結果, 厚生労働科学研究費補助金 食品の安全確保推進研究事業 食品中の病原ウイルスのリスク管理に関する研究 平成24年度 総括・分担研究報告書, 2013, 77-110.
- 20) Kojima S., et. al.: Genogroup-specific PCR

- primers for detection of Norwalk-like viruses. J. Virol. Method, **100**, 2002, 107-114.
- 21) Kageyama T., 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.
- 22) 三好龍也, 他: 食品中からノロウイルス遺伝子が検出された食中毒事例, 病原微生物検出情報, **32**, 12, 2011, 13-14.
- 23) 飯塚節子, 他: パンソルビン・トラップ法による食品からのノロウイルス遺伝子の検出ー弁当屋を原因施設としたノロウイルス集団食中毒事例ー, 厚生労働科学研究費補助金 食品の安全確保推進研究事業 食品中の病原ウイルスのリスク管理に関する研究 平成 24 年度 総括・分担研究報告書, 2013, 175-180.
- 24) 古田敏彦, 他: 浜松市内におけるノロウイルス集団食中毒事例, 病原微生物検出情報, **35**, 7, 2014, 4-5.
- 25) 土屋祐司, 他: パンと原因としたノロウイルス集団食中毒事例, 日本食品微生物学会雑誌, **32**, 3, 2015, 153-158.
- 26) 厚生労働省通知: 「ノロウイルスの検出法について」の一部改正について, 食安監発 1022 第1号, 平成 25 年 10 月 22 日.
- 27) 斎藤博之, 他: 食品・臨床材料・拭き取りの前処理法, 食品衛生検査指針 2015 (微生物編), 2015, 607-617.



食品中の残留農薬及び残留動物用医薬品の一斉分析法に関する研究（平成 24～26 年度）

## 畜水産物中の動物用医薬品一斉分析法の検討及び妥当性評価について

松淵亜希子      今野禄朗      珍田尚俊\*<sup>1</sup>

動物用医薬品 115 成分を対象に、より効率的な一斉分析法を構築するため、抽出操作や固相カラムによる精製等の検討を行った。抽出操作については簡略化のため、ガラスビーズと抽出溶媒を加えた使い捨て遠心管内での振とう抽出法を採用した。また、検討の結果、精製に用いる固相カラムは、オクタデシルシリル化シリカゲルが最適であり、溶出液には、酸性と塩基性の 2 種類の溶媒を使用する必要があった。

検討した分析法について、厚生労働省のガイドラインに基づき、7 食品（鶏肉、豚肉、牛肉、さけ、鶏卵、牛乳、はちみつ）の妥当性評価試験を実施した（添加濃度 0.01 及び 0.04 µg/g、分析者 2 または 3 名が 2 濃度添加試料を 1 日 2 試行、3 または 2 日間分析）。

ガイドラインの目標値を満たした成分の割合は、鶏肉、豚肉、牛肉、さけ、鶏卵で約 8 割、牛乳及びはちみつで約 9 割となり、概ね良好な結果が得られた。本法は高精度な迅速一斉分析法として有用と考えられた。

### 1. はじめに

抗生物質や駆虫薬等の動物用医薬品は、畜水産物の病気の治療や予防のために使用され、生産性の向上に寄与している。一方、適切に投与されずに畜水産食品へ残留した場合、ヒトへの健康被害や耐性菌の発現を引き起こす可能性がある。

動物用医薬品の規制は、平成 18 年からポジティブリスト制となり、規制対象品目が大幅に増加した。このため、多数の動物用医薬品を迅速かつ精度よく検出する一斉分析法が求められている。さらに食品衛生法の規格基準への適否の判断に用いる分析法については、厚生労働省のガイドライン<sup>1,2)</sup>に準じ、妥当性評価試験を行うことが必須となった。

当センターの動物用医薬品の検査は、通知法<sup>3)</sup>を改良した独自法<sup>4,5)</sup>で対応してきたが、一部操作が煩雑なことや精製が不十分なこと等の問題があった。そこで、一斉分析法の導入にあたり操作を効率化し、なおかつ精製効果を高めるため、抽出方法や固相カラムによる精製等について検討した。検討の結果、より迅速で高精度な新規一斉分析法を構築することができた。併せて妥当性評価試験を実施し、妥当性を確認したので報告する。

### 2. 方法

#### 2.1 試料

ガイドラインの例示を参考に、鶏肉、豚肉、牛肉、さけ、鶏卵、牛乳、はちみつの 7 種類を試料とした。

鶏肉、豚肉、牛肉は試料量に対して半量の水を加え、フードプロセッサーでペースト状になるまで磨砕均一化した。さけ、鶏卵は水を加えず、そのまま磨砕均一化した。牛乳、はちみつは最初から均質な状態であるため、そのまま用いた。

磨砕均一化した後、50 mL ポリプロピレン製遠心管に 5.0 g 相当量（はちみつ 2.0 g）になるように量り、-30℃で凍結保存した。使用する日の前日または当日に解凍した。

#### 2.2 対象成分

表 3 に示した、動物用医薬品 115 成分を対象とした。

#### 2.3 標準液及び試薬等

標準液は、市販の混合標準液と個別標準品を組み合わせて調製した。

混合標準液は林純薬株式会社（以下、林純薬）製の PL 動物薬 LC/MS Mix1（サルファ剤、葉酸

\*1 秋田県農林水産部水産振興センター資源部

合成拮抗剤), PL 動物薬 LC/MS Mix2 (キノロン剤) 各 20 µg/mL, 和光純薬株式会社 (以下, 和光純薬) 製の動物用医薬品混合標準液 (マクロライド), 動物用医薬品混合標準液 (ホルモン剤) 各 20 µg/mL を使用した。

個別標準品は, 和光純薬製のベンジルペニシリン, アンピシリン, オキサシリン, ジクロキサシリン, セファピリン, セファゾリン, セフォペラゾン, ミロサマイシン, ジョサマイシン, フェベンダゾール, フェバンテル, オクスフェンダゾール, オクスフェンダゾールスルホン, プラジクアンテル, モランテル, フルベンダゾール, オキシベンダゾール, トリクラベンダゾール, トリクラベンダゾールオキソン, チアベンダゾール, 5-ヒドロキシチアベンダゾール, メベンダゾール, レバミゾール, クロピドール, ベンゾカイン, アザペロン, プロチゾラム, キシラジン, トルフェナム酸, メロキシカム, ケトプロフェン, カルプロフェン, フルニキシン, ヒドロコルチゾン, ベタメタゾン, クロルマジノン, 酢酸メレンゲステロール, ノボビオシン, リンコマイシン, リファキシミン, メンブトン, トリペレナミン, ファムフル, エトバペート, ロキササルゾン, セファロニウム, セフキノム, フェノキシメチルペニシリン, クロキサシリン, セフキノム, クロラムフェニコール, フロルフェニコール, チアムフェニコール, オキシクロザニド, クロルスロン, ジニトルミド, ジクラズリル, 林純薬製のマホプラジン, 関東化学株式会社製のメシリナム, ナフシリン, オレアンドマイシン, ナイカルバジン, 畜水産品残留安全協議会製のアルトレノゲスト, バージニアマイシン, プリフィニウムを使用した。これらの個別標準品はアセトニトリル, N,N-ジメチルホルムアミド等を用いて 200~500 µg/mL に調製した。

全ての混合標準液と個別標準液と合わせ, 1 µg/mL となるようにアセトニトリルで希釈し, 混合標準液とした。

溶媒は, 和光純薬製のアセトニトリル (残留農薬分析用及び LC/MS 用, 以下 MeCN), メタノール (残留農薬分析用, 以下 MeOH), 水 (LC/MS 用), N,N-ジメチルホルムアミド (Infinity Pure) を用いた。試薬は和光純薬製の酢酸アンモニウム (特級), ぎ酸 (LC/MS 用),

25%アンモニア水 (特級) を用いた。

精製用カラムは, GL サイエンス株式会社製のオクタデシルシリル化シリカゲルカラム (InertSep C18; 500 mg/6mL, 1000 mg/6mL, 以下 C18 カラム), アミノプロピルシリル化シリカゲルカラム (InertSep NH2; 500 mg/6 mL, 以下 NH2 カラム), エチレンジアミン-N-プロピルシリル化シリカゲルカラム (InertSep PSA; 500 mg/6mL, 以下 PSA カラム) を用いた。除粒子用メンブランフィルターは ADVANTEC 社製 DISMIC (孔径 0.2 µm, 親水性 PTFE) を用いた。ガラスビーズはアズワン社製の直径 2.5~3.5 mm のものを用いた。

## 2.4 器具及び装置

フードプロセッサは日立製作所製日立クッキングカッターFV-F3, 高速ホモジナイザーは DREMEL 社製 MH-1000 を用いた。遠心分離機は日立工機製 himacCR20GIII, Sigma 社製 Sigma 1-15K を用いた。アルミブロック恒温槽は, EYELA 製 MG-2100 を用いた。

LC-MS/MSはAgilent Technologies社製Agilent 1100 (高速液体クロマトグラフ) 及び Sciex 社製 API4000 (質量分析装置) を用いた。

## 2.5 測定条件

分析カラムは, 化学物質評価研究機構製の L-column 2 (2.1 mm i.d×150 mm, 粒子径 3 µm) を使用した。

移動相は, A 液に 0.1%ぎ酸水溶液, B 液に MeCN を使用した。カラム温度は 40℃, 流速は 0.2 mL/min, 注入量は 10 µL とした。

イオン化法は ESI によるポジティブ (Positive) 及びネガティブモード (Negative) で行い, 分析モードは Scheduled Multiple Reaction Monitoring (Scheduled MRM) とした。

イオンスプレー電圧は 5 kV (Positive), -4 kV (Negative) とし, イオン源温度は 500℃ (Positive), 400℃ (Negative) とした。

HPLC のグラジエント条件は, Positive : 0 min (B 液 5%) → 1 min (25%) → 3 min (25%) → 12 min (65%) → 14 min (65%) → 18 min (95%) → 21 min (95%) → 21.5 min (5%) → 30 min (5%), Negative : 0 min (B 液 5%) → 0.5 min (5%) → 1 min (40%) → 3 min (40%) → 10 min (95%)

→15 min (95%) →15.1 min (5%) →25 min (5%)  
とした。

MRM 条件は 50~100 ng/mL の範囲で調製した各対象成分の標準溶液をシリンジポンプを用いて直接 MS/MS に注入し、自動最適化により決定した。自動最適化の結果、感度が最も良好であったイオンを選択し、定量用イオンに設定した(表 3)。

## 2.6 試験溶液の調製

試験溶液の調製法を図 1-1、1-2 に示す。

### 2.6.1 鶏肉、豚肉、牛肉、さけ、鶏卵、牛乳の調製

試料にガラスビーズ約 3 g, MeCN/0.1% ぎ酸水溶液 (9:1) 混液 20 mL (鶏卵は MeCN/0.1% ぎ酸水溶液 (7:3) 混液 15 mL, 牛乳は MeCN 15 mL) を加え、手で 1 分間激しく振とうした。振とう後、遠心分離 (1300×g, 5 分間, 10℃) を行い、上清を 50 mL 容メスフラスコ (鶏卵、牛乳は 25 mL 容) に移した。残留物に上記の混液 15 mL (鶏卵、牛乳は各液 7 mL) を加え、振とう及び遠心分離を行い、上清を合わせた。これに pH 調整のための 1M 酢酸アンモニウム水溶液 200 μL を加え、MeCN で 50 mL (鶏卵、牛乳 : 25 mL) に定容した。

鶏肉、豚肉、牛肉、さけについては定容した抽出液は濁りがみられたため、約 6 mL を別に採り、遠心分離 (1300×g, 5 分間, 10℃) を行い、透澄な液を得た。次に透澄な液 5 mL を 1 mL メス付きガラス試験管に移し、窒素気流下で濃縮し、MeCN で 1 mL に定容した。

鶏卵、牛乳は、約 4 mL を別に採り、遠心分離を行い透澄な液を得た。

C18 カラム (1000 mg) に、MeCN 5 mL, MeCN/水 (4:1) 混液 5 mL を順に注入し、コンデショニングを行った。これに定容した上清のうち、試料 0.4 g 相当の 0.8 mL (鶏卵、牛乳 : 2 mL) を負荷した。0.2% ぎ酸含有 MeCN/水 (4:1) 混液 7 mL, 0.5% アンモニア含有 MeCN/水 (4:1) 混液 3 mL を順に注入し、全てのろ液を 2 mL メス付きガラス試験管に回収した。回収したろ液に 1 M 酢酸アンモニウム水溶液 100 μL を加え、窒素気流下、1 mL 以下まで濃縮した。

濃縮したろ液に、MeCN 600 μL を加え、さら

に水で 2 mL に定容した。これをフィルターに通し、試験溶液とした。定容後、試験溶液が白く濁る場合は、遠心分離 (10,000×g, 10 分間, 0℃) を行い、得られた透澄な液をフィルターに通し、試験溶液とした。

