ISSN 1881-6053

# 秋田県健康環境センター年報

# 第 11 号

平成27年度

ANNUAL REPORT

## OF

AKITA RESEARCH CENTER FOR PUBLIC HEALTH AND ENVIRONMENT

No. 11 2015

秋田県健康環境センター

# はじめに

秋田県健康環境センターは、保健衛生・環境行政を科学的・技術的に支援する試験 研究機関として、旧衛生科学研究所と旧環境センターが統合した平成18年度から今日 まで、生活環境の保全と保健衛生の向上を目的に歩みを進めてまいりました。

当センターの運営に当たっては、「中長期計画」により定めた今後の方向性に沿って、「健康被害の防止」と「環境の保全」を基本方針として事業を推進しております。

行政等からの依頼検査については、感染症や食品衛生に関する細菌・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。

調査研究については、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医薬品食品衛生研究所の研究班、環境研究所との共同研究 など全国的な取り組みにも参加しています。

県民への情報提供については、感染症発生動向調査の集計・解析を行う感染症情報 センターの業務運営、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るデータを発信しているほか、分析等の技術指導 や出前講座など健康予防や環境保全に関する啓発活動に努めています。

今年は、中南米で流行したジカ熱が新たな感染症として注目されるとともに、改正 感染症法が4月1日に施行されたことを受け、情報・検体収集体制の強化や検査の信頼 性の確保に向けた一層の取組が求められております。

当センターでは、県民の安全・安心の確保の視点から、地域や国境の枠を越えて発 生する緊急事態に対しても迅速に調査・検査が実施できるよう、体制整備に努めてお ります。

この年報は、主に平成27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。本書を通じてより多くの皆様に、当センターの活動に対するご理解とご関心を深めていただきますことを祈念しております。

平成28年12月

秋田県健康環境センター所長 塚田 善也

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 調查研究報告

•	秋田県で分離された結核菌のイソニアジド及びピラジナミド耐性関連遺伝子と遺伝系	
	統の解析	20
•	カンピロバクターPenner PCR 型別法の確立と有用性の検証	23
•	雄物川流域におけるアカツツガムシ生息調査(2011 年~2014 年)	26
•	パンソルビン・トラップ法の実用段階における問題点の検討	37
•	1,4-ジオキサン分解能を有する活性汚泥の分解能向上と保存の検討	52
•	玉川上流部で実施した中和実証試験の結果の検討	57

IV	発表業績	
1.	. 学会発表	63
2.	. 他誌揭載論文等	69

# I 健康環境センターの概要

## 1. 沿 革

	ſ	
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。
		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 千秋庁舎に企画管理室及び保健衛生部を	合し,健康環境センターとして発足。 ,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, 化学物質部門を統合した理化学班を環境 生部及び環境・理化学部とする。	庁舎を統合。保健衛生部の理化学部門と環境部の ・理化学部内に設置。組織を企画管理室,保健衛
22. 4	保健所の試験検査課を統合。保健衛生部 科学班を健康科学・管理班に名称変更。 理化学部には,理化学班を再編した食品 環境調査班を名称変更した環境保全班を	3の微生物班を細菌班とウイルス班に再編し,健康 環境・理化学部を理化学部と環境保全部に再編。 1理化学班と環境理化学班を設置。環境保全部には 設置。
24.4	<ul> <li></li></ul>	務管理班と企画情報班を設置。保健衛生部の健康 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						所	長			(平)	成 28	年	4月1日現	在)
	企画管理室長					保健衛生部長				理化学部長			環境保全部長		
	総務管理班 企画情報班			細菌班 ウイル		ウイルス野	圧	理化学班				環境保全班			
	主幹	1	主任研究員	1		上席研究員	1	上席研究員	1		主任研究員	3		上席研究員	1
	主査	2	専門員	1		主任研究員	2	主任研究員	3		専門員	1		主任研究員	2
	技能主任	1	研究員	1		研究員	2	研究員	1		研究員	3		専門員	2
	臨時職員	1				非常勤職員	1				技師	1		研究員	3
						臨時職員	1				非常勤職員	1		技師	2
														臨時職員	1
	計	5	1 T	3		± + ∉	7		5		計	9		1 T	11
	計	5	計	3		計	7	計	5	•-L- T	計	9		計	_

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

(半成 28 年	キ4月	1日	現仕)
----------	-----	----	-----

		職	名	氏	名
		所	長	塚 田	善也
企画管理室		室	長	齊 藤	志保子
	総務管理班	主幹(美	<b>ŧ) 班 長</b>	工藤	正博
		主	查	朝 倉	由佳理
		主	查	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
		専 「	月 員	黒 丸	彰 徳
		研	范 員	佐 藤	由衣子
保健衛生部		部	長	鈴 木	忠之
	細菌班	上席研究員	(兼) 班長	熊 谷	優 子
		主任石	开 究 員	髙 橋	志 保
		主任石	开 究 員	今 野	貴 之
		研	范 員	樫尾	拓 子
		研	范 員	鈴 木	純恵
	ウイルス班	上席研究員	(兼)班長	斎 藤	博之
		主任研	开 究 員	秋 野	和華子
		主任研	开 究 員	佐 藤	寛 子
		主任研	开 究 員	藤 谷	陽 子
		研	ǐ 員	柴 田	ちひろ
理化学部		習	長	圓 子	隆信
	理化学班	主任研究員	(兼)班長	小 林	貴 司
		主任研	开 究 員	中 村	淳 子
		主任研	开 究 員	村 山	力 則
		専 同	月 員	佐藤	晴 美
		研	· 員	小川	千 春
		研	で 員	今 野	禄朗
		研	で 員	櫻庭	香織
		技	師	宇賀神	理奈
環境保全部		沿	長	大 渕	志伸
	環境保全班	上席研究員	(兼)班長	黒 沢	新
		主任石	开 究 員	清 水	匠
		主任石	开 究 員	松渕	亜希子
		専 「	月 員	高嶋	Ē
		専 月	月 員	大 友	久 利
		研	ぞ 員	玉田	将 文
		研	ii 員	生魚	利 治
		研	ii 員	佐 藤	健
		技	師	伊藤	悠
		技	師	伊藤	佑 歩

## 5. 業務内容

(平成28年4月1日現在)