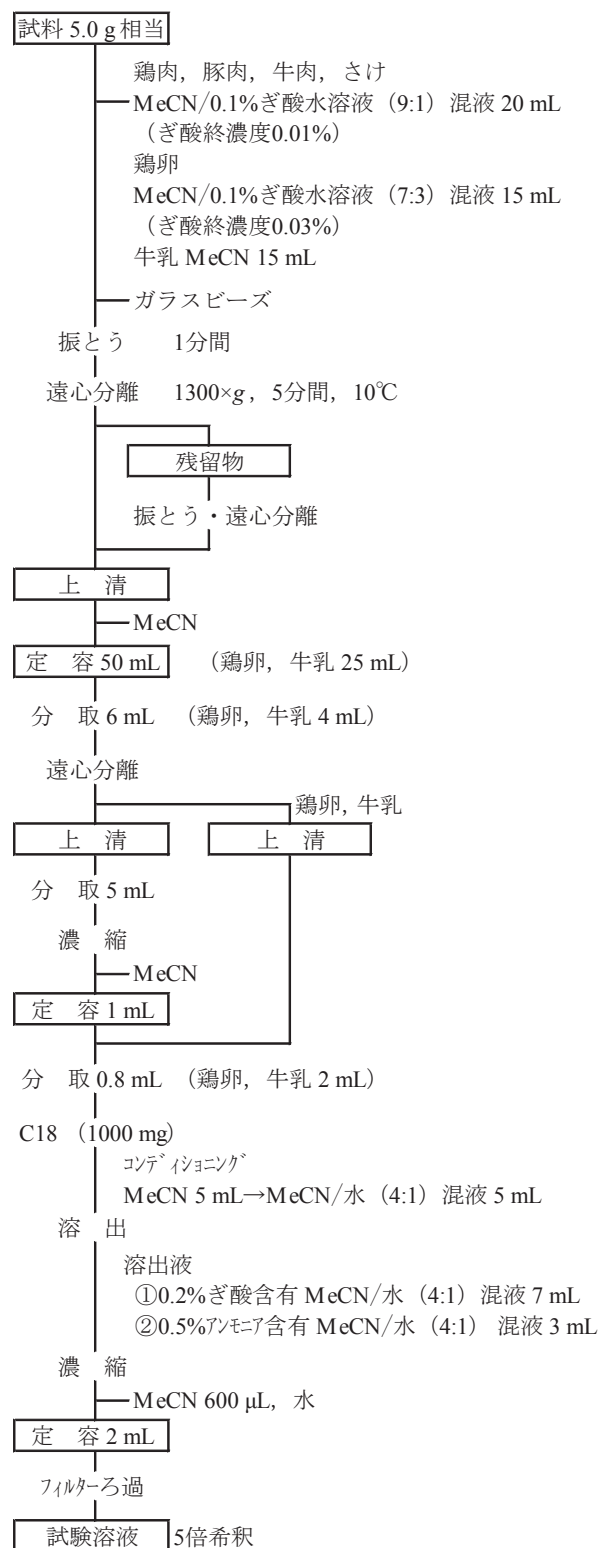


図 1-1 試料溶液の調製フロー

## 2.6.2 はちみつの調製

試料に 30 mM 酢酸アンモニウム水溶液 8 mL を加え、完全に溶解するまで手で激しく振とうし、上記の水溶液で 10 mL に定容した。これを全量別に採り、遠心分離（1300×g, 5 分間, 10℃）を行い、透澄な液を得た。

C18 カラム（500 mg）に、MeCN 3 mL, 水 6 mL を順に注入し、コンディショニングを行った。これに上記の液 2.0 mL（試料 0.4 g 相当）を負荷し、溶出液を捨てた。さらに水 3 mL を注入し溶出液を捨てた。

0.2% ぎ酸含有 MeCN/水（4:1）混液 5 mL, 0.5% アンモニア含有 MeCN/水（4:1）混液 2 mL を順に注入し、全てのろ液を 2 mL メス付きガラス試験管に回収した。回収したろ液に 1 M 酢酸アンモニウム水溶液 100 μL を加え、窒素気流下、1 mL 以下まで濃縮した。濃縮したろ液に、MeCN 600 μL を加え、さらに水で 2 mL に定容した。これをフィルターを通し、試験溶液とした。

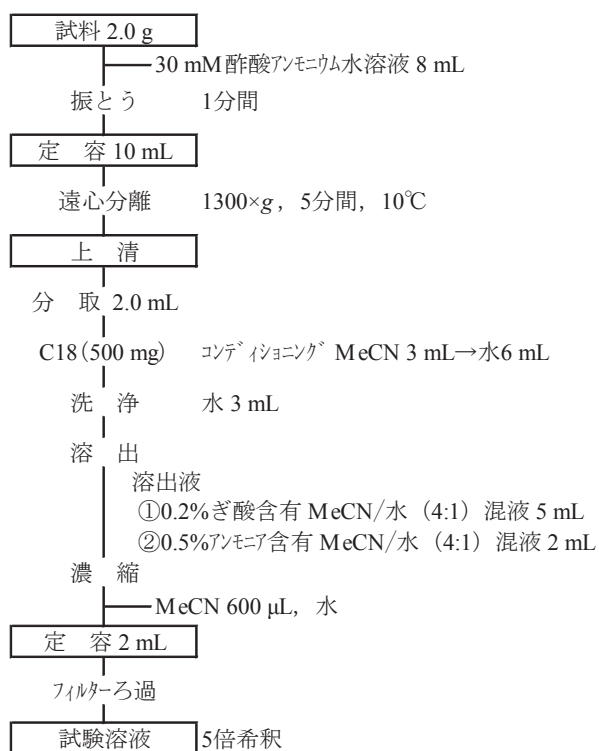


図 1-2 試料溶液の調製フロー（はちみつ）

## 2.7 定量法

検量線はマトリックス添加検量線とし、濃度範囲は 0, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 20 ng/mL とした。混合標準溶液 20 μL を 1 mL メスフラスコに採り、対象成分を添加していない各食品の試験溶

液（以下マトリックス溶液）を用いて定容し 20 ng/mL 液とした。この 20 ng/mL 液をマトリックス溶液で 10, 5, 1 ng/mL となるように希釈した。さらに 1 ng/mL 液を 0.5, 0.1 ng/mL となるように希釈した。0 ng/mL はマトリックス溶液を用いた。全ての成分で良好な直線性 ( $r = 0.99$  以上) が得られた。

異性体混合物のチルミコシンとモランテル、各異性体が単独の  $\alpha$ -トレンボロンと  $\beta$ -トレンボロンについては、今回のグラジエント条件では、各ピークが近接しているため、まとめて 1 ピークとして定量した。

## 2.8 妥当性評価試験

妥当性評価試験は、ガイドライン及び当センターの業務管理規定に準拠した。

添加濃度は 2 濃度とし、混合標準液を試料中濃度が 0.01 及び 0.04 μg/g となるように各試料に添加し、30 分以上経過してから試料の前処理を行った。

妥当性評価試験は、分析者 3 名が 2 試行 2 日間（鶏肉、豚肉、鶏卵、牛乳、はちみつ）及び分析者 2 名が 2 試行 3 日間（牛肉、さけ）分析する計画により実施した。得られた結果は、Microsoft Excel を用いて一元配置の分散分析による解析を行い、真度、併行精度、室内精度を求めた。

選択性については、食品毎のブランク試料のピーク面積が、添加濃度 0.01 μg/g に対応する濃度の標準液（2 ng/mL）から得られるピーク面積の 1/3 未満であることを条件とした。

定量限界は  $S/N \geq 10$  となる検量線（食品毎のマトリックス添加検量線）の最小濃度とし、添加濃度 0.01 μg/g 以下であることを条件とした。

## 3. 結果及び考察

### 3.1 抽出溶媒の検討

動物用医薬品の抽出溶媒には、MeCN や MeOH, 水との混液で使用されることが多い<sup>3,6~9)</sup>。今回の対象成分のうち  $\beta$ -ラクタム及びセフェム系抗生物質において、MeOH 中で分解がみられたため、MeCN を用いることにした。ただし、MeCN のみではタンパク質が凝固し、抽出操作に支障が生じたため、水を混ぜることにした。



また、除タンパク効果を上げるため、不揮発性のメタリン酸の代わりにぎ酸を用いた<sup>10)</sup>。酸の濃度は 0.1~1% 前後で調製される例が多いが<sup>11,12)</sup>、酸性下で不安定な成分があるため<sup>13,14)</sup>低濃度の方の 0.1%とした。

次に、組成の異なる MeCN と 0.1%ぎ酸水溶液の混液をいくつか調製し、それらを鶏肉と鶏卵に加え、高速ホモジナイザーによる攪拌を試みた。その結果、鶏肉 9:1、鶏卵 7:3 のとき、十分な攪拌ができた。牛乳は水分が多く、MeCN のみで十分な攪拌ができた。

はちみつについては、MeCN-水混液を加えると、主成分の糖類が固化するため<sup>15)</sup>、30 mM 酢酸アンモニウム水溶液 (pH6) を用いることにした。

各溶媒での抽出効率を確認するため、鶏肉、鶏卵、牛乳の各 5 g に混合標準液を 0.2 µg/g とするように添加し、回収試験を実施した (各 n=1)。

攪拌抽出を 2 回行い (鶏肉: 20 mL×2、鶏卵、牛乳: 15, 7 mL)、水で 40 倍に希釈した試験溶液を測定した。結果を図 2 に示す。3 試料とも 8 割以上の成分で回収率 70~120%内であった。

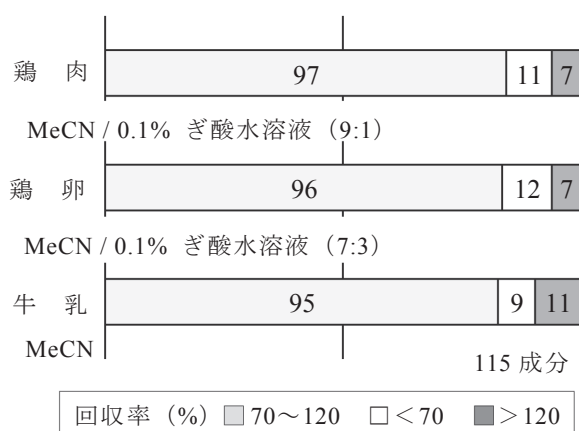
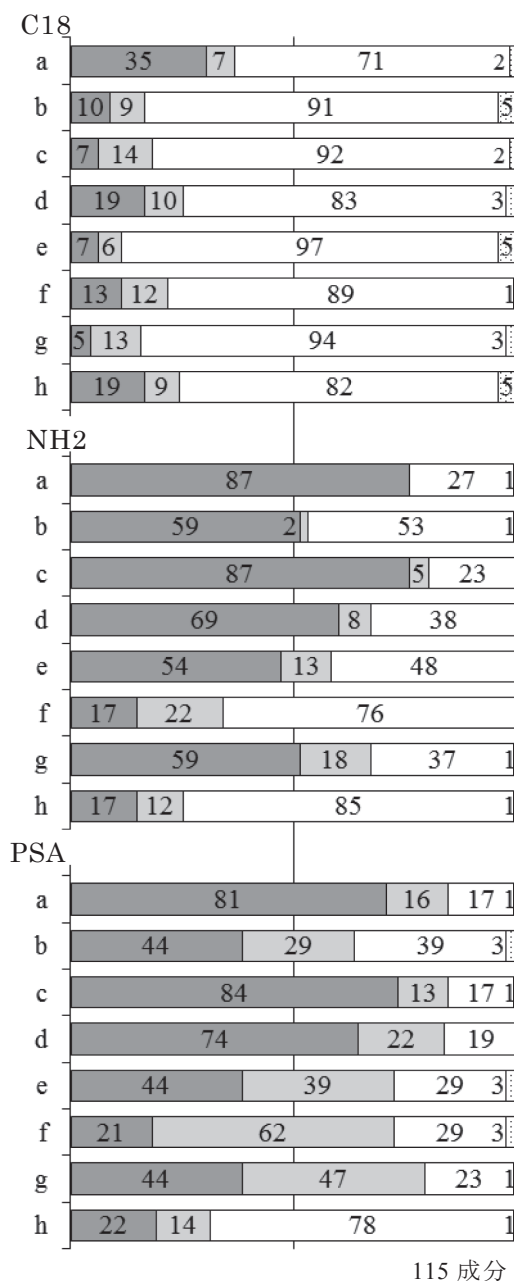


図 2 各抽出溶媒による回収試験結果 (n=1)

### 3.2 精製の検討

畜水産物に多く含まれる脂質を効率よく除去するため、固相カラムでの精製方法を検討した。固相カラムには C18, PSA, NH2 カラム (各 500 mg) を選択し<sup>3,16)</sup>、目的成分を効率よく回収するため、組成の異なる 8 種の溶出液を調製し、溶出試験を行った (各 n=1)。

20 ng/mL に希釈した混合標準液 1 mL を各カラムに負荷し、各溶出液 5 mL を注入した。次に、溶出したろ液を濃縮し、水で 2 mL に定容したものを測定した。結果を図 3 に示す。



- a MeCN  
b MeCN / 水 (4:1) 混液  
c 0.2% ぎ酸含有 MeCN  
d 0.5% アンモニア含有 MeCN  
e 0.2% ぎ酸含有 MeCN / 水 (4:1) 混液  
f 0.5% アンモニア含有 MeCN / 水 (4:1) 混液  
g 0.02% ぎ酸含有 MeCN / 水 (4:1) 混液  
h 2% アンモニア含有 MeCN / 水 (4:1) 混液

図 3 各固相カラムの溶出試験結果 (n=1)

3 種のカラムのうち、C18 カラムで溶出液 MeCN-水混液の場合に、最も多くの目的成分を溶出できた。弱陰イオン交換相の NH2 及び PSA カラムでは吸着が起き、溶出されない成分が多くあった。

C18 カラムにおいては、0.2%ギ酸含有アセトニトリル/水 (4:1) 混液 (e 液) による溶出が最も良好であった。一方、エリスロマイシン等の数個の成分では、塩基性のアンモニア含有 MeCN/水 (4:1) 混液 (f, h 液) による溶出の方が良好であった。

したがって、固相は C18 カラムを用い、e 及び f 液の 2 液で溶出することにした。また精製効果を上げるため、充填量 1000 mg を用いることにした。

はちみつの場合は、脂質を含まず糖分が多いため<sup>17)</sup>、C18 (500 mg) に一旦目的成分を保持させ、水 3 mL で糖分を洗浄してから、e 及び f 液で溶出することにした。洗浄水 3 mL では、溶出する目的成分が無いことを確認した。

### 3.3 抽出方法の省力化の検討

高速ホモジナイザーによる攪拌抽出（以下、攪拌抽出）では、試料毎の刃の洗浄に労力を要する。また洗浄が不十分であるとコンタミネーションや測定値のばらつきの恐れがある。そこで、抽出工程の省力化のため、使い捨ての遠心管に試料を採り、溶媒とガラスビーズを加え、手で激しく振とうする方法（以下、振とう抽出）を検討し、各方法の抽出効率を比較した。

牛肉、さけに混合標準液を 0.01 µg/g となるように添加し、MeCN/0.1%ギ酸水溶液 (9:1) 混液を加え、各抽出方法を 2 回繰り返した。次に各抽出液を実験方法 2.6.1 に従って調製し、回収試験を行った（各試料及び方法 n=3）。結果を図 4 に示す。

牛肉、さけともに振とう抽出の方が、平均回収率 70~120%、相対標準偏差 (RSD%) 25%未満を満たした成分数が多かった。回収率 50~70%の成分を合わせると 9 割以上で RSD25%未満であった。したがって、より操作が簡便な振とう抽出を行うことにした。

### 3.4 検量線の検討

調製した試験溶液に残留する夾雑成分の影響を確認するため、絶対検量線とマトリックス添加検量線による定量結果を比較した。

牛乳 5 g に、混合標準液を 0.01 及び 0.04 µg/g となるように添加し、実験方法 2.6.1 に従って調製した試験溶液を測定した（各濃度 n=3）。

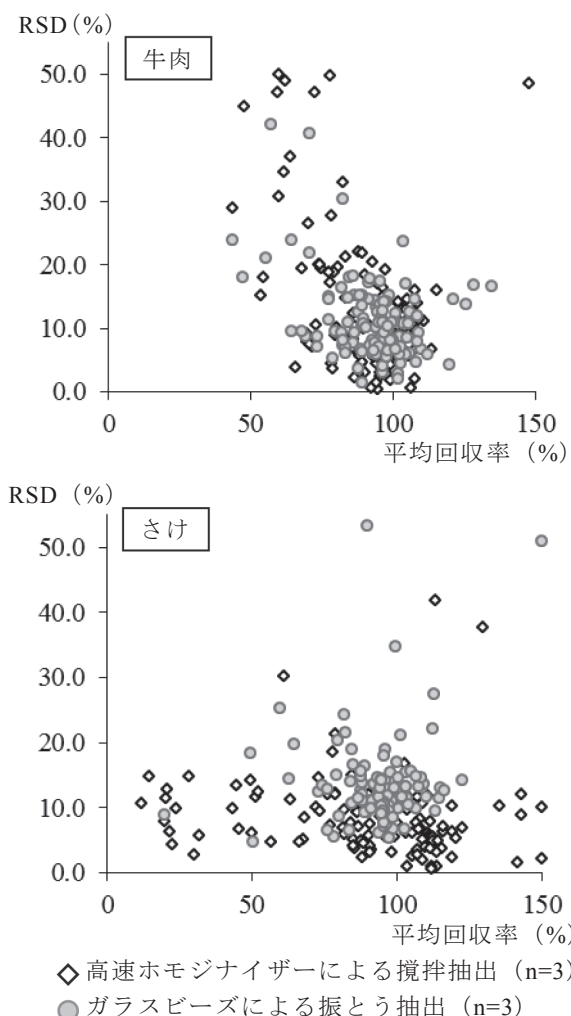


図 4 攪拌及び振とう抽出による各成分の分布

2 濃度で回収率 70~120%、RSD% < 25 (0.01 µg/g) 及び < 15 (0.04 µg/g) であったのは、マトリックス添加検量線が 104 成分、絶対検量線が 93 成分であった。このことから、夾雑成分の影響を補正する必要があると考えられたため、マトリックス添加検量線を用いることにした。

### 3.5 妥当性評価試験

7 食品を対象に、検討した分析法の妥当性評価試験を実施した。結果を表 1 のとおり A~E に分類した。食品別の結果を表 2 に、成分別の結果を表 3 に示す。

分類は、A (2 濃度で真度、精度の目標値を満たし適合する場合)、B (高濃度添加で真度、精度の目標値を満たす)、B' (低濃度添加で真度、精度の目標値を満たす)、C (2 濃度で真度 50%以上 70%未満、精度が目標値を満たす)、D (A, B, B', C 以外)、E (測定不能) とした。

評価 A の割合は、鶏肉、豚肉、牛肉、さけ、



表 1 評価分類

| 評価 | 条 件                                                 |
|----|-----------------------------------------------------|
| A  | 2 濃度で目標値を満たし適合する場合                                  |
|    | 真度 (%) : $70 \leq \sim \leq 120$                    |
|    | 精度 (%) : $< 25, < 30$ (0.01 $\mu\text{g/g}$ )       |
|    | 併行, 室内 $< 15, < 20$ (0.04 $\mu\text{g/g}$ )         |
| B  | 0.04 $\mu\text{g/g}$ のみ目標値を満たす                      |
|    | 真度 (%) : $70 \leq \sim \leq 120$                    |
|    | 精度 (%) : $< 15, < 20$                               |
|    | 併行, 室内                                              |
| B' | 0.01 $\mu\text{g/g}$ のみ目標値を満たす                      |
|    | 真度 (%) : $70 \leq \sim \leq 120$                    |
|    | 精度 (%) : $< 25, < 30$                               |
|    | 併行, 室内                                              |
| C  | 2 濃度ともに以下の条件を満たす                                    |
|    | 真度 (%) : $50 \leq \sim < 70$                        |
|    | 精度 (%) : $< 25, < 30$ (0.01 $\mu\text{g/g}$ )       |
|    | 併行, 室内 $< 15, < 20$ (0.04 $\mu\text{g/g}$ )         |
| D  | A, B, B', C 以外                                      |
|    | 2 濃度またはどちらかの濃度で, 次のいずれかに 1 つでも該当                    |
|    | 真度 (%) : $< 50, 120 <$                              |
|    | 精度 (%) : $25 \leq, 30 \leq$ (0.01 $\mu\text{g/g}$ ) |
| E  | 併行, 室内 $15 \leq, 20 \leq$ (0.04 $\mu\text{g/g}$ )   |
|    | 測定不能                                                |
|    | ・検量線の直線性が無い                                         |
|    | ・ブランクピークが大きく選択性が低い                                  |
|    | ・定量限界が許容範囲外                                         |

※ A～D は選択性, 定量限界の条件を満たす

鶏卵で約 8 割, 牛乳及びはちみつで約 9 割となり, 概ね良好な結果が得られた。7 食品にわたり評価 A となったのは, 115 成分中 66 成分であった。

全体的に評価 A の次に評価 D の割合が高く, 評価 B, C は低い傾向であった。E に該当したのは, 豚肉のセファピリンのみであり, ブランクピークが大きく選択性や定量下限に問題があった。

はちみつは, 評価 D, E の成分がなく, 特に良好な結果であった。これは LC-MS/MS 測定の妨害となる脂肪を含んでいないためと考えられた。

鶏卵では, 評価 B' の割合が評価 A に次いで高かった。該当する成分をくわしくみると, すべて高濃度添加の室内精度が外れていた。他のほとんどの成分は, 併行・室内精度を満たしており, 今回の室内精度の逸脱は偶然に起きたと考えられる。

評価 C, D に該当する成分は, 複数の食品にわたっている場合が多く, 特にミロキサシン,

表 2 妥当性評価試験結果 (食品別)

|      | A             | B        | B'         | C        | D          | E        | Total |
|------|---------------|----------|------------|----------|------------|----------|-------|
| 鶏 肉  | 98*<br>(85)** | 0        | 1<br>(1)   | 0        | 16<br>(14) | 0        | 115   |
| 豚 肉  | 92<br>(80)    | 1<br>(1) | 1<br>(1)   | 7<br>(6) | 13<br>(11) | 1<br>(1) | 115   |
| 牛 肉  | 97<br>(84)    | 1<br>(1) | 5<br>(4)   | 3<br>(3) | 9<br>(8)   | 0        | 115   |
| さ け  | 98<br>(85)    | 2<br>(2) | 5<br>(4)   | 0        | 10<br>(9)  | 0        | 115   |
| 鶏 卵  | 90<br>(78)    | 2<br>(2) | 12<br>(10) | 1<br>(1) | 10<br>(9)  | 0        | 115   |
| 牛 乳  | 108<br>(94)   | 0        | 1<br>(1)   | 1<br>(1) | 5<br>(4)   | 0        | 115   |
| はちみつ | 110<br>(96)   | 1<br>(1) | 2<br>(2)   | 2<br>(1) | 0          | 0        | 115   |

\* : 各評価に該当する成分数

\*\* : 全対象成分に対する割合 (%)

トリクラベンダゾール, ロキサルソン, オキシクロザニドが顕著であった。これらの成分については, 適用可能な濃度範囲や追加精製等の検討が必要と考えられた。

#### 4. まとめ

畜水産物を対象に, 動物用医薬品 115 成分の一斉分析法を検討した。抽出溶媒, 固相カラムによる精製等の検討を行い, より迅速で高精度な一斉分析法を構築した。

構築した分析法について, 7 食品 (鶏肉, 豚肉, 牛肉, さけ, 鶏卵, 牛乳, はちみつ) を対象に, 妥当性評価試験を実施した。適合した成分の割合は, 鶏肉, 豚肉, 牛肉, さけ, 鶏卵で約 8 割, 牛乳及びはちみつで約 9 割となり, 概ね良好な結果が得られた。本法は高精度な迅速一斉分析法として有用であると考えられた。

今後は, 不適合となった成分の再検討や, 今回測定対象としなかった成分について本法の適用を拡大する予定である。

#### 参考文献

- 1) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知 : 食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインについて, 平成 19 年 11 月 15 日, 食安発第 115001 号。
- 2) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知 : 食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインの一部改正について,

- 平成 22 年 12 月 24 日, 食安発第 1124 第 1 号.
- 3) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知: 食品に残留する農薬, 飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法について, 「HPLC による動物用医薬品等の一斉試験法 I ~ III (畜水産物)」, 平成 17 年 1 月 24 日, 食安発第 0124001 号.
- 4) 松渕亜希子他: LC-MS/MS を用いた畜水産物中の動物用医薬品一斉分析における固相抽出及びリン脂質クリーンアップ法の検討, 秋田県健康環境センター年報, **7**, 2011, 70-82.
- 5) 松渕亜希子他: LC-MS/MS を用いたハチミツ中の動物用医薬品一斉分析法の検討, 秋田県健康環境センター年報, **7**, 2011, 83-90.
- 6) 和久田俊裕他: 液体クロマトグラフ/タンデム型質量分析計 (LC/MS/MS) を用いた畜水産食品中の動物用医薬品迅速分析法の検討 (第 1 報), 熊本県保健環境科学研究所報, 第 39 号, 2009, 39-44.
- 7) 堀江正一他: 微生物学的試験法による畜水産物中に残留する抗菌性物質の高感度測定法, 分析化学, **56**, 12, 2007, 1097-1103.
- 8) 長南隆夫他: HPLC による畜水産食品中のキノロン剤の一斉分析法, 食品衛生学雑誌, **49**, 3, 2008, 244-248
- 9) 山口貴弘他: 分散固相および固相カートリッジカラムを用いた LC-MS/MS による食肉中の動物用医薬品一斉分析法, 食品衛生学雑誌, **54**, 4, 2013, 290-297.
- 10) 吉田絵美子他: 加工食品中の動物用医薬品迅速一斉試験法の検討, 食品衛生学雑誌, **52**, 1, 2011, 59-65.
- 11) 堀江正一他: LC-MS/MS による畜水産食品中のニトロフラゾンの定量, 食品衛生学雑誌, **49**, 3, 2008, 204-210.
- 12) 林洋他: HPLC による畜産食品中のシロマジン分析法, 東京都健康安全研究センター年報, **57**, 2006, 187-191.
- 13) 畑野和弘: LC/MS/MS による乳及び乳製品中のペニシリン系抗生物質の迅速同時定量, 福岡市保健環境研究所報, **28**, 2002, 79-83.
- 14) 竹上晴美他: 高速液体クロマトグラフィー/質量分析法による乳中のマクロライド系抗生物質の定量, 分析化学, **55**, 9, 2006, 651-659.
- 15) 西村修一他: LC-MS/MS によるハチミツ中の残留動物用医薬品等の一斉分析, 鹿児島県環境保健センター所報, **8**, 2007, 125-130.
- 16) 近藤貴英他: 分散固相抽出および多機能カラムを用いた GC-MS/MS による畜産物中の残留農薬一斉分析法, 食品衛生学雑誌, **53**, 2, 2012, 75-84.
- 17) 五訂増補日本食品標準成分表