企	総	務	管	理	班	<ul> <li>・人事,服務</li> <li>・予算,決算</li> <li>・庁舎管理,庶務一般</li> </ul>
画 管 理 室	企	画	情	報	班	<ul> <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>・行政検査業務の管理</li> <li>・危機管理</li> <li>・精度管理</li> </ul>
保健衛生部	糸田		菌		班	<ul> <li>・感染症発生動向調査に伴う病原体検査業務</li> <li>・細菌感染症と食中毒の試験検査及び調査研究</li> <li>・薬剤耐性菌に関する調査研究</li> <li>・結核菌の分子疫学解析</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> <li>・結核登録者情報調査</li> <li>・地方衛生研究所技術協議会レファレンスセンター業務 (カンピロバクター,百日咳・ジフテリア・ボツリヌス, 薬剤耐性菌)</li> </ul>
	Ċ	イ	jĿ	ス	班	<ul> <li>・感染症発生動向調査に伴う病原体検査業務</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>・感染症流行予測調査(インフルエンザ・日本脳炎)</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	2	学	班	<ul> <li>・食品中残留農薬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>・廃棄物関係行政検査</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> <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>・廃棄物関係行政検査</li> <li>・生活衛生関係検査</li> <li>・環境放射能の測定及び常時監視</li> <li>・大気汚染常時監視</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28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)
11	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 (μECD)
ガスクロマトグラフ質量分析計	島津 GCMS-QP2010 Ultra
11	島津 GCMS-QP2010 Plus
11	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
11	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-120
原子吸光分光光度計	バリアン・テクノロジーズ 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
全有機炭素分析装置	三菱化学アナリテック TOC-300V

# 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25	平成26	平成27	
	感染症発生動向調査病原体	ウイルス分離等検査	861	1,052	1,121	
	別検査	細菌検査	1,438	1,070	426	
		インフルエンザ感染源調査	100	100	100	
	感染症流行予測調查	日本脳炎感染源調査	70	70	70	
		肺炎球菌感染源調查	- 1	0	7	
	合山害竺絵本	胃腸炎ウイルス検査(ノロウイルス等)	755	496	564	
	及十毋寸快重	細菌検査	3,282	1,798	810	
	HIV抗体検查 <sup>*1</sup>		1	1		
	HIV抗体確認検查 <sup>*1</sup>		0	1		
	性器クラミジア抗体検査 <sup>*1</sup>		134	122		
	梅毒抗体検查*1		134	122		
	B型肝炎抗原検查*1		124	147	—	
	C型肝炎抗体検查*1		124	150		
	麻疹・風疹・発疹性ウイル	276	218	0		
細菌・ウイルス等の試験検査	新型インフルエンザ			—	—	
	新型インフルエンザ等呼吸	-	289	596		
	新型インフルエンザタミフ	0	0	4		
	SFTSウイルス検査 <sup>*3</sup>		-	0	0	
	デングウイルス検査 <sup>*4</sup>		-	7	0	
	MERSウイルス検査 <sup>*5</sup>		-	—	0	
	狂犬病抗体検查*6		-	—	12	
	狂犬病PCR検查 <sup>*6</sup>	-	_	6		
	3類感染症に係わる病原微生	490	484	310		
	地研	カンピロバクター (薬剤感受性試験)	37	53	43	
	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	159	52	43	
	結核菌RFLP検査, VNTR検	查	67	81	63	
	つつが虫病血清検査		105	104	83	
	その他微生物学的検査	その他微生物学的検査			84	
	感染症検查外部精度管理*7	感染症検查外部精度管理 <sup>*7</sup>				
	食品収去検査		953	902	834	
食品衛生に係る検査	食中毒菌汚染実態調査		290	293	—	
	精度管理		3	3	3	
	公衆浴場水, 遊泳プール水(	の大腸菌検査	32	25	12	
生活衛生に係る検査	貸しおしぼり検査		16	16	8	
	公衆浴場等レジオネラ属菌	公衆浴場等レジオネラ属菌検査			25	
	公共用水域水質環境調査		47	47	47	
水質汚濁対策	八郎湖水質保全調查		78	79	79	
	工場・事業場排水基準検査	工場・事業場排水基準検査				
廃棄物対策	産業廃棄物等基準検査		20	20	25	
マス・スクリーニング	先天性代謝異常, 内分泌疾,	患*8	2,617			
医薬品等監視指導業務に係る検査	查 医薬品, 医薬部外品, 医療	幾器 (細菌)	3	3	3	
			13 028	8 5/12	5 601	

\*1 性感染症、肝炎検査については、平成27年4月から外部委託となった。

\*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。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。

\*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。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。

\*5 MERSウイルス検査については、平成27年度から新たに項目を起こした。

\*6 狂犬病検査については、平成27年度から新たに項目を起こした。

\*7 外部精度管理の感染症検査外部精度管理については、平成27年度から新たに項目を起こした。

\*8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25	平成26	平成27
感染症発生動向調査に伴う検査	秋田市保健所依頼分(再揭)	450	365	303
	ウイルス分離等検査	0	0	0
	食中毒等胃腸炎ウイルス検査 (ノロウイルス等)	24	1	0
	麻疹・風疹・発疹性ウイルス検査*1	-	42	63
	新型インフルエンザ	3	_	
	新型インフルエンザ等呼吸器ウイルス検査 <sup>*2</sup>	_	3	2
細菌・ウイルス等の試験検査	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
	デングウイルス検査*4	0	3	2
	MERSウイルス検査 <sup>*5</sup>	_	_	0
	細菌培養同定検査	13	9	4
	細菌遺伝子解析検査	0	2	1
		490	425	375

\*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。

\*5 MERSウイルス検査については、平成27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25	平成26	平成27
			収	集	468	468	477
			報	告	52	52	53
		週報	還	元	52	52	53
			解	析	52	52	53
	串老桂却		提	:供	468	468	477
			収	集	108	108	108
甘熱、地士咸沈には却よいな。			報	告	12	12	12
本軒・地方感染症(雨報ビンター) (感染症発生動向調査依頼業務)		月報	還	元	12	12	12
			解	解析		12	12
			提	:供	108	108	108
			報告	ウイルス	526	563	548
	病原休情報			細菌	310	286	139
			還	還元		24	24
		解	析	24	24	24	
	解析評価委員会資料	解析評価委員会資料提供				6	6
			収	集	108	108	108
			報	告	12	12	12
		月報	還	元	12	12	12
			解	析	12	12	12
結核登録者情報調杏依頼業務	 		提	:供	108	108	108
			収	集	9	9	9
			報	告	1	1	1
		年報*1	還	元	1	1	1
			解	析	1	1	1
			提	供	9	9	9
	合 計				2,507	2,520	2,379