表 3 妥当性評価試験結果（成分別）

| No.      | 対象成分名                  | RT <sup>1)</sup><br>(min) | モニターイオン<br>( <i>m/z</i> ) | 鶏肉      | 豚肉 | 牛肉 | さけ | 鶏卵 | 牛乳 | はちみつ | 各評価の分布 <sup>2)</sup> |   |    |   |   |   |   |
|----------|------------------------|---------------------------|---------------------------|---------|----|----|----|----|----|------|----------------------|---|----|---|---|---|---|
|          |                        |                           |                           |         |    |    |    |    |    |      | A                    | B | B' | C | D | E |   |
| Positive |                        |                           |                           |         |    |    |    |    |    |      |                      |   |    |   |   |   |   |
| 1        | Cephapirin             | 5.8                       | 424.2                     | > 292.2 | D  | E  | D  | D  | A  | A    | A                    | 3 | 0  | 0 | 0 | 3 | 1 |
| 2        | 5-Hydroxythiabendazole | 5.8                       | 218.0                     | > 191.0 | A  | A  | D  | B' | C  | A    | A                    | 4 | 0  | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 3        | Sulfisomidine          | 5.9                       | 279.1                     | > 124.0 | A  | A  | B' | B' | A  | A    | A                    | 5 | 0  | 2 | 0 | 0 | 0 |
| 4        | Lincomycin             | 5.9                       | 407.2                     | > 126.0 | A  | A  | D  | D  | A  | D    | A                    | 4 | 0  | 0 | 0 | 3 | 0 |
| 5        | Lebamisole             | 6.0                       | 205.1                     | > 178.0 | A  | A  | A  | A  | A  | A    | A                    | 7 | 0  | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 6        | Cefquinome             | 6.0                       | 529.2                     | > 134.0 | A  | A  | D  | D  | D  | D    | A                    | 3 | 0  | 0 | 0 | 4 | 0 |
| 7        | Ampicillin             | 6.1                       | 350.1                     | > 106.3 | A  | A  | D  | D  | A  | A    | A                    | 5 | 0  | 0 | 0 | 2 | 0 |
| 8        | Diaveridine            | 6.1                       | 261.1                     | > 245.1 | A  | A  | B' | A  | A  | A    | A                    | 6 | 0  | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 9        | Thiabendazole          | 6.1                       | 202.1                     | > 175.1 | A  | A  | A  | A  | A  | A    | A                    | 7 | 0  | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 10       | Norfloxacin            | 6.2                       | 320.1                     | > 276.1 | A  | A  | B' | B' | A  | A    | A                    | 5 | 0  | 2 | 0 | 0 | 0 |
| 11       | Ofloxacin              | 6.2                       | 362.1                     | > 318.3 | A  | A  | A  | A  | A  | A    | A                    | 7 | 0  | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 12       | Ciprofloxacin          | 6.2                       | 332.1                     | > 288.2 | A  | A  | A  | A  | A  | A    | A                    | 7 | 0  | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 13       | Marbofloxacin          | 6.2                       | 363.1                     | > 72.1  | A  | A  | B' | B' | A  | A    | A                    | 5 | 0  | 2 | 0 | 0 | 0 |
| 14       | Trimethoprim           | 6.2                       | 291.1                     | > 230.1 | A  | A  | A  | A  | A  | A    | A                    | 7 | 0  | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 15       | Clopidol               | 6.2                       | 192.0                     | > 101.0 | A  | A  | A  | A  | A  | A    | A                    | 7 | 0  | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 16       | Danofloxacin           | 6.3                       | 358.2                     | > 340.2 | A  | A  | A  | A  | B' | A    | A                    | 6 | 0  | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 17       | Ormetoprim             | 6.4                       | 275.1                     | > 259.1 | A  | A  | A  | A  | A  | A    | A                    | 7 | 0  | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 18       | Neospiramycin I        | 6.5                       | 350.3                     | > 174.3 | A  | C  | C  | A  | A  | A    | A                    | 5 | 0  | 0 | 2 | 0 | 0 |
| 19       | Enrofloxacin           | 6.5                       | 360.2                     | > 316.3 | A  | A  | A  | A  | A  | A    | A                    | 7 | 0  | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 20       | Sulfadiazine           | 6.5                       | 251.1                     | > 155.9 | A  | A  | A  | A  | A  | A    | A                    | 7 | 0  | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 21       | Cephalonium            | 6.5                       | 459.1                     | > 337.1 | A  | A  | A  | D  | D  | D    | A                    | 4 | 0  | 0 | 0 | 3 | 0 |
| 22       | Sulfathiazole          | 6.6                       | 256.1                     | > 155.9 | A  | A  | A  | A  | A  | A    | A                    | 7 | 0  | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 23       | Mecillinam             | 6.7                       | 326.2                     | > 167.2 | A  | A  | A  | D  | A  | A    | A                    | 6 | 0  | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 24       | Orbifloxacin           | 6.7                       | 396.1                     | > 352.2 | A  | A  | A  | A  | A  | A    | A                    | 7 | 0  | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 25       | Azaperone              | 6.7                       | 328.1                     | > 165.0 | A  | A  | A  | A  | A  | A    | A                    | 7 | 0  | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 26       | Sulfapyridine          | 6.8                       | 250.1                     | > 156.1 | A  | A  | A  | A  | A  | A    | A                    | 7 | 0  | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 27       | Spiramycin I           | 6.9                       | 422.4                     | > 174.1 | A  | A  | A  | A  | A  | A    | A                    | 7 | 0  | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 28       | Sarafloxacin           | 7.0                       | 386.1                     | > 342.2 | A  | A  | A  | A  | A  | A    | A                    | 7 | 0  | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 29       | Xylazine               | 7.0                       | 221.1                     | > 90.1  | A  | A  | A  | A  | A  | A    | A                    | 7 | 0  | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 30       | Difloxacin             | 7.1                       | 400.1                     | > 356.1 | A  | A  | A  | A  | A  | A    | A                    | 7 | 0  | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 31       | Sulfamerazine          | 7.1                       | 265.1                     | > 155.9 | A  | A  | A  | A  | A  | A    | A                    | 7 | 0  | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 32       | Morantel               | 7.3                       | 221.1                     | > 123.0 | A  | A  | A  | A  | A  | A    | A                    | 7 | 0  | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 33       | Cefazolin              | 7.5                       | 455.1                     | > 323.2 | A  | A  | D  | D  | B' | A    | A                    | 4 | 0  | 1 | 0 | 2 | 0 |
| 34       | Tripelennamine         | 7.7                       | 256.2                     | > 211.2 | A  | A  | A  | A  | A  | A    | A                    | 7 | 0  | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 35       | Sulfadimidine          | 7.8                       | 279.1                     | > 186.0 | A  | A  | A  | A  | A  | A    | A                    | 7 | 0  | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 36       | Sulfamonomethoxine     | 7.9                       | 281.2                     | > 156.0 | A  | A  | A  | A  | A  | A    | A                    | 7 | 0  | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 37       | Sulfisozole            | 8.3                       | 240.0                     | > 156.0 | A  | A  | A  | A  | A  | A    | A                    | 7 | 0  | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 38       | Pyrimethamine          | 8.5                       | 249.1                     | > 233.0 | A  | A  | A  | A  | A  | A    | A                    | 7 | 0  | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 39       | Mafopezine             | 8.6                       | 402.2                     | > 193.1 | A  | A  | A  | A  | A  | A    | A                    | 7 | 0  | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 40       | Tilmicosin (cis,trans) | 8.7                       | 869.7                     | > 174.0 | A  | A  | A  | A  | B' | A    | A                    | 6 | 0  | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 41       | Sulfamethoxypyridazine | 8.7                       | 281.2                     | > 155.9 | A  | A  | A  | A  | A  | A    | A                    | 7 | 0  | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 42       | Cefoperazone           | 8.9                       | 646.1                     | > 530.3 | A  | B' | A  | A  | D  | A    | A                    | 5 | 0  | 1 | 0 | 1 | 0 |
| 43       | Oxibendazole           | 8.9                       | 250.1                     | > 218.1 | A  | C  | A  | A  | A  | A    | A                    | 6 | 0  | 0 | 1 | 0 | 0 |
| 44       | Sulfachloropyridazine  | 9.2                       | 285.1                     | > 155.9 | A  | A  | A  | A  | A  | A    | A                    | 7 | 0  | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 45       | Oxfendazole            | 9.3                       | 316.1                     | > 159.0 | A  | A  | A  | A  | A  | A    | A                    | 7 | 0  | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 46       | Mirosamicin            | 9.6                       | 728.4                     | > 158.1 | A  | A  | A  | A  | A  | A    | A                    | 7 | 0  | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 47       | Oleandomycin           | 9.7                       | 688.4                     | > 158.2 | A  | A  | A  | A  | A  | A    | A                    | 7 | 0  | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 48       | Sulfadoxine            | 9.7                       | 311.2                     | > 155.9 | A  | A  | A  | A  | A  | A    | A                    | 7 | 0  | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 49       | Sulfamethoxazole       | 9.8                       | 254.1                     | > 156.0 | A  | A  | A  | A  | A  | A    | A                    | 7 | 0  | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 50       | Sulfaethoxyypyridazine | 9.8                       | 295.0                     | > 156.0 | A  | A  | A  | A  | A  | A    | A                    | 7 | 0  | 0 | 0 | 0 | 0 |

表 3 続き

| No. | 対象成分名                         | RT <sup>1)</sup><br>(min) | モニターイオン<br>( <i>m/z</i> ) | 鶏肉 | 豚肉 | 牛肉 | さけ | 鶏卵 | 牛乳 | はちみつ | 各評価の分布 <sup>2)</sup> |   |    |   |   |   |
|-----|-------------------------------|---------------------------|---------------------------|----|----|----|----|----|----|------|----------------------|---|----|---|---|---|
|     |                               |                           |                           |    |    |    |    |    |    |      | A                    | B | B' | C | D | E |
| 51  | Sulfatroxazole                | 9.9                       | 268.1 > 156.0             | B' | B  | A  | A  | A  | A  | A    | 5                    | 1 | 1  | 0 | 0 | 0 |
| 52  | Erythromycin                  | 10.1                      | 734.5 > 158.2             | A  | A  | A  | A  | A  | A  | A    | 7                    | 0 | 0  | 0 | 0 | 0 |
| 53  | Sulfisoxazole                 | 10.2                      | 268.1 > 156.0             | A  | A  | A  | A  | B  | A  | A    | 6                    | 1 | 0  | 0 | 0 | 0 |
| 54  | Roxarson                      | 10.2                      | 263.9 > 245.8             | D  | D  | D  | A  | D  | D  | B'   | 1                    | 0 | 1  | 0 | 5 | 0 |
| 55  | Miloxacin                     | 10.3                      | 263.9 > 215.2             | D  | D  | D  | A  | D  | D  | B'   | 1                    | 0 | 1  | 0 | 5 | 0 |
| 56  | Oxolinic acid                 | 10.4                      | 262.2 > 216.1             | A  | A  | A  | A  | A  | A  | A    | 7                    | 0 | 0  | 0 | 0 | 0 |
| 57  | Tylosin                       | 10.5                      | 916.6 > 174.1             | A  | A  | A  | A  | A  | A  | A    | 7                    | 0 | 0  | 0 | 0 | 0 |
| 58  | Sulfabenzamide                | 10.9                      | 277.1 > 156.0             | A  | A  | A  | A  | A  | A  | A    | 7                    | 0 | 0  | 0 | 0 | 0 |
| 59  | Prednisolone                  | 10.9                      | 361.3 > 147.1             | A  | A  | A  | A  | B' | A  | A    | 6                    | 0 | 1  | 0 | 0 | 0 |
| 60  | Ethopabate                    | 10.9                      | 238.1 > 206.0             | A  | A  | A  | A  | A  | A  | A    | 7                    | 0 | 0  | 0 | 0 | 0 |
| 61  | Kitasamycin                   | 11.0                      | 772.4 > 109.3             | A  | A  | A  | A  | A  | A  | A    | 7                    | 0 | 0  | 0 | 0 | 0 |
| 62  | Tiamulin Fumarate             | 11.0                      | 494.4 > 192.1             | A  | A  | A  | A  | A  | A  | A    | 7                    | 0 | 0  | 0 | 0 | 0 |
| 63  | Sulfadimethoxine              | 11.1                      | 311.2 > 156.1             | A  | A  | A  | A  | A  | A  | A    | 7                    | 0 | 0  | 0 | 0 | 0 |
| 64  | Sulfaquinolaxaline            | 11.1                      | 301.2 > 156.0             | A  | A  | A  | A  | A  | A  | A    | 7                    | 0 | 0  | 0 | 0 | 0 |
| 65  | Hydrocortisone                | 11.1                      | 363.3 > 327.3             | A  | A  | B  | B' | A  | A  | A    | 5                    | 1 | 1  | 0 | 0 | 0 |
| 66  | Prifinium                     | 11.1                      | 306.3 > 86.1              | A  | A  | A  | A  | A  | A  | A    | 7                    | 0 | 0  | 0 | 0 | 0 |
| 67  | Oxfendazole sulfone           | 11.4                      | 332.1 > 300.1             | A  | A  | A  | A  | A  | A  | A    | 7                    | 0 | 0  | 0 | 0 | 0 |
| 68  | Mebendazole                   | 11.6                      | 296.1 > 264.1             | A  | C  | A  | A  | A  | A  | A    | 6                    | 0 | 0  | 1 | 0 | 0 |
| 69  | Josamycin                     | 11.9                      | 828.6 > 174.0             | A  | A  | A  | A  | A  | A  | A    | 7                    | 0 | 0  | 0 | 0 | 0 |
| 70  | Benzocaine                    | 11.9                      | 166.0 > 138.0             | A  | A  | A  | A  | A  | A  | A    | 7                    | 0 | 0  | 0 | 0 | 0 |
| 71  | Benzylpenicillin              | 12.0                      | 335.1 > 160.1             | A  | A  | A  | A  | B' | A  | A    | 6                    | 0 | 1  | 0 | 0 | 0 |
| 72  | Methylprednisolone            | 12.0                      | 375.1 > 356.9             | A  | A  | A  | A  | A  | A  | A    | 7                    | 0 | 0  | 0 | 0 | 0 |
| 73  | Flubendazole                  | 12.2                      | 314.1 > 282.1             | D  | C  | A  | A  | A  | A  | A    | 5                    | 0 | 0  | 1 | 1 | 0 |
| 74  | Betamethasone                 | 12.2                      | 393.2 > 373.1             | A  | A  | A  | A  | B' | A  | B    | 5                    | 1 | 1  | 0 | 0 | 0 |
| 75  | Nalidixic acid                | 12.4                      | 233.2 > 215.2             | A  | A  | A  | A  | A  | A  | A    | 7                    | 0 | 0  | 0 | 0 | 0 |
| 76  | Flumequine                    | 12.7                      | 262.2 > 202.2             | A  | A  | A  | A  | A  | A  | A    | 7                    | 0 | 0  | 0 | 0 | 0 |
| 77  | Sulfabromomethazine           | 12.9                      | 357.0 > 92.1              | A  | A  | A  | A  | A  | A  | A    | 7                    | 0 | 0  | 0 | 0 | 0 |
| 78  | Trenbolone ( $\alpha,\beta$ ) | 13.0                      | 271.2 > 253.2             | A  | A  | A  | A  | A  | A  | A    | 7                    | 0 | 0  | 0 | 0 | 0 |
| 79  | Oxacillin                     | 13.4                      | 402.2 > 160.1             | A  | A  | A  | A  | B' | A  | A    | 6                    | 0 | 1  | 0 | 0 | 0 |
| 80  | Fenbendazole                  | 13.4                      | 300.1 > 268.1             | D  | D  | A  | D  | A  | A  | A    | 4                    | 0 | 0  | 0 | 3 | 0 |
| 81  | Virginiamycin                 | 13.4                      | 526.3 > 337.1             | A  | A  | A  | A  | B' | A  | A    | 6                    | 0 | 1  | 0 | 0 | 0 |
| 82  | Brotizolam                    | 13.6                      | 392.9 > 314.0             | A  | A  | A  | A  | A  | A  | A    | 7                    | 0 | 0  | 0 | 0 | 0 |
| 83  | Piromidic acid                | 13.8                      | 289.2 > 243.2             | A  | A  | A  | A  | A  | A  | A    | 7                    | 0 | 0  | 0 | 0 | 0 |
| 84  | Menbutone                     | 14.0                      | 259.3 > 159.1             | A  | A  | A  | A  | B' | A  | A    | 6                    | 0 | 1  | 0 | 0 | 0 |
| 85  | Nafcillin                     | 14.4                      | 415.3 > 199.2             | A  | A  | A  | A  | B' | A  | A    | 6                    | 0 | 1  | 0 | 0 | 0 |
| 86  | Ketoprofen                    | 14.4                      | 255.2 > 209.1             | A  | A  | A  | A  | A  | A  | A    | 7                    | 0 | 0  | 0 | 0 | 0 |
| 87  | Praziquantel                  | 14.5                      | 313.2 > 203.1             | A  | A  | A  | A  | A  | A  | A    | 7                    | 0 | 0  | 0 | 0 | 0 |
| 88  | Meloxicam                     | 14.8                      | 352.0 > 115.0             | A  | A  | C  | A  | B  | A  | A    | 5                    | 1 | 0  | 1 | 0 | 0 |
| 89  | Dicloxacillin                 | 15.1                      | 470.1 > 160.1             | A  | A  | A  | A  | B' | A  | A    | 6                    | 0 | 1  | 0 | 0 | 0 |
| 90  | Flunixin                      | 15.3                      | 297.1 > 279.0             | A  | A  | A  | A  | A  | A  | A    | 7                    | 0 | 0  | 0 | 0 | 0 |
| 91  | Triclabendazole Oxon          | 15.5                      | 329.0 > 167.9             | D  | D  | A  | A  | B' | A  | A    | 4                    | 0 | 1  | 0 | 2 | 0 |
| 92  | Famphur                       | 15.6                      | 326.0 > 93.0              | A  | A  | A  | A  | A  | A  | A    | 7                    | 0 | 0  | 0 | 0 | 0 |
| 93  | Rifaximin                     | 15.7                      | 786.4 > 754.4             | A  | C  | B' | A  | D  | A  | A    | 4                    | 0 | 1  | 1 | 1 | 0 |
| 94  | Altrenogest                   | 15.8                      | 311.4 > 227.1             | D  | D  | C  | A  | A  | B' | A    | 3                    | 0 | 1  | 1 | 2 | 0 |
| 95  | Carprofen                     | 16.0                      | 274.1 > 228.0             | D  | D  | A  | A  | D  | A  | A    | 4                    | 0 | 0  | 0 | 3 | 0 |
| 96  | Clostebol                     | 16.2                      | 323.0 > 143.0             | A  | C  | A  | A  | A  | A  | A    | 6                    | 0 | 0  | 1 | 0 | 0 |
| 97  | Febantel                      | 17.1                      | 447.1 > 415.1             | A  | A  | A  | A  | A  | A  | A    | 7                    | 0 | 0  | 0 | 0 | 0 |
| 98  | Novobiocin                    | 17.8                      | 613.3 > 189.0             | D  | D  | A  | D  | D  | A  | A    | 3                    | 0 | 0  | 0 | 4 | 0 |
| 99  | Triclabendazole               | 18.4                      | 358.9 > 344.0             | D  | D  | A  | D  | D  | A  | C    | 2                    | 0 | 0  | 1 | 4 | 0 |
| 100 | Chlormadinone                 | 18.4                      | 405.2 > 345.1             | D  | D  | A  | A  | A  | A  | A    | 5                    | 0 | 0  | 0 | 2 | 0 |
| 101 | Melengestrol acetate          | 18.4                      | 397.2 > 337.3             | D  | C  | A  | A  | A  | A  | A    | 5                    | 0 | 0  | 1 | 1 | 0 |
| 102 | Tolfenamic Acid               | 19.2                      | 262.1 > 209.1             | D  | D  | A  | A  | A  | A  | A    | 5                    | 0 | 0  | 0 | 2 | 0 |

表 3 続き

| No.      | 対象成分名                  | RT <sup>1)</sup><br>(min) | モニターイオン<br>( <i>m/z</i> ) | 鶏肉 | 豚肉 | 牛肉 | さけ | 鶏卵 | 牛乳 | はちみつ | 各評価の分布 <sup>2)</sup> |   |    |   |   |   |
|----------|------------------------|---------------------------|---------------------------|----|----|----|----|----|----|------|----------------------|---|----|---|---|---|
|          |                        |                           |                           |    |    |    |    |    |    |      | A                    | B | B' | C | D | E |
| Negative |                        |                           |                           |    |    |    |    |    |    |      |                      |   |    |   |   |   |
| 103      | Thiamphenicol          | 6.2                       | 353.9 > 185.1             | A  | A  | D  | B  | A  | A  | A    | 5                    | 1 | 0  | 0 | 1 | 0 |
| 104      | Cefuroxime             | 6.7                       | 423.0 > 206.9             | A  | A  | A  | A  | A  | A  | A    | 7                    | 0 | 0  | 0 | 0 | 0 |
| 105      | Florfenicol            | 7.4                       | 355.8 > 184.9             | A  | A  | A  | A  | A  | A  | A    | 7                    | 0 | 0  | 0 | 0 | 0 |
| 106      | Dinitolmide            | 7.4                       | 224.0 > 180.9             | A  | A  | A  | A  | A  | A  | A    | 7                    | 0 | 0  | 0 | 0 | 0 |
| 107      | Chloramphenicol        | 7.6                       | 321.0 > 152.0             | A  | A  | A  | A  | A  | A  | A    | 7                    | 0 | 0  | 0 | 0 | 0 |
| 108      | Clorsulon              | 7.8                       | 379.8 > 343.9             | A  | A  | A  | A  | A  | A  | A    | 7                    | 0 | 0  | 0 | 0 | 0 |
| 109      | Sulfanitran            | 8.9                       | 334.1 > 136.1             | A  | A  | A  | B  | A  | A  | A    | 6                    | 1 | 0  | 0 | 0 | 0 |
| 110      | Penoxymethylpenicillin | 9.0                       | 348.9 > 208.0             | A  | A  | A  | A  | A  | A  | A    | 7                    | 0 | 0  | 0 | 0 | 0 |
| 111      | Zeranol                | 9.7                       | 321.1 > 277.1             | A  | A  | A  | A  | A  | A  | A    | 7                    | 0 | 0  | 0 | 0 | 0 |
| 112      | Cloxacillin            | 9.8                       | 433.9 > 292.8             | A  | A  | A  | A  | A  | A  | A    | 7                    | 0 | 0  | 0 | 0 | 0 |
| 113      | Nicarbazin             | 10.8                      | 301.0 > 136.9             | D  | D  | A  | A  | A  | A  | A    | 5                    | 0 | 0  | 0 | 2 | 0 |
| 114      | Diclazuril             | 11.5                      | 404.9 > 333.8             | D  | D  | A  | A  | A  | A  | A    | 5                    | 0 | 0  | 0 | 2 | 0 |
| 115      | Oxyclozanide           | 12.2                      | 397.8 > 175.9             | D  | D  | A  | A  | D  | C  | C    | 2                    | 0 | 0  | 2 | 3 | 0 |

1) RT : Retention time : 保持時間

2) 成分ごとの7食品の各評価 (A~E) の数





## IV 発表業績



## 1. 学会発表

### 1,4-ジオキサン分解能が低下した活性汚泥の処理能力向上の検討

菅原 剛, 小林貴司, 小川千春, 八柳 潤

第23回環境化学討論会  
2014年5月, 京都府

難分解性である1,4-ジオキサンは一般的な処理工程では処理が難しいとされていたが, 県内の廃水処理施設では生物処理により特異的に効率よく分解処理されている。平成24年度の春先, この廃水処理施設において除去率が低下し, 処理水中1,4-ジオキサン濃度が上昇する事例が発生した。処理能力を向上するため, 廃水流入を停止し, 1,4-ジオキサンおよびリン酸の添加を行った結果, 約3週間後に回復することができた。処理能力低下の原因は不明であるが, ブローの流量や水質の季節変動が関与していると考えられた。

### 秋田県におけるインフルエンザ菌の薬剤耐性関連遺伝子の検出状況

今野貴之

第88回日本感染症学会学術講演会  
2014年6月, 福岡市

インフルエンザ菌 (*Haemophilus influenzae*) の薬剤耐性化の機構としては $\beta$ -lactamaseの産生により耐性化する場合と, ペニシリン結合タンパク質の遺伝子 (*ftsI*) に変異が生じて耐性化する場合がある。特に近年,  $\beta$ -lactamaseによらない耐性菌の増加が顕著になっている。

今回, 平成25年1月から12月に県内医療機関から薬剤耐性遺伝子の確認のため送付されたインフルエンザ菌338株について,  $\beta$ -lactamase (*bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>ROB</sub>) 及び*ftsI*の変異の検出をPCRにより行った。

いずれの耐性遺伝子も検出されなかった株 (BLNAS) は26株, *ftsI*の変異のみ検出された

株 (BLNAR) が209株, TEM型の $\beta$ -lactamaseを保有していた株は59株で, そのうち*ftsI*の変異を併せ持っていた株 (BLPACR) は28株であった。

また, これまで稀とされてきたROB型 $\beta$ -lactamaseを保有していた株が44株確認され, そのほとんどは*ftsI*の変異を併せ持っていた。

ROB型 $\beta$ -lactamase保有株は6月をピークに分離がみられ, 数株を除き主に2系統のPFGEパターンが存在した。また, TEM型に比べAmpicillin, Cefaclorに強い耐性を示す傾向があった。

ROB型 $\beta$ -lactamaseを保有するインフルエンザ菌は, *ftsI*の変異を併せ持つ傾向があったことから, その増加は強力な耐性菌であるBLPACRの増加につながる可能性があり, その動向について注意が必要と考えられる。

### つつが虫病リスクコミュニケーションの在り方

佐藤寛子

衛生微生物技術協議会第35回研究会  
2014年6月, 東京都

食品の安全性や環境問題において広く活用されている「リスクコミュニケーション=健康危機 (リスク) についての情報と意見交換を全ての関係者間で行い, よりよい政策決定を目指す過程」は, 感染症対策にも積極的に取り入れることが求められている。今回, 秋田県で発生したつつが虫病に関する健康危機発生時に際し行われたリスクコミュニケーションの実例を2例紹介する。

1) 2008年8月, 本県において15年ぶりにアカツツガムシ媒介性のつつが虫病が発生した。これを受け, 当センターは厚労科研調査チームの協力により, 患者感染推定地でのアカツツガムシ生息確認と捕獲した野鼠からの病原体分離を成し得た。さらに, アカツツガムシの生息域が著名観光地に及んでいたことから, 県内のみならず県外へ向けた啓発等が必要となった。

そのため, 専門医と医師会および地元自治体との協力により, 新聞, 観光パンフレットで注意

喚起を行うなど、「夏季のつつが虫病」対策が講じられるようになった。

2) 2013年5月, つつが虫病による死亡者が本県では15年ぶりに発生したが, 当初は情報公開の規定により公表されなかった。しかし, 患者発生地域の保健所と当センターからの情報提供, 専門医および医師会の働きかけにより, 即時に規定が見直しされ当該死亡例が公表となった。さらに, 患者発生時の情報公開のタイミングも見直しされた。

健康危機・被害発生を未然に防ぐあるいは被害低減のためのリスクコミュニケーションにおいて, 地方衛生研究所が果たすべき役割は大きいと考えられる。正確なリスク認識・分析に併せて, 広く一般に確実に周知できる情報公開方法が今後の課題として挙げられる。

## Noroviruses RNA detection in contaminated foods by a PANtrap method

Hiroyuki Saito, Tomoyuki Tanaka<sup>\*1</sup>

Miho Toho<sup>\*2</sup>, Mamoru Noda<sup>\*3</sup>

Tomoichiro Oka<sup>\*4</sup>, Kazuhiko Katayama<sup>\*4</sup>

The 2<sup>nd</sup>. AFSA Conference on Food Safety and Security

2014年8月, Bien Hoa City, Vietnam

Noroviruses (NoVs) are one of a major cause of gastroenteritis mostly related not only to food poisoning but a dominant cause of food-related outbreaks. Foodborne gastroenteritis is being increasingly recognized as a public health problem, however, identification of the etiological agents responsible has been restricted due to the difficulty to detect the agents in food samples. A PANtrap ((PANSORBIN<sup>®</sup>(Staphylococcus aureus fixed with formalin) trap) method we developed for the detection and quantification of NoVs from different food samples included solid, liquid, paste and oily states. We spiked NoV GII.4 stool suspension that includes 10<sup>5</sup> copies of NoV RNA into 10 grams of potato salad and stir fried noodle.

Food samples were rinsed by a homogenizing buffer and centrifuged to obtain food emersion. Anti NoV GII.4 serum was added into the food emersion to make NoV-IgG complexes, then PANSORBIN<sup>®</sup> was added into the samples and re-centrifuged to collect NoV-IgG complexes adsorbed on the surface of PANSORBIN<sup>®</sup>. NoV RNA was extracted from the pellet using a commercial extraction kit, then RT real-time PCR process was performed. The recovery rate from potato salad was 78.3±10.8% in contrast to 0.33±0.08% when no anti NoV GII.4 serum was added. Similar results were obtained from the stir fried noodle, 81.5±10.2% vs 1.15±0.25%.