\*1 新規結核登録患者数:87人、年末時結核登録者数:202人(平成27年1月~12月)

#### 1.4 理化学部行政依頼検查

					(件数)
項目		年 度	平成25	平成26	平成27
	残留抗生物質・残留合成抗	98	273	732	
会日転相業政に反て於木	残留農薬検査		6,537	16,878	19,242
良加監祝耒務に体る快宜	食品収去検査(食品添加物	7等)	524	558	544
	精度管理		21	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, 医病	0	0	25	
家庭用品試買検査	有害物質		51	24	8
	空間線量(モニタリングオ	ポスト) *1	2,190	2,190	_
	全ベータ線		156	144	132
<b></b> <sup><sup>「</sup>東寬放射能水準調査</sup>	核種分析		123	123	123
	分析確認	110	110	110	
	空間線量	12	12	12	
福島原子力発電所事故に伴う	核種分析	蛇口水	20	20	20
緊急環境放射能調查		食品等試料	339	306	258
		県産農産物等試料	642	570	390
その仲堅負導時な針が調木	+たモハ+に*2	降下物	0	0	24
ての他系志埰児原別化詞重	核性分析	浮遊じん	0	0	24
		公共用水域水質調査	36	35	35
水所江海社会	環境調査	地下水調査	0	0	0
小貝行曲刈來		緊急調査	0	0	0
	工場排水基準検査		67	59	38
土壤汚染対策	汚染土壤処理事業所検査		22	33	11
	産業廃棄物等基準検査		253	291	269
廃棄物対策	能代産業廃棄物処理セン	能代地区周辺環境調査	819	574	574
	ター環境保全対策	能代産業廃棄物処理 センター関連調査	3,297	2,681	3,647
	合 計		15,317	24,902	26,239

\*1 環境放射能水準調査の空間線量(モニタリングポスト)については、平成27年度より理化学部から環境保全部に業務 移行した。

\*2 その他緊急環境放射能調査の核種分析については、平成27年度より環境保全部から理化学部に業務移行した。

## 1.5 環境保全部行政依頼検査

					(件数)
項目		年 度	平成25	平成26	平成27
		一般環境大気測定局	57	50	50
			(466,452)	(422,880)	(420,099)
	大気汚染常時監視*1	自動車排出ガス測定局	15	15	15
			(128,634)	(128,966)	(130,155)
大気汚染対策		工場局	(547,254)	(530,999)	(529,115)
	ばい煙排出基準検査		29	28	25
	酸性雨調查	酸性雨実態調査	1,390	1,400	1,390
	アスベスト対策	石綿飛散調査	44	60	40
		蛇口水	36	0	0
福島原子力発電所事故に伴う 緊急環境放射能調査	核種分析	環境試料	919	514	398
		畜産試料	14	0	0
環境放射能調查	空間線量(モニタリングポス)	空間線量(モニタリングポスト)*2			
	四倍湖木	公共用水域水質調査	3,814	4,257	4,338
	<sup>垛</sup> 堤,砌重	緊急調査	674	192	182
	工場・事業場排水基準検査	1,998	1,882	1,600	
水質汚濁対策	山如油北所但人封签調本	底質調査	36	36	36
	八时明八員休主刈來調直	緊急調査	0	0	0
	玉川酸性水影響調査	玉川酸性水影響調査			317
	十和田湖水質保全対策調査	240	240	240	
土壤汚染対策	汚染土壤処理事業所検査		46	69	34
	遊泳用プール水質検査	24	24	10	
生活衛生に係る検査	公衆浴場水質検査		32	32	32
	食肉衛生検査所自主検査	20	20	0	
騒音対策	航空機騒音調査		714	722	725
化学物質対策	化学物質環境調査		195	274	284
	産業廃棄物等基準検査		529	505	493
廃棄物対策	能代産業廃棄物処理センタート	<b>J</b> 連調査	1,221	992	1,232
	緊急調査	緊急調査			74
合	計 (大気汚染常時監視を)	余く)	12,292	11,564	13,646

\*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環境放射能調査の空間線量(モニタリングポスト)については、平成27年度より理化学部から環境保全部に業務移行した。

# 2. 研修・学会等

# 2.1 研修等参加

年月日	研修名	参加者	開催地
27.05.13	危険ドラッグ検査担当者の施設見学 (東京都健康安全研究センター)	松渕亜希子 今野禄朗	東京都
27.05.17	病原体等の包装・運搬講習会	圓子隆信	東京都
27.05.22	平成 27 年度食品衛生検查施設信頼性確保部門等責任者研修会	梶谷明弘	東京都
27.05.25~29	平成 27 年度アスベスト分析研修	佐藤健	埼玉県
27.06.04~05	厚労省通知法による腸管出血性大腸菌検査実習	髙橋志保	東京都
27.06.04~19	平成 27 年度機器分析研修	佐藤清隆	埼玉県
27.06.05	危険ドラッグ検査担当者の施設見学 (秋田県警察本部刑事部科学捜査研究所)	鈴木忠之 松渕亜希子 今野禄朗 宇賀神理奈	秋田市
27.07.16	狂犬病研修会	佐藤寛子	秋田市
27.09.15	第 28 回東北食中毒研究会	齊藤志保子 圓子隆信	青森県
27.10.01~02	平成 27 年度地方衛生研究所全国協議会 北海道・東北・新潟支部微生物研究部会総会	今野貴之 秋野和華子	新潟県
27.10.08~09	平成 27 年度地研北海道・東北・新潟支部衛生化学研究部 会総会	松渕亜希子 宇賀神理奈	岩手県
27.10.22~23	平成 27 年度地方衛生研究所全国協議会 北海道・東北・新潟支部公衆衛生情報研究部会総会	柴田ちひろ	青森県
27.11.05~06	平成 27 年度秋田県食品衛生監視員等研修会	今野禄朗 宇賀神理奈	潟上市
27.11.13	平成 27 年度指定薬物分析研修会議について	宇賀神理奈	東京都
27.11.30~12.04	環境放射能分析研修	村山力則	千葉県
27.12.07~10	平成 27 年度環境放射能分析・測定の基礎	佐藤清隆	千葉県
27.12.15~17	院内感染に関連する薬剤耐性菌の検査に関する研修	髙橋志保	東京都
28.01.26~27	薬剤耐性菌等研修会	圓子隆信	東京都
28.02.17~18	平成 27 年度希少感染症診断技術研修会	髙橋志保 佐藤寛子	東京都
28.03.22	病原体検出情報システム操作説明会	柴田ちひろ	東京都

# 2.2 学会等出席

年月日	学 会 名	出席者 (○発表者)	開催地
27.06.12	第 25 回秋田応用生命科学研究会講演会	○斎藤博之	秋田市
27.06.24~26	第 24 回環境化学討論会	今野禄朗	北海道
27.06.26~28	The 23th Seminar on Acari-Diseases Interface	○佐藤寛子	宮城県
27.07.11	第 371 回日本皮膚科学会秋田地方会	佐藤寛子	秋田市
27.07.23~24	衛生微生物技術協議会第 36 回研究会	熊谷優子 今野貴之 斎藤博之	宮城県
		佐藤寛子 柴田ちひろ	
	第 64 回東北公衆衛生学会	<ul> <li>○田中貴子</li> <li>熊谷優子</li> <li>髙橋志保</li> <li>○佐藤寛子</li> </ul>	秋田市
27.08.15	第7回J感染制御ネットワークフォーラム	斎藤博之	宮城県
27.09.03	平成 27 年度全国環境研協議会廃棄物資源循環学会	佐藤清隆	福岡県
27.09.15~17	第 56 回大気環境学会	佐藤健	東京都
27.10.09	日本獣医公衆衛生学会(東北地区)	齊藤志保子	岩手県
27.10.29~30	第110回日本食品衛生学会学術講演会	○斎藤博之 今野禄朗	京都府
27.11.04~06	第74回日本公衆衛生学会	〇田中貴子	長崎県
27.11.12~13	第 36 回日本食品微生物学会学術総会	<ul> <li>齊藤志保子</li> <li>今野貴之</li> <li>○斎藤博之</li> <li>○秋野和華子</li> </ul>	神奈川県
27.11.21	第 27 回ウイルス性下痢症研究会学術集会	斎藤博之	福岡県
27.11.22~24	第 63 回日本ウイルス学会学術集会	○斎藤博之	福岡県
27.11.27	第 26 回秋田応用生命科学研究会講演会	○斎藤博之	秋田市
27.11.28~29	第 22 回リケッチア研究会研究発表会	○佐藤寛子	東京都
27.12.03~04	第 52 回全国衛生化学技術協議会年会	今野禄朗	静岡県
28.02.26~28	平成 27 年度日本獣医師会獣医学術学会年次大会	斎藤博之 佐藤寛子 柴田ちひろ	秋田市
28.03.16~18	第 50 回日本水環境学会	小林貴司 〇成田修司 生魚利治 佐藤清隆	徳島県
$28.03.23 \sim 25$	弟 89 回日 本 細 菌 字 会	今野貴乙	大阪府

## 2.3 健康環境センター主催研究発表会

開催日: 平成 27 年 7 月 10 日(金)

開催場所 : 秋田県総合保健センター

	演 題 名	発表者		
1	結核対策支援のための高齢者福祉施設等におけるインタビュー調査結果について	田中貴子		
2	サルモネラ検査における遺伝子解析法の有用性について	今野貴之		
3	秋田県における Rickettsia helvetica 保有マダニ刺咬例初確認と感染推定地の調査に	<i>仕</i>		
	ついて			
4	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		
5	農産物中の残留農薬一斉分析法の検討及び妥当性評価について	松渕亜希子		
6	水環境中放射性セシウムの迅速・微量分析法の開発	玉田将文		

### 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
28.01.22	平成 27 年度保健環境業務研究発表会 ・平成 18~27 年度における事業場排水の試験検査結果について ・ツキヨタケ中の有毒成分イルジン S の分析について ・カンピロバクターPenner PCR 型別法の確立と食中毒疑い事例への活用	佐藤 健 今野禄朗 今野貴之	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
27.07.27	黄色ブドウ球菌エンテロトキシン の遺伝子検査法について	髙橋志保 今野貴之	秋田市保健所	1 名
27.08.25	<i>Campyrobacter jejuni</i> の Penner PCR 型別法について(菌株供与)	今野貴之	愛知県衛生研究所	1 名
27.09.08	<i>Campyrobacter jejuni</i> の Penner PCR 型別法について(試薬・資料提供)	今野貴之	大阪市立環境科学研 究所	1 名
27.09.29	新型ノロウイルスに有効な簡易検 査キットの開発	斎藤博之	デンカ生研株式会社	2 名
27.10.09	<i>Campyrobacter jejuni</i> の Penner PCR 型別法について(資料提供)	今野貴之	新潟県保健環境科学 研究所	1 名
27.10.27	<i>Campyrobacter jejuni</i> の Penner PCR 型別法について(資料提供)	今野貴之	新潟市衛生環境研究 所	1 名
27.11.24	<i>Campyrobacter jejuni</i> の Penner PCR 型別法について(資料提供)	今野貴之	広島県福山市保健所	1 名
27.12.21	パンソルビン・トラップ法の実技講 習	斎藤博之	メルク株式会社	1 名
28.01.25	新型ノロウイルスに有効な簡易検 査キットの開発	斎藤博之	デンカ生研株式会社	1 名
				10 名