We also applied a commercially available human gamma globulin agent to the PANtrap method to detect other viruses and succeeded to recover another genotypes of NoV as well as sapoviruses, adenovirus type 41 and hepatitis A virus.

These results show the potentiality of the PANtrap method for the detection of food borne viruses in contaminated food which bring many advantages to prevent food-borne gastroenteritis.

<sup>\*1</sup>: 堺市衛生研究所

<sup>\*2</sup>: 福井県衛生環境研究センター

<sup>\*3</sup>: 国立医薬品食品衛生研究所

<sup>\*4</sup>: 国立感染症研究所

## 秋田県のつつが虫病対策における課題と展望

佐藤寛子, 柴田ちひろ, 秋野和華子  
佐藤由衣子, 斎藤博之, 安部真理子  
須藤恒久<sup>\*1</sup>

第60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

2014年10月, 盛岡市

食品の安全性や環境問題において広く活用されている「リスクコミュニケーション＝健康危機(リスク)についての情報と意見交換を全ての関係者間で行い, よりよい政策決定を目指す過程」は, 感染症対策にも積極的に取り入れる

ことが求められている。今回、秋田県で発生したつつが虫病に関する健康危機発生時に際し行われたリスクコミュニケーションの実例を紹介する。

2013年5月、つつが虫病による死亡者が本県では15年ぶりに発生したが、当初は情報公開の規定により公表されなかった。しかし、患者発生地域の保健所と当センターからの情報提供、専門医および医師会の働きかけにより、即時に規定が見直しされ当該死亡例が公表となった。このことにより、県民への注意喚起が促され、結果として救命できた症例もあった。その後、患者発生時の情報公開のタイミングについて見直しが図られた。今年になって、秋田県では4年ぶりにアカツツガムシ媒介性のKato型つつが虫病患者が発生し、県民への情報提供が速やかに行われた。

健康危機・被害発生を未然に防ぐあるいは被害低減のためのリスクコミュニケーションにおいては、試験研究機関、行政機関および医療機関が一体となって正確なリスク認識・分析をする必要がある。併せて、広く一般に確実に周知できる情報公開の体制を維持することが求められる。

\*1：秋田大学医学部名誉教授

## 食品検体のノロウイルス検査にパンソルビン・トラップ法を用いる際の捕捉抗体供給源に関する検討

斎藤博之、秋野和華子、田中智之<sup>\*1</sup>  
野田 衛<sup>\*2</sup>

第35回日本食品微生物学会学術総会  
2014年10月、堺市

パンソルビン・トラップ法（パントラ法：斎藤博之、日本食品微生物学会雑誌、Vol.29, No.1, 32-37, 2012）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。本法の基本原理は、黄色ブドウ球菌の表面に、捕捉抗体を介してウイルス粒子を吸着させて回収・検出することである。捕捉抗体として、多様なウイルスに対する抗体を含むことガンマグ

ロブリン製剤を導入することで、本法を汎用的に用いることが可能である。これまで、ガンマグロブリン製剤として、医療用のものを用いていたが、検査法の普及に当たっては、試験研究等々のガンマグロブリン製剤が望ましい。本研究では、この問題を解決し、食品のウイルス検査の円滑な普及に繋げるために、医薬品以外で安定的に使用できる捕捉抗体供給源を検討した。

NoV-GII.4を含む50 mLの食品洗滌液への工業用ガンマグロブリン添加量の検討では、5%溶液を150 µL加えた条件が最も高い回収率を示した。ここで最適化された添加量を用いて、上記の5種類のNoVについて食品洗滌液からの回収を試みたところ、食中毒の原因ウイルスとして最多のNoV-GII.4に対して工業用ガンマグロブリンを用いた場合の回収率は52.0%で、医療用ガンマグロブリン製剤を用いた場合は46.8%であった。以下、NoV-GII.2に対しては38.6%/38.2%（工業用/医療用）、NoV-GII.6に対しては15.5%/13.3%、NoV-GI.4に対しては35.7%/37.6%、NoV-GI.6に対しては12.1%/6.1%であり、比較した全てにおいて両者は同等であった。また、実際の汚染食品をモデルとした比較試験においても、工業用ガンマグロブリンを用いた系はポテトサラダで40.6%、焼きそばで33.5%と、医療用のそれ（ポテトサラダで34.7%、焼きそばで32.4%）と同等以上の回収率を示した。これらのことから、使用において特段の制約の無い工業用ガンマグロブリンを試薬としてパントラ法に導入することは大変合理的であり、汎用性を担保する意味でも積極的な活用と流通ルートの整備が望まれるものと考えられる。

\*1：堺市衛生研究所

\*2：国立医薬品食品衛生研究所

## 食品検体からパンソルビン・トラップ法によりノロウイルス RNA を抽出する際のα-Amylase 処理に関する検討

秋野和華子、斎藤博之、田中智之<sup>\*1</sup>  
野田 衛<sup>\*2</sup>

第35回日本食品微生物学会学術総会

2014年10月, 堺市

パンソルビン・トラップ法（パントラ法：斎藤博之，日本食品微生物学会雑誌，Vol.29, No.1, 32-37, 2012）は，ノロウイルス（NoV）に代表される食中毒起因ウイルスを食品検体から検出するために開発された。食品中にはPCRを阻害する様々な物質が含まれているが，特に炭水化物は物理化学的挙動が核酸（ポリリボース）と類似していることから，適切な分解除去処理が必要である。カキの検査法においては，混在しているグリコーゲンを分解するために $\alpha$ -Amylase 粉末が用いられているが，パントラ法においても工程に同様の処理が組み込まれている。一方で，現在入手可能な $\alpha$ -Amylase 粉末には錠剤などの製造に使う賦形剤に相当する不溶性成分が含まれており，最終的な検出精度に影響を及ぼすことがわかった。分子生物学用にグリセロール溶液として供給されている $\alpha$ -Amylase の使用は，コスト面で現実的ではない。そこで，本研究では $\alpha$ -Amylase 粉末を液化調製する方法を考案し，炭水化物の分解除去効果について検討した。その検討結果を導入することによりパントラ法による食品検査の精度向上に繋げることを目的としている。

ヨウ素デンプン反応を観察することで，液化調製した $\alpha$ -Amylase は， $\alpha$ -Amylase 粉末を直接投入した場合と同等の炭水化物除去効果を確認できた。この効果は，液化調製後に $-20^{\circ}\text{C}$ で6ヶ月保存した後も損なわれなかった。また， $\alpha$ -Amylase 粉末の不溶性成分が残留した状態でパントラ法を行った場合には，途中でRNA精製カラムが目詰まりを起こすなどの操作上のトラブルが起りやすくなり，real-time PCRでも偽陰性となった。こうした問題を回避するために，これまでは不溶性成分をスポイトで丁寧に取り除く必要があったが，液化調製品を用いることで，こうした不都合がなくなり，操作の簡便化と検出精度の向上が図られた。

\*1：堺市衛生研究所

\*2：国立医薬品食品衛生研究所

佐藤寛子，柴田ちひろ，佐藤由衣子  
秋野和華子，斎藤博之，安部真理子  
齊藤志保子，厚生労働科学研究安藤班

第12回秋田県公衆衛生学会学術大会  
2014年11月，秋田市

2008年，秋田県において15年ぶりにアカツツガムシ媒介性のKato型つつが虫病患者が発生したことを契機に，2009年からアカツツガムシの生息域調査を開始した。調査は雄物川上流部の湯沢市から中流部の大仙市に至る河川敷を対象地域とし，黒布見取り法によりツツガムシの採集を行った。また，2009年～2014年10月までの夏季のつつが虫病患者8例について感染推定地および作業内容と臨床所見を集計した。

調査地域の最上流部にあたる湯沢市郊外では，昭和39年の記録では患者発生地とされていたが，アカツツガムシの生息は確認されず，そこから約3 km下流に至ってから確認された。さらに下流の横手市を流れる支流との合流点に近づくにつれ，多くのアカツツガムシが確認されるようになった。一方で調査範囲の最下流部に位置する大仙市郊外北部の記録上の患者発生地でもアカツツガムシの生息確認が出来なかったが，そこから18 km上流地点以南では確認されるようになり，雄物川流域における最も高密度な生息域は花火大会会場周辺にあることが推察された。また，アカツツガムシの生息環境は広い河川敷の中でも水際の砂地に，特に中州での生息数が多い傾向にあったが，河川沿いの公園や釣り場といった増水時に水没する箇所にも確認された。2009年以降の夏季のつつが虫病8例のうちアカツツガムシ媒介性であることが疑われたのは3例で，感染推定月は8月が2例，9月が1例であった。いずれの患者も水際での作業後に発病しており，つつが虫病に関する知識がなかったか，あるいは知っていても当時は注意を払っていなかったものと推察される。

つつが虫病の患者発生地とツツガムシの生態および生息域には密接な関連性があることから，今後も効果的なつつが虫病対策・啓発のための情報を発信していきたいと考えている。

## 夏季のつつが虫病発生状況とアカツツガムシ生息調査



## 秋田県における死因の概要—都道府県別年齢調整死亡率に基づく検討—

田中貴子

第12回秋田県公衆衛生学会学術大会

2014年11月，秋田市

秋田県の疾病予防対策に関する医療及び行政施策立案を支援するために，年齢調整死亡率のデータを用いて基礎的なデータを収集解析し，秋田県の疾病傾向を明らかにする。2010年都道府県別年齢調整死亡率—人口動態統計特殊報告—（厚生労働省大臣官房統計情報部）から，秋田県の年齢調整死亡率（人口10万対）を抽出した。2010年のデータについて本県と全国との高低及び，本県の調査開始年と2010年の増減を比較し4領域（A，B，C，D）に分類した。対象死因は悪性新生物（以下，がん），心疾患，脳血管疾患，肺炎，自殺，不慮の事故，肝疾患，腎不全，糖尿病，慢性閉塞性肺疾患，老衰等の計31死因であった。

全国より低く調査開始年から減少しているD領域の死因は，男では7死因，女では9死因であり，虚血性心疾患，急性心筋梗塞，肝がん，肝疾患，慢性閉塞性肺疾患，老衰は男女共通であった。全国より低い調査開始年から増加しているC領域は男では3死因，女では4死因であった。気管・肺がんは男女共通であった。調査開始年からみると減少しているものの全国より高いB領域は，男では10死因，女では13死因であり，男女共通は悪性新生物，脳血管疾患，肺炎，胃がん，脳梗塞，不慮の事故，脳内出血，食道がん，くも膜下出血であった。全国より高く調査開始年から増加しているA領域は，男では自殺，大腸がん，膵がん，不整脈・伝導障害，腎不全，胆のうがん，前立腺がん，糖尿病の8死因，女では乳がん，腎不全，卵巣がん，悪性リンパ腫の4死因であった。男女共通は腎不全であった。年齢調整死亡率が減少しているB及びD領域は，男では17死因，女では22死因であった。本県では多くの死因が減少傾向にあり，これまでの着実な保健医療対策の効果が伺われる。しかし，腎不全のように全国での順位が大きく上がった死因もあることから，今後の動向

を見すえつつ引き続き対策を強化していく必要があると思われる。

## パンソルビン・トラップ法における捕捉抗体としての工業用ガンマグロブリンの有用性の検証

斎藤博之，秋野和華子，田中智之<sup>\*1</sup>

野田 衛<sup>\*2</sup>

第62回日本ウイルス学会学術集会

2014年11月，横浜市

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。本法はウイルス粒子の回収に黄色ブドウ球菌を用い，両者を結びつけるための捕捉抗体を必要とする。開発段階で用いてきたガンマグロブリン製剤は，多くのウイルスに対する抗体を含んでいることから，捕捉抗体としての汎用性は高い。これまで，ガンマグロブリン製剤は，医療用のものを使用してきたが，今回工業用ガンマグロブリン製剤を入手することができた。そこで，工業用途に生産されているガンマグロブリンをパントラ法に導入し，さらなる汎用性を追求することを目的として検討を行った。

NoV-GII.4を含む50 mLの食品洗滌液への工業用ガンマグロブリン添加量の検討では，5%溶液を150  $\mu$ L加えた条件が最も高い回収率を示した。ここで最適化された添加量を用いて，上記の5種類のNoVについて食品洗滌液からの回収を試みたところ，全てにおいて医療用ガンマグロブリン製剤と同等以上の回収率が得られた。また，実際の汚染食品をモデルとした比較試験においても，工業用ガンマグロブリンを用いた系はポテトサラダで40.6%，焼きそばで33.5%と，医療用のそれ（ポテトサラダで34.7%，焼きそばで32.4%）と同等以上の回収率を示した。これらのことから，工業用ガンマグロブリンを試薬としてパントラ法に導入することはいずれも合理的であり，流通ルートが整備されれば汎用性がさらに高まるものと考えられる。

<sup>\*1</sup>：福井県衛生環境研究センター

<sup>\*2</sup>：国立感染症研究所

## 秋田県内の医療機関における AmpC 型 $\beta$ ラクタマーゼ産生菌の分離状況と薬剤感受性の解析結果

樫尾拓子, 熊谷優子, 今野貴之  
高橋志保, 和田恵理子, 八柳 潤

第 38 回秋田県医学検査学会  
2014 年 11 月, 秋田市

AmpC 型  $\beta$  ラクタマーゼ産生菌のうち AmpC 過剰産生株, プラスミド性 AmpC 産生株は ESBL 産生菌と同様に第 3 世代セフェム系抗生物質等に耐性を示すことから, 院内感染原因菌として重要視されている。しかしながら, 医療機関で実施可能な AmpC 産生株の簡便な検査法がこれまで普及していなかったことから, 秋田県内の医療機関における AmpC 産生菌の分離状況は不明であった。近年, AmpC 産生株を簡便に検出可能な AmpC/ESBL 鑑別ディスクが市販されたことから, 今回これを使用して秋田県内の AmpC 産生株の分離状況と薬剤感受性について調査した。その結果, 平成 25 年 4 月から平成 26 年 2 月まで, 県内の医療機関から ESBL 産生疑い株として送付された 636 株のうち, 52 株 (8.2%) が AmpC 産生株であることが明らかとなった。AmpC 産生株 52 株のうち *E.coli*, *Enterobacter* 属菌, *Citrobacter* 属菌の計 22 株が第 3 世代セフェム系薬の CTX と CAZ の両方に耐性を示した。