## 2.5.2 出前講座

講 座 名	講師氏名	実施回数	参加者数
油断できない結核	田中貴子	2 回	90 名
細菌性感染症・食中毒について	今野貴之	1 回	25 名
ウイルス性食中毒について	斎藤博之	1 回	46 名
つつが虫病について	佐藤寛子	1 回	33 名
環境中の大気汚染物質について	大渕志伸	1 回	40 名
	合 計	6 回	234 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	27.05.11	小林貴司	秋田県立大学	4 名
食品中の残留農薬について	27.05.18	小林貴司	秋田県立大学	4 名
特殊災害と保安(放射性物質災害)	27.08.18	斎藤博之	消防学校	80 名
高齢者施設等における結核対策とニー ズについて	27.08.27	田中貴子	秋田県健康福祉部健康 推進課	250 名
高齢者結核対策支援の取り組みについ て	27.09.18	田中貴子	八郎潟町結核予防婦人 会	30 名
ウイルスからみた感染症	27.09.30	斎藤博之	秋田地域振興局福祉環 境部	35 名
感染症の最新情報	27.11.10	斎藤博之	由利地域振興局福祉環 境部	120 名
施設における結核対策について	27.11.10	田中貴子	由利地域振興局福祉環 境部	60 名
細菌・ウイルス災害	27.11.17	斎藤博之	消防学校	20 名
冬場に注意したい感染症について ~インフルエンザ・感染性胃腸炎~	27.11.30	斎藤博之	北秋田地域振興局鷹巣 阿仁福祉環境部	30 名
冬場に注意したい感染症について ~インフルエンザ・感染性胃腸炎~	27.12.09	斎藤博之	北秋田地域振興局鷹巣 阿仁福祉環境部	20 名
保健情報学 結核の情報管理・統計	28.01.21	田中貴子	秋田大学大学院医学系 研究科	80 名
		合 計	12 回	733 名

2.6 視察·見学等受入

参加者区分	平成 25 年度		平成 26 年度			平成 27 年度		
小・中学生	0		0		1	(1)	秋田大学教育文化学部附属中学校 (1年生)	
インターンシップ	10	(3)	17	(3)	15	(3)	秋田県立大学生物資源科学部応用 生物科学科・生物環境科学科(3年 生),北海道大学工学部社会工学科 (3年生),秋田工業高等専門学校環 境都市工学科(4年生)	
その他の学生	53	(4)	28	(2)	35	(3)	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科健康 栄養専攻(2 年生),秋田大学大学院 工学資源学研究科博士前期課程生 命科学専攻(1 年次生)	
一般県民	0		0		0		—	
業務関係者 (医師臨床研修含む)	9	(1)	0		0		-	
県外	2	(1)	5	(4)	0		—	
国外	2	(1)	2	(2)	0		_	
合 計	76	(10)	52	(11)	51	(7)		

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
27.07.02	平成 27 年度地方衛生研究所全国協議会	<b></b> 伊	地方衛生研究所全国協議会
	北海道・東北・新潟支部長表彰	<b>佐</b> 藤見丁	北海道・東北・新潟支部

3. 研究業務実績

#### 細菌班

## 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

秋田県における結核患者のほとんどは高齢 者であり、高齢者の結核発病時の対応支援が重 要となっている。そこで、結核新登録者に関す る調査を行うとともに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結核 対応ガイドブックを作成した。また、薬剤耐性 結核の対策のため、治療薬であるイソニアジ ド、ピラジナミ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の導入を目 指し、市立秋田総合病院と共同でイソニアジ ド、ピラジナミドに関連する耐性遺伝子の解析 を行った。

#### 結果

85 件の結核新登録者調査を行い(回収率 41.3%), 結核登録者情報システムから得られ ない登録者の過去の生活歴,結核患者との接触 状況,福祉サービス利用状況等を把握した。高 齢者の結核再燃は11人(12.9%),感染源有が 22人(25.9%),合併症有37人(43.5%),結 核高危険因子(結核に罹患しやすい)有が 20 人(23.5%),在宅福祉サービス利用有 10 人 (11.8%)等であることがわかった。高齢者の 生活パターンに対応するため,高齢者福祉施設 への入所・通所・在宅に合わせた「高齢者福祉 施設等における結核対応ガイドブック」を作成 した。高齢者福祉施設・通所介護事業所、保健 所,及び市立秋田総合病院の医師等に編集協力 してもらうことで,実際に活用する介護職員等 のニーズに即した内容のガイドブックになっ たと考えられる。県内の高齢者福祉施設等への 普及に際しては,長寿社会課,健康推進課,保 健所等の協力のもと周知し,秋田県及びセンタ ーのホームページにも掲載した。

薬剤耐性については,平成 22~27 年に市立 秋田総合病院から受領した結核菌 162 株につい て調査した。イソニアジドについては,医療機 関の感受性試験により耐性と判定された 13 株 を中心に katG, fabG1/inhA, aphC, furA の DNA シークエンス解析を行い,8 株で何らかの耐性 遺伝子変異を検出した。ピラジナミドについて は、医療機関における感受性試験で耐性と判定 された3株を含む75株について pncA のシーク エンス解析を行ったが、遺伝子変異は検出され なかった。

## 食品由来感染症の病原体情報の解析及び共 有化システムの構築に関する研究(厚生労 働科学研究費補助金)

(平成 27 年度~平成 29 年度)

#### 研究概要

食中毒や感染症の発生時において,原因病原 体の検出と感染経路や原因食品の特定を迅速 に行うことが感染拡大の防止に繋がり,行政対 応上重要とされている。従来行われてきたパル スフィールド・ゲル電気泳動(PFGE)法に比べ, 短時間でデジタル化された分子疫学解析結果

(IS コード)が得られる IS-Printing System(東洋 紡)の普及により,各地方衛生研究所による検査 結果の比較が容易となり,広域食中毒事例にお いても活用され始めている。

本研究では、北海道・東北・新潟ブロック内 の地方衛生研究所 11 施設の参加のもと、腸管 出血性大腸菌(EHEC)O157の分子疫学解析手 法の検査精度向上と病原体情報をブロック内 で共有化するための基礎的検討を目的として 精度管理を実施した。また、秋田県のEHEC感 染症流行期における集団感染のサーベイラン スへの試行により、IS-Printing Systemの有用性 を検証した。

#### 結果

IS-Printing System の解析は,平成 27 年度に 秋田県内で分離された4株の EHEC O157 から 作製した DNA 溶液を配布し,結果と画像の提 出を求めた。参加した地方衛生研究所 11 施設 の結果は全て一致し,一定の検査精度が保たれ ていることが確認された。また,今後の情報共 有化に向け各地研の IS-Printing Systemの実施条 件設定やバンド判定時の注意点などについて 10 項目のアンケート調査も同時に行ったとこ ろ,使用機器の違いや独自の工夫が明らかにな った。