*E.coli* 16 株について, 既報をもとにプラスミド性 *ampC* の探索を行ったところ, 4 株が *bla*<sub>CMY-2</sub> を保有する株であることが明らかとなり, 秋田県内の医療機関にプラスミド性 *ampC* 保有株が存在することが初めて確認された。また, 今回確認された AmpC 産生株の 38.5% が尿由来であった。尿は院内感染の重要な感染源であることから, AmpC 産生株についても尿を介して院内感染を引き起こす可能性に留意する必要がある。耐性菌の蔓延防止と適切な抗菌薬治療のために, 今後も AmpC/ESBL 鑑別ディスクとプラスミド性 *ampC* 検出用 PCR 法により秋田県における AmpC 産生株の検出動向に注意することが必要である。

## 福島原発事故による秋田県内の食品への放射能影響について

小川千春, 菅原 剛<sup>\*1</sup>, 高橋知子  
大井佐知子<sup>\*2</sup>, 小林貴司, 岩谷金仁<sup>\*3</sup>

第 38 回秋田県医学検査学会  
2014 年 11 月, 秋田市

平成 23 年 3 月の東日本大震災に伴い発生した福島第一原子力発電所の事故（福島原発事故）により人工放射性物質が環境中へ拡散したことを受け, 秋田県は食品の安全性を確保するため, 県内の食品に含まれる放射性物質の調査を開始した。今回は, 平成 23 年 7 月の検査開始から平成 26 年 7 月までに当センターで実施した食品の放射性物質検査結果と, 福島原発事故による県内の食品への放射能影響について報告する。

県内産食品及び県内で流通している県外産食品 1,262 検体の放射性物質濃度を, 公定法に従いゲルマニウム半導体検出器により測定した。その結果, 放射性ヨウ素 (*I*-131) は全ての食品から検出されなかった。一方, 放射性セシウム (*Cs*-134 及び *Cs*-137) は, 畜産物や山菜・きのこ類など 248 検体から検出され, 4 検体が基準値を超えた。そのうち, 牛肉については, 事故直後の平成 23 年 7 月に 1 検体が 520 Bq/kg と暫定規制値 (500 Bq/kg) を超えたが, 翌年には検出最大値が 4 Bq/kg まで減少しており, 一時的なものであった。ねまがりたけ (野生山菜) については平成 25 年 6 月と平成 26 年 6 月に 3 検体が 110~120 Bq/kg と基準値 (100 Bq/kg) を超えたが, いずれも宮城県との県境付近から採取されたものであった。

以上から, 放射性物質濃度が基準値を超えた食品は, 一時的なもの, もしくは生産地がごく限られた地域のものであるため, 福島原発事故による県内の食品への放射能影響は, 極めて少なく限定的なものであったと考えられた。

<sup>\*1</sup>: 平鹿地域振興局福祉環境部

<sup>\*2</sup>: 元健康環境センター

<sup>\*3</sup>: 北秋田地域振興局大館福祉環境部

## 農作物における残留農薬一斉分析法の妥当性評価

珍田尚俊，松渕亜希子，天明さおり<sup>\*1</sup>

第 51 回全国衛生化学技術協議会年会  
2014 年 11 月，別府市

残留農薬多成分分析の迅速化及び精度向上のため，簡易迅速法であるクエッチャーズ法を基に，新たな前処理法を検討した。

抽出工程では，従来，用いる測定機器毎に別の抽出法であったが（GC-MS/MS：超臨界流体抽出，LC-MS/MS：メタノール抽出），作業時間の短いクエッチャーズ抽出に統一し，操作の迅速化を図った。

精製工程では，固相カラムを用いることにし，GC 及び LC-MS/MS 用で別々に精製を行うことで精製効果をより高めることにした（以下各法を GC 法，LC 法とする）。改良により，一律基準レベルで GC 法 275 項目，LC 法 161 項目の測定が可能となった。

GC 法及び LC 法について，7 食品（りんご，ほんれんそう，玄米，ねぎ，ばれいしょ，キャベツ，レモン）を対象に，厚生労働省通知のガイドラインに従い妥当性評価試験を実施した（添加濃度：0.01 及び 0.05  $\mu\text{g/g}$ ，分析者 3 名が各 2 濃度添加試料を 1 日 2 試行，2 日間分析）。

GC 法では，ガイドラインの目標値を満たした農薬は各食品で約 8 割となり，概ね良好な結果であった。

LC 法では，ねぎ以外の 6 食品で約 8 割となり，ねぎは約 6 割であった。ねぎは真度が適合しないものが比較的多かった。

今後，LC 法のねぎの回収率の改善と，今回妥当性評価試験を実施した 7 食品以外の食品（豆類等）について妥当性評価を進めていく予定である。

<sup>\*1</sup>：山本地域振興局福祉環境部

## 食中毒事例における食品のサポウイルス検査にパンソルビン・トラップ法を用いる際の RNA 検出系の最適化

斎藤博之，秋野和華子，田中智之<sup>\*1</sup>，

野田 衛<sup>\*2</sup>

第 108 回日本食品衛生学会学術講演会  
2014 年 12 月，金沢市

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）を検出するために開発された実践的な手法である。また，捕捉抗体としてガンマグロブリンを使用することで，NoV のみならずサポウイルス（SaV）にも適用できることがわかっている。パントラ法にはウイルス粒子の回収に黄色ブドウ球菌（以下，ブ菌）が用いられていることから，得られた RNA サンプルはブ菌由来の遺伝子を大量に含んでおり，RT-PCR に用いる試料としては特殊なものといえる。これまでに，NoV に対する RT-PCR の反応系（プライマーや反応温度など）については最適化がなされている（第 106 回学術講演会）。一方，SaV に関しては，糞便検体に対する RT-PCR の反応系は報告されているものの，これらをパントラ法に用いるためには，改めて最適化を行う必要がある。本研究は，パントラ法によって抽出された SaV-RNA の検出系を最適化し，実際の食中毒事例に対応できるものとするを目的としている。

cDNA の段階希釈系列において，PCR での検出限界を比較したところ，蒸留水による希釈では RT-PCR 原法により  $10^{-4}$  希釈まで 800 bps の増幅バンドが確認できたが，パントラ法抽出物を含む希釈系列ではブ菌由来の非特異バンドが多く，SaV 由来の増幅バンドは  $10^{-2}$  希釈までしか検出できなかった。アニーリング温度を  $60^{\circ}\text{C}$  に設定した場合は，ランダムプライマーを用いて逆転写反応を行った場合には，ブ菌由来の非特異バンドは目立たなくなったものの，SaV 由来の増幅バンドは  $10^{-1}$  希釈までしか認められなかった。LNA 修飾を導入したプライマーを用いて，アニーリング温度を  $60^{\circ}\text{C}$  に設定したところ，パントラ法抽出物存在下でも， $10^{-4}$  希釈まで SaV 由来バンドが観察できた。次に，RNA を蒸留水で段階希釈したものをランダムプライマーで逆転写を行った場合には  $10^{-5}$  希釈まで SaV のバンドが認められたが，パントラ法抽出物存在下では  $10^{-3}$  希釈までしか検出できなかった。逆転写反応専用プライマー（PANR-SV）を

用いることで  $10^{-5}$  希釈まで検出できるようになった。ここで得られた成績は、食品検体の SaV 検査にパントラ法を導入する際に有用と考えられた。

\*<sup>1</sup>：福井県衛生環境研究センター

\*<sup>2</sup>：国立感染症研究所

## 患者およびマウスの血中 *Orientia tsutsugamushi* の定量と重症化例に関する考察

佐藤寛子，川森文彦<sup>\*1</sup>，藤田博己<sup>\*2</sup>

安藤匡子<sup>\*3</sup>，門馬直太<sup>\*4</sup>

第24回秋田応用生命科学研究会

2014年12月，秋田市

つつが虫病の病原体 *Orientia tsutsugamushi* (Ot) は血清型によりマウスに対する毒性が異なり、ヒトもそれに準ずるとされるが、本県において発生するつつが虫病患者の臨床症状は必ずしもこれに一致しない。そこで、患者血液あるいは野生動物から分離された Ot 株のうち、毒性が異なるとされる血清型の2株について、マウスに対する致死毒性の確認と共に血中 Ot コピー数を経時的に定量した。併せて秋田県で2011年～2013年に発生したつつが虫病患者26例 (DIC 併発/治療前8例と DIC 併発/治療後4例ならびに DIC 非併発/治療前14例) についても定量し、血中コピー数の比較を行ったので報告する。

マウス接種には Kato 型 Kakuma-2 株 (強毒型：野鼠由来) および Shimokoshi 型 Matsui 株 (弱毒型：患者由来) を使用した。両株は、L929 細胞で培養後 DNA 抽出後、コピー数の定量によりリケッチア溶液を  $1.0E7$  および  $1.0E5$  copies/ml に調製し、各株各濃度 100  $\mu$ l を ICR マウス2頭 ( $1.0E7$  : A 群,  $1.0E5$  : B 群), ICR Nude マウス2頭 ( $1.0E7$  : C 群,  $1.0E5$  : D 群) の腹腔に接種した。その後、マウスの外見・行動観察と尾静脈からの採血を1日1回8日間行い、9日目以降は1～2日毎に行った。マウス血液は、Ot 株の場合と同様に DNA 抽出後、Ot コピー数を定量し、各群の1ml 当たり換算した平均値を求めた。患者血液中の Ot 定量も同

様に行った。

強毒型株の接種系における Ot 検出開始は、A 群が1日目、B 群が2日目で、その後コピー数は増加し、9日目に A 群が、10日目に B 群のマウスが衰弱不動となり殺処分とした。この時点で A 群は  $1.0E5$ 、B 群は  $1.1E5$  であった。一方、弱毒型株の接種系での Ot 検出開始は、A 群が接種後2日目、B 群が5日目であった。その後、コピー数は顕著な増加がなく、A 群は2日目、B 群は10日目 ( $7.1E3$ ) が最高値で11日目以降は不検出となり、マウスは1ヶ月間生存した。C 群と D 群も同様に強毒・弱毒株を各々接種したところ、両群共に死亡したが、死亡時の Ot コピー数は、A 群 B 群に比較して強毒型株が約10倍、弱毒型株が100～1000倍であった。強毒型株は、弱毒型株よりもマウス体内で急激に増殖するため、免疫応答が間に合わず、マウスは死に至るものと推察した。患者血液中の Ot のコピー数は、DIC 非併発/治療前例 (平均病日 4.8 日) と DIC 併発/治療後例 (同 5.5 日) の平均値は共に  $1.1E4$  であった。一方、DIC 併発/治療前例 (同 4.0 日) は、平均  $2.3E5$  と DIC 併発/治療後および非併発/治療前例の約20倍であった。血清抗体価から26例は全て Karp 型感染例と判断されたが、このうち DIC 併発/治療前の5/8例、DIC 非併発の3/14例がマウスに対して弱毒性の JP-1 型感染であり、同型でも臨床経過と血中 Ot 定量値に差が認められた。26例の基礎疾患や炎症マーカーの定量値等は未検討であるが、DIC 併発、非併発例の有効治療までの日数差はわずか1日であった。今回の検討で、重症化防止には、早期の有効治療により体内での Ot 増殖を早急に抑制することの必要性が血中コピー数の定量による数値から読み取れた。

<sup>1\*</sup>：静岡県環境衛生科学研究所

<sup>2\*</sup>：馬原アカリ医学研究所

<sup>3\*</sup>：鹿児島大学共同獣医学部

<sup>4\*</sup>：福島県衛生研究所

## 秋田県における *Rickettsia helvetica* 保有マダニ刺咬症例初確認と感染推定地の調査

佐藤寛子，村井博宣<sup>\*1</sup>，柴田ちひろ

秋野和華子，齊藤志保子，藤田博己<sup>\*2</sup>



安藤匡子<sup>\*3</sup>

第21回リケッチア研究会合同研究発表会

2014年12月、東京都

秋田県内において、マダニ刺咬症として受診した患者から摘出されたマダニから *Rickettsia helvetica* が検出されたため、その後の調査と併せて報告する。

患者は69才女性。9月28日、秋田駒ヶ岳を登山。翌日、後頭部の付着物に気付く。9月30日、近医を受診、同日泉皮膚科クリニックを紹介受診、後頭部からマダニ1匹が摘出され、ミノマイシン（200 mg/day）を10日間服用、皮膚炎症や発熱などの症状がないまま経過。

摘出したマダニ種はヒトツトゲマダニの雌成虫であった。この虫体からDNAを抽出し17 kDa および *gltA* 領域におけるPCRおよびダイレクトシーケンスにより紅斑熱群リケッチア遺伝子の検出と分子系統樹解析を行った。その結果、検出された遺伝子が *R. helvetica* と相同性が高いことが示された。また、患者血液をマダニ刺咬確認から10日目（10/9）と21日目（10/20）に採取し、紅斑熱群、SFTSおよび野兎病の抗体価測定を行ったが抗体価上昇は確認されなかった。

10/26に感染推定地とされる秋田駒ヶ岳の中生保内登り口付近でフランネル布による旗ずり法で行った。ヤマトマダニ♂、キチマダニ♀の成虫各1個体が捕集されたが、双方から紅斑熱群リケッチアは検出されなかった。本症例はマダニ刺咬後の早期摘出と抗生剤投与開始が奏功し、発病を未然に防ぐことができたものと考えられる。秋田県は、つつが虫病の啓発と検査体制を整え医療機関と県民の意識を高める努力を続けてきたが、今回の症例により紅斑熱群リケッチア症についても早急に体制を確立し、啓発を推進すると共に県内のマダニ生息状況を把握する必要性を認識させられた。また、現在、感染症法において *R. japonica* 以外の紅斑熱群リケッチア感染症は届出対象となっていないが、近年の北日本における患者発生を踏まえ、その実態把握と病原性の解明が望まれる。