秋田県における 10 株での解析では,2 組に IS コードの一致が見られたが,その後の疫学調査 では関連性は見いだせなかった。しかし,分離 された地域が隣接している事例もあり,共通の 感染源の存在は否定できないと考えられた。た だし, IS-Printing System は他の分子疫学解析手 法に比べ,解析能がやや劣ることも指摘されて おり,結果の解釈においては疫学調査の結果等 も踏まえて行う必要があると思われる。各施設 での検査精度の向上のため,今後はエキストラ バンドの判定基準などを統一し,情報共有化シ ステムの構築に向けてデータ集積を継続する 必要がある。

# 薬剤耐性菌サーベイランスの強化及びゲノ ム解析の促進に伴う迅速検査法開発に関す る研究(日本医療研究開発機構研究費)

(平成 27 年度~平成 29 年度)

#### 研究概要

全国的な薬剤耐性菌サーベイランス体制構 築のため、地方衛生研究所全国協議会耐性菌レ ファレンス事業と連携し、薬剤耐性菌の収集体 制の構築と薬剤耐性遺伝子の検査法の検討を 行った。平成 27 年度は、特に医療機関で問題 となっているカルバペネム耐性腸内細菌科細 菌(CRE)を対象に行った。

#### 結果

秋田県では CRE 疑いを含む 8 株を収集した。 研究班全体では合計 129 株と,当初目標であっ た 50 株の約 2 倍の菌株数を確保することがで きた。このことは,医療機関における CRE への 関心の高さを示唆していると考えられた。

検査法については、カルバペネマーゼとして 重要なメタロ $\beta$ ラクタマーゼの一つである IMP 型、VIM型、NDM型の PCR 法を検討し、IMP 型については、IMP 1型及び2型、VIM型につ いては VIM 2型の検出が可能であることを確認 した。また、その他のカルバペネマーゼとして は、KPC型、OXA48型の PCR 法を導入した。

# 食品中の食中毒菌等の遺伝特性及び制御に 関する研究(厚生労働科学研究費補助金)

(平成 25 年度~平成 27 年度)

#### 研究概要

各自治体が行う食中毒事例や食品等の食中 毒菌のサーベイランスに活用できるタイピン グ方法を検討するため、黄色ブドウ球菌につい て、これまで POT 法、MLVA 法、PFGE 法を用 いて遺伝子型別を実施した結果、POT 法が簡 便、有用と考えられた。このことから、今年度 は異なる機関における判定結果について検討 するため、地方衛生研究所 5 機関が、同じ黄色 ブドウ球菌を検体として POT 法による遺伝子 型別試験を実施した。

#### 結果

供試 10 株中 1 株における 2 つのバンドの判 定に不一致が認められたが,9 株については全 ての機関の判定結果が一致した。POT 法はサー ベイランス等の活用において非常に有用な遺 伝子型別法と考えられた。ただし,広域での重 要な事例等の場合は POT 法による型の数値情 報に加え,写真情報も含めた相互確認が必要と 考えられた。

カンピロバクターの型別方法の検討と分離 菌株の特徴(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~平成 27 年度)

カンピロバクターレファレンスセンター業 務(地方衛生研究所技術協議会)

(平成元年~)

#### 研究概要

平成 27 年は県内の散発下痢症患者由来の 7 株(C. jejuni 6 株, C. coli 1 株)及び食中毒等の 集団感染事例の由来 C. jejuni 11 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。

#### 結果

散発下痢症患者由来の *C. jejuni* 6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 2株(33.3%), Lior 法では 4株(66.7%) 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,集団感染 5 事例に由来する *C. jejuni* 11株のうち,4株は同 一の食中毒疑い事例であったが,3株は Penner 法で型別不能となり,関連性を評価できなかっ た。散発下痢症患者由来の *C. jejuni* 6株中3株

(50%)がキノロン系薬剤に耐性を示した。一 方,第一選択薬のエリスロマイシンへの耐性は 検出されなかった。

集団感染事例では,加熱不十分な食肉の喫食 が原因と考えられる事例が散見されており,カ ンピロバクターによる健康被害低減には消費 者への加熱調理の重要性を継続して啓発して いく必要があると考えられた。

Penner法による血清型別で単一の型に決定で きなかった8株について,PCR型別法により型 別した。その結果,集団感染事例において,患 者間で別々の型に感染していることが PCR 型 別により証明され,感染源調査などの事例対応 に活用された。

## 百日咳・ジフテリア・ボツリヌスレファレ ンスセンター業務(地方衛生研究所技術協 議会)

(平成 15 年度~)

薬剤耐性菌レファレンスセンター業務(地 方衛生研究所技術協議会)

(平成 27 年度~)

#### 研究概要

地方衛生研究所技術協議会のレファレンス センター業務として,百日咳,ジフテリア,ボ ツリヌス,及び平成 27 年度からは薬剤耐性菌 について検査法の検討,北海道・東北・新潟地 区内における検査の技術支援,研修等のレファ レンスセンター活動を行っている。

#### 結果

(百日咳)

平成 27 年は,他県の検体 2 件を含む 20 検体

について LAMP 法による病原体検出を行い,3 件で百日咳陽性となった。鑑別疾患の一つとし て調査しているマイコプラズマについては,検 出されなかった。

(ジフテリア)

誤 嚥 性 肺 炎 患 者 から Corynebacterium
 diphtheriae の分離があり、ジフテリア毒素の確
 認等の精査を行った。また、Corynebacterium 属
 菌の同定は通常の遺伝子検査では難しいこと
 から、rpoB 遺伝子の相同性解析による菌種同定
 法を検討した。

(ボツリヌス)

特記事項なし

(薬剤耐性菌)

カルバペネム系耐性腸内細菌科細菌の検査 法普及のため、国立感染症研究所等と共同で北 海道・東北・新潟地区の研究施設へ陽性コント ロールを配布した。

#### ウイルス班

サポウイルスに対してパンソルビン・トラ ップ法を用いる際の RNA 検出系の最適化 (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(ブ菌) 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 は大量のブ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、大量のブ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を課さ れることから,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。これまでに, ノロウイルス RNA の検出系に関しては、ブ菌 の影響を最小限にする反応条件が検討された が, 平成 27 年度はサポウイルスについて RNA 検出系の最適化を図った。

#### 結 果

LNA (Locked Nucleic Acid) 修飾塩基を導入 して Tm 値を向上させる手法を用いることで, 逆転写, 1st. PCR, 2nd. PCR, 及び real-time PCR の各反応系において SaV 遺伝子の検出効率を 最適化することができた。

秋田県における市販生カキからのノロウイ ルス・サポウイルスの検出および 2014/2015 シーズンのノロウイルス・サポウイルスの 検出状況(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

ノロウイルス等胃腸炎ウイルスが検出され る食中毒事例では、二枚貝が原因食品と推定さ れるケースがある。特に、冬場に旬を迎えるカ キの生食および加熱不十分なままでの喫食は、 食中毒を引き起こす要因となっていることも 多い。そこで、冬季における市販生カキのウイ ルス汚染状況を把握するため、生食用カキにつ いてノロウイルス (NoV)、サポウイルス (SaV) の検出を行った。

また,2014/2015 シーズンは秋田県において 二枚貝による食中毒が多発した。そこで、食中 毒事例を含め、本県のNoV,SaVの検出状況に ついても併せて検討した。

#### 結果

2015年1月に購入した市販生カキについてノ ロウイルス(NoV), サポウイルス(SaV)の 検出を行った。3 海域(広島県1海域,宮城県 2 海域)で生産されたカキ全てから NoV GII, NoV GI, SaV が検出された。NoV の遺伝子型と しては,全ての海域由来のカキから NoV GII.17, NoV GI.2 が確認された。SaV の遺伝子型として は,近年,秋田県で検出がなかった SaV GV.1 が検出された。

2014/2015 シーズンは秋田県において二枚貝 による食中毒事例が多発した。ウイルスによる 食中毒事例 9 事例は全て NoV の感染によるも ので,そのうち6事例はカキ等二枚貝が原因と 推定された事例であった。6 事例中4 事例は GII と GI の混合感染であった。この 4 事例からは 遺伝子型も複数認められ,4事例全てから GII.17 が検出された。感染症発生動向調査および集団 感染事例において検出された NoV の遺伝子型 は,GII.4 Sydney 2012 亜型が最も多く,GII.17 の検出は散発的であった。今回の結果から,秋 田県における市販生カキの NoV,SaV の汚染実 態が明らかとなり,食中毒の発生に影響を及ぼ していた可能性が示唆された。

厚生労働科学研究費補助金(新興・再興感 染症および予防接種政策推進研究事業「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~平成 27 年度)

#### 研究概要

国内のリケッチア症は、ベクターや、リケッ チアの種類によって発生時期や患者発生地域 など地域特性が強い疾患である。リケッチア症 の国内の広がりを考慮すると、いずれの地域で も同レベルで確実な検出技術を有することが 望ましい。本研究では、幅広いリケッチア症に 対応できる各種検査法の検証・現場導入を進め ると共に、リケッチア症の疫学、診断法等の情 報共有と更新、マニュアルの改訂準備と共に担 当者のスキルアップを積極的に行った。

#### 結果

全国共通となる検査法として Multiplex real time PCR, one-tube nested PCR の特異性と汎用 性の検討を行った。現在,国内で課題となって いる紅斑熱群リケッチアやつつが虫病に対し て,両法は臨床検体も含めて概ね良好であり, スクリーニング系として有効と考えられた。日 本紅斑熱特異的 real-time PCR についても同様 であった。

また, リケッチアレファレンスセンター会議 等を利用し, 研究協力者の衛研担当者間で検体 採取法から実験室診断における検査手技の確 認, 診断用抗原作成のための標準株の分与な ど,各施設の準備状況に合わせて体制構築を進 めた。さらに, ブロックセンターが各ブロック 内の衛研などに対しても抗原分与・技術供与な どを実施し, 全国の診断体制維持に向けて継続 的な取り組みを行った。

## 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-GI.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。 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(日本医療研究開発 機構研究費「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 27 年度~平成 29 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,流行性耳下腺炎 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,流行性耳下腺炎のたび重なる 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流行性耳下腺 炎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把握するためには、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未だ存在せず、その構築が 急務となっている。このため、本サーベイラン スの基礎となる病院や地方衛生研究所と国立 感染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 27 年度に当センターで検出されたムン プスウイルス1株について遺伝子解析を行った 結果, Gw型であった。研究班に所属する14ヶ 所地方衛生研究所全体で118株の解析を行った が全て Gw型であった。平成26年度はGw型の みが検出されていたが,平成27年度は茨城, 神奈川,三重,沖縄でGe型が検出された。

#### 理化学班

#### 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

1,4-ジオキサン分解能を有する活性汚泥について,分解能の向上に寄与するリン酸の濃度と 分解による減少速度増加の関係を評価した。

分解能試験は、リン酸濃度をそれぞれ0,0.2, 0.6,1,1.4,1.8 g/L とした汚泥試料500 ml(泥 濃度3000 mg/L)に1,4-ジオキサンを2 mg/L と なるように適宜添加し、好気条件下で撹拌、経 過日数毎の1,4-ジオキサン濃度から減少速度 を算出することで行った。

リン酸を添加しない系では、1日目の減少速度 1.1 mg/L/day であったものが 12日後にも 1.3 mg/L/day とほぼ同じ値を示しており、分解活性 を一定に維持する結果を示した。一方、リン酸 を添加した系での 12日後の減少速度は、リン酸 濃度が濃いほど減少速度が増加しており、リン 酸濃度 1.4 g/Lの系で最大値 4.2 mg/L/day を示し た。最も濃いリン酸濃度 1.8 g/Lの系で最大とな らなかったが、これは pH の低下による阻害と 見られ、およそ pH 4 以下で著しく活性が低下す るものと考えられた。