<sup>\*1</sup>：泉皮膚科クリニック

<sup>\*2</sup>：馬原アカリ医学研究所

<sup>\*3</sup>：鹿児島大学共同獣医学部

## 八郎湖および周辺地下水流域におけるリン濃度の変遷

玉田将文、佐藤清隆、大渕志伸

第62回日本生態学会

2015年3月、鹿児島市

八郎湖は1977（S52）年の国営八郎潟干拓事業完了後、富栄養化に伴う水質汚濁が進行し、2007（H19）年には湖沼水質保全特別措置法に基づく水質環境基準値の確保が緊要な指定湖沼に指定された。秋田県では、八郎湖の水質改善のために八郎湖環境対策室を設置し、「八郎湖に係る湖沼水質保全計画（第1期）」を策定し、水質保全施策を総合的に講じてきた。しかし、富栄養化の原因物質の1つであるリン（T-P）は、年間を通してほぼ水質環境基準値を超過しており、2012（H24）年にはアオコが大発生し、八郎湖の水質は過去最悪の数値となった。

一方、秋田県の既往調査により、八郎湖干拓地南部において、T-P濃度が極めて高い排水路が発見された。この排水路から八郎湖に流入するT-P推定年間負荷量は、全負荷量の26.5%と試算されている。この原因として、同干拓地南部の方上地区周辺における高濃度T-P湧出水の存在が指摘されており、八郎湖の水質汚濁の一要因として看過できないことから、これまで秋田県は、高濃度T-P湧出水・地下水・地質等に関する各種調査を実施してきた。その結果、高濃度T-P湧出水の起源として、地中堆積物中に含有されたリンの溶脱、正面堤防下部地下水の影響および干拓地内の水田等土壌表層からの流入可能性等が指摘されている。

しかし、定量的な湧出機構に関して不明な点が多く、1993（H5）年以降、面的調査が実施されておらず、現状が不明である。

そこで本研究では、同干拓地南部における農業用排水路表層水および観測井戸水中高濃度T-Pの現状を把握するために、リン濃度調査を実施した。

その結果、農業用排水路表層水におけるリン濃度は、0.063～2.5 mg/L、平均0.72 mg/Lであり、既報よりやや低い値であったが、周辺農地からの排水による影響等のほか、季節変動も予

測されるため、それらの要因を考慮した継続的な調査が必要であると考えられた。また観測井戸水中 T-P 濃度は、3.7～26.9 mg/L を示した。この調査井戸では、年間を通じて継続的な T-P 濃度のモニタリングがなされており、現在でも 30 mg/L 前後の濃度が検出されていることから、ほぼ同レベルの濃度であることが示された。さらに、その他観測井戸 6 箇所においても、T-P に対する  $\text{PO}_4^{3-}$  濃度割合が約 70%以上であり、既往と同様の結果が得られ、現在でも高濃度 T-P 地下水の湧出による影響が農業用排水路表層水に及んでいることが示唆された。



## 2. 他誌掲載

### 東日本大震災による災害廃棄物受入れに伴う秋田県内の環境放射能調査結果について

田村高志<sup>\*1</sup>, 玉田将文, 菅原 剛  
高橋英之<sup>\*2</sup>, 高嶋 司, 高橋 浩<sup>\*2</sup>

全国環境研会誌, **39**, 2, 2014, 10-15.

東日本大震災の復興支援として、秋田市等の県内6カ所の廃棄物処理施設において実施した岩手県宮古市および野田村の災害廃棄物広域処理において、広域処理実施前後における関連環境試料の放射能等の測定を実施した。

その結果、地下水・放流水、河川水、汚泥、底質試料から、放射性セシウムは事前・事後調査いずれからもほとんど検出されなかった。土壌試料からは放射性セシウムが検出されたが、セシウム137が検出された割合は事前調査では67検体中9検体（13%）、事後調査では135検体中36検体（27%）であった。このうちセシウム134も検出されたのは事後調査における2検体のみであった。

セシウム137のみが検出された検体についてはチェルノブイリ原発事故の影響だと思われる。セシウム134、セシウム137の両方が検出された2検体については福島第一原発事故の影響も反映されたと思われるが、セシウム134の検出濃度は6.2 Bq/kg, 6.4 Bq/kg, セシウム137の検出濃度は12 Bq/kg, 6.8 Bq/kgと低い数値であった。

これらのことから、災害廃棄物受入れによる放射能の影響は少なく、広域処理を行った施設の外部環境への放射性セシウムの飛散を懸念する必要はないと推察された。

<sup>\*1</sup>: 由利地域振興局福祉環境部

<sup>\*2</sup>: 元健康環境センター

Epidemiological Evidence of Lesser Role of Thermostable Direct Hemolysin (TDH)-Related Hemolysin (TRH) Than TDH on *Vibrio parahaemolyticus* Pathogenicity

Shioko Saito, Yoshito Iwade<sup>\*1</sup>,  
Eisuke Tokuoka<sup>\*2</sup>, Tomohiro Nishio<sup>\*3</sup>,  
Yoshimitsu Otomo<sup>\*4</sup>, Emiko Araki<sup>\*5</sup>,  
Hirotaka Konuma<sup>\*5</sup>, Hiroshi Nakagawa<sup>\*6</sup>,  
Hiroyuki Tanaka<sup>\*7</sup>, Kanji Sugiyama<sup>\*3</sup>,  
Akio Hasegawa<sup>\*8</sup>, <sup>\*9</sup>Yoshiko Sugita-Konishi<sup>\*8,9</sup>  
and Yukiko Hara-Kudo<sup>\*8,9</sup>

FOODBORNE PATHOGENS AND DISEASE,  
**12**, 2, 2015, 131-138.

*Vibrio parahaemolyticus* carrying the *tdh* gene, encoding the thermostable direct hemolysin (TDH), or the *trh* gene, encoding the TDH-related hemolysin (TRH), are both considered virulent strains. There are, however, disproportionately fewer reports of infections caused by seafood contaminated with *trh*-positive strains than by seafood contaminated with *tdh*-positive strains. Bivalves such as clams and oysters are the major seafood varieties associated with the infections. In this study, the prevalence of strains possessing the *tdh* and *trh* genes was investigated in Japan in 74 samples collected in 2007–2008 and in 177 samples collected in 2010 of domestic bivalves, bloody clams, hen clams, short-neck clams, and rock oysters. The *tdh*-positive and *trh*-negative, *tdh*-negative and *trh*-positive, and *tdh*-positive and *trh*-positive samples represented 5.4%, 12.2%, and 4.1% of all samples collected in 2007–2008, and 5.1%, 18.6%, and 5.6% of all samples collected in 2010, respectively. As determined by polymerase chain reaction, the prevalence of *tdh* negative and *trh* positive in all samples was two to four times higher than that of *tdh* positive and *trh* negative. In the samples collected in 2010, the *tdh*-negative and *trh*-positive *V. parahaemolyticus* (20 samples) was more often isolated than *tdh*-positive and *trh*-negative *V. parahaemolyticus* (7 samples). The most common serotype of *tdh*-positive isolates (22 of 24 strains) was pandemic O3:K6. The *trh*-positive isolates (61 strains) were various serotypes including OUT:KUT. In 330 *V. parahaemolyticus*

outbreaks and sporadic infections in Japan, most outbreaks and sporadic infections were caused by tdh-positive and trh-negative strains (89.4%). The frequencies of infections caused by tdh-negative and trh-positive, and both tdh- and trh-positive strains were 1.2% and 3.0%, respectively. This finding suggests that the virulence of trh might be less than that of tdh, although trhpositive *V. parahaemolyticus* frequently contaminated bivalves.

\*<sup>1</sup>:Mie Prefecture Health and Environment Research Institute, Yokkaichi, Japan.

\*<sup>2</sup>:Kumamoto Prefectural Institute of Public Health and Environmental Science, Udo, Japan.

\*<sup>3</sup>:Shizuoka Institute of Environment and Hygiene, Shizuoka, Japan.

\*<sup>4</sup>:Hirosaki University, Hirosaki, Japan.

\*<sup>5</sup>:Department of Fisheries, School of Marine Science and Technology, Tokai University, Shizuoka, Japan.

\*<sup>6</sup>:BML Food Science Solutions, Tokyo, Japan.

\*<sup>7</sup>:Japan Food Research Laboratories, Tokyo, Japan.

\*<sup>8</sup>:The University of Tokyo, Tokyo, Japan.

\*<sup>9</sup>:Division of Microbiology, National Institute of Health Sciences, Tokyo, Japan.

## 「つつが虫病」

佐藤寛子

呼吸, 33, 12, 2014, 1249-1255.

つつが虫病は *Orientia tsutsugamushi* (*O. tsutsugamushi*) を保有するツツガムシの幼虫に吸着されることにより、感染・発病する熱性発疹症で、感染症法に基づく感染症発生動向調査では、4類感染症に分類される全数届出疾患である。患者発生は西アジア～極東ロシア～太平洋地域にかけた広域に渡る。日本国内においては、年間400例前後の患者発生報告があるが、発生時期はベクターの種類やその幼虫活動期により地域特性がある。つつが虫病は、急速に重症化し脳炎、DIC併発により死に至る場合があるため、早期診断と適正な治療が必須である。

つつが虫病には、三大主徴と呼ばれる「発熱」と体幹部中心の「発疹」、「刺し口」と呼ばれるツツガムシの吸着跡である皮膚病変が挙げられるが、この他一般的な生化学的血液検査では、他疾患との鑑別と確定診断に直結する情報を得ることは困難である。確定診断には、遺伝子診断法あるいは血清学的診断法が的確であるが、いずれもつつが虫病を想定することが前提となるため、患者への詳細な問診が早期診断と治療の鍵となる。しかし、この確定検査診断は対応できる検査研究機関が多くないことに加え、対応できる抗原型が限定されている機関もあることから、治療はされても届出に結びつかない例が少なくないと思われる。そのため、届出数に真の患者数が反映されていないとも考えられることから、医療機関と公衆衛生行政の連携の元、検査体制の全国的な整備とサーベイランスの強化、地域への定期的な情報発信の継続が望まれる。

## 秋田県におけるShimokoshi型つつが虫の遡及的疫学調査

佐藤寛子, 柴田ちひろ, 斎藤博之, 須藤恒久\*<sup>1</sup>

衛生動物, 65, 4, 2014, 183-188.

つつが虫病リケッチア *Orientia tsutsugamushi* の Shimokoshi 型による感染例は稀とされ、その臨床像や疫学的な特徴については不明な点が多い。われわれは、秋田県において Shimokoshi 型を抗体検査対象に取り入れた 2009 年以降の 4 年間に 5 症例の Shimokoshi 型つつが虫病患者が確認された。これを契機に、過去の疑い例を含めた症例を再検討したところ、秋田県において 1992 年～2012 年に 15 症例の Shimokoshi 型つつが虫病が発生していたことが確認された。これらは、軽症例から重症例を含む多彩な臨床像を示していた。発生時期は春（4 月から 6 月）と秋（10 月と 11 月）で、地域は県の北部から南部にまでおよんでいた。また、Shimokoshi 型検出を目的とした PCR primer を設計し、3 検体からこの型の DNA を検出した。さらに、1 例の患者から国内では 2 株目となる Shimokoshi 型リケ

ッチアを分離した。また、15 症例のうち、2 例は当時抗体陰性と判定され、つつが虫病を否定されていた。これは当時抗体検査に使用していた標準 3 抗原 (Gilliam, Karp, Kato) と Shimokoshi 抗原は交差反応性が非常に低いことが要因と考えられる。現在の所、多くの検査機関において Shimokoshi 型は日常検査に取り入れられていない。今後は Shimokoshi 型感染例においても、積極的な実験室診断体制の整備が望まれ、またヒトに対する病原性の再評価とベクター解明に向けた調査が課題となる。

\*1：秋田大学医学部名誉教授

## 食品・臨床材料・ふき取りの前処理法

斎藤博之、野田 衛<sup>\*1</sup>

食品衛生検査指針 2015 (微生物編), 2015, 607-617.

パンソルビン・トラップ法は一般食品からのウイルス検出法であり、焼きそば等の油成分が多い食品、ポテトサラダ等の炭水化物が多い食品など多種、多様な食品に適応することができる。本法はウイルスを捕捉するために抗体を使用するが、多くの検査室ではウイルス特異的抗体は入手できないことから、ウイルス特異的抗体の替りに、ガンマグロブリン製剤を使用することになる。その場合、患者便等由来のウイルスを用いて、本法でウイルスが回収できること (抗体陽性である) を確認しておく必要がある。本法で得られた試料には大量のブドウ球菌由来

のDNAやRNAが含まれるが、それらが逆転写反応およびPCR反応等に影響し、その結果として検出率や遺伝子定量値に影響を及ぼすので、核酸抽出以降の操作について本法で得た試料での有用性を検証しておく必要がある。

\*1：国立医薬品食品衛生研究所

## 一本鎖高次構造多形 (SSCP) 解析法

斎藤博之

食品衛生検査指針 2015 (微生物編), 2015, 648-656.

食品検体や臨床検体からRT-PCRによって検出されたウイルス遺伝子を解析し、原因究明に必要な科学的情報を得るために、PCR増幅産物の塩基配列を決定する方法が用いられることが多い。一方で、解析すべきPCR産物の数が多い場合には、全ての被検体の塩基配列を決定するのに時間を要するため、行政上の事例対応との連携が難しいことが想定される。ここで解説する一本鎖高次構造多型 (Single Strand Conformation Polymorphism : SSCP) 解析法は、塩基配列そのものを知ることはできないが、一塩基の違いで電気泳動バンドの位置が鋭敏に変動するという特長がある。また、複数種類の塩基配列が混在していてもそのまま解析できるという利点もある。これらの性質をもとに多数のPCR産物の塩基配列の異同を同時に照合することができるので、集団感染事例の全体像を早期に把握するのに適している。

---

---

秋田県健康環境センター年報  
第 10 号 2014

---

発行日 平成 27 年 12 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

---