#### 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)

田沢湖における酸性化の負荷源である玉川 温泉水の対策のため,玉川酸性水中和処理施設 (以下、中和処理施設)が設置され,石灰石を 用いて恒常的な中和処理が行われている。しか し,平成14年頃から玉川温泉水に酸度上昇等の 水質変化が観測され,中和処理施設では投入す る石灰石の量を増やして放流水のpHを維持し たものの,一時期5.7まで改善していた田沢湖 のpHは5.2まで低下した。

当センターでは、田沢湖の水質改善のために は、玉川上流域での酸性水対策が必要であると 考えている。そこで本研究では、平成25年度か ら26年度にかけて玉川河川において中和材に酸 化カルシウムを用いて4時間連続投入を行う中 和実証試験を実施し、河川水質の変化を調査し た。

平成27年度は,前年度までの中和実証試験から,酸化カルシウムの投入地点数を2地点に増やし,中和処理水合流後の地点の目標 pH を 5.0 に変更して行った。調査地点は,玉川ダム流入前までの9地点とした。調査項目は,pH, PP 酸度, MO 酸度,鉄濃度,アルミニウム濃度,流量等とした。

#### 結果

設定した pH5.0 については,おおむね達成す ることができた。これは, pH5.0 付近が溶存す るアルミニウムが水酸化物イオンと結合し pH の 上昇を抑制する範囲にあったことが要因であ ると考えられた。

また,酸化カルシウムの投入地点付近では, 投入量の1時間値と減少した PP 酸度総量の酸 化カルシウム換算値とがほぼ同一の値を示し たことから,投入した酸化カルシウムのほぼ全 量が PP 酸度を減少させる働きをすることが明 らかとなった。

各地点に設定したpHの上昇幅は,投入地点から離れた地点ほど小さい値を示した。また,PP 酸度総量の結果でも、下流の地点ほど減少量が 小さくなったことから、何らかの理由で河川を 流下中に酸化カルシウムに含まれるアルカリ が消費されていることが考えられた。

2地点投入については, PP酸度総量の値を用 いて過去の実証試験結果と比較したが,その効 果は確認できなかった。

#### 研究概要

# Ⅲ 調查研究報告

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26~27年度)

## 秋田県で分離された結核菌の

## イソニアジド及びピラジナミド耐性関連遺伝子と遺伝系統の解析

#### 今野貴之 高橋志保 熊谷優子

秋田県における薬剤耐性結核菌の検出状況を把握するため、2012 年から 2015 年に県内の一医療機関 で分離された結核菌 162 株を対象にイソニアジド、ピラジナミドに対する耐性化の状況を調査した。 耐性と判定された菌株については、両薬剤の耐性化に関わる遺伝子の DNA シークエンス解析を行い、 その耐性化機構を調査した。その結果、イソニアジドにおいては、医療機関の感受性試験で耐性と判 定された 13 株の内 8 株で何らかの遺伝子変異が確認された。一方、ピラジナミドでは、3 株が耐性と 判定されたものの、遺伝子変異は確認されなかった。さらに、分離株の遺伝系統を調査したところ、 県内では北京祖先型 STK が多く、北京新興型が少ない傾向がみられ、本県における高齢者結核の多さ が一因と考えられた。また、イソニアジド耐性株の中には多剤耐性結核菌に多いとされる北京祖先型 ST11/26 が確認された。

#### 1. はじめに

結核は未だ国内最大の感染症であり, 患者 数は全国で年間約2万人,死亡者は2千人に 及ぶ。現在は, 数種類の薬剤を服用すること で完治するようになったが, 服薬期間は標準 治療で6ヵ月もしくは9ヵ月必要である。治 療の途中で服薬をやめてしまったり、不適切 な薬剤を用いたりすると薬剤耐性となり、治 療困難になる場合がある。結核菌に有効な抗 菌薬は限られており,薬剤耐性結核菌の蔓延 防止は,本感染症の対策上非常に重要となっ ている。特に、イソニアジドは結核の治療や 予防の第一選択薬であり、治療の柱となる薬 剤の一つとなっている。また、ピラジナミド も重要な第一選択薬の一つであり、ピラジナ ミドの服薬が可能な場合は、治療期間を 6 ヵ 月にすることが可能である。

本研究では,秋田県における結核患者の治 療・入院の中核施設である市立秋田総合病院 の協力のもと,県内におけるイソニアジド及 びビラジナミド耐性結核菌の分離状況やその 耐性機構を解明するため,両薬剤の耐性に関 わる遺伝子変異の検出状況を調査した。さら に,分子疫学的な解析により秋田県における 結核菌の遺伝系統を解明した。

#### 2. 方法

#### 2.1 供試菌株

市立秋田総合病院から 2012 年から 2015 年ま でに受領した結核菌 162 株を対象に調査した。

#### 2.2 薬剤耐性関連遺伝子の解析

医療機関による薬剤感受性試験でイソニアジ ド耐性と判定された結核菌について, *katG*, *fabG1/inhA*, *ahpC*, *furA* の DNA シークエンス 解析を行い<sup>1-3)</sup>,遺伝子変異の有無を調査した。 また,ピラジナミドについては医療機関による 薬剤感受性試験で耐性と判定された3株を含む 計75株について *pncA* の DNA シークエンス解 析を行い<sup>1)</sup>,遺伝子変異の有無を調査した。

#### 2.3 JATA12-VNTR による遺伝系統の解析

結核菌のゲノム中の反復配列(VNTR)12カ 所を PCR 法により増幅し,増幅断片の大きさか ら反復数を計測した。得られた12カ所の反復数 のプロファイルから, Seto, et al.<sup>4)</sup>の方法に従い 遺伝系統を推定した。

#### 結果と考察

#### 3.1 薬剤耐性遺伝子変異の検出状況

供試した結核菌 162 株の内, 医療機関におけ る感受性試験によりイソニアジド耐性と判定さ

表 イソニアジド耐性遺伝子変異の保有状況

No.	受領日	年齢	性別	治療歴	katG	fabG1/inhA	ahpC	furA
 1	2012/6/21	54	М	無	S315T	_	-	ND
2	2012/6/21	65	F	無	(L148V)	-8 T→A	-	ND
3	2012/7/2	82	М	有	_	(E59K)	-48 G→A	ND
4	2012/7/17	85	М	有	_	_	-	_
5	2013/2/19	65	М	有	L141S	_	_	_
6	2013/6/4	85	М	無	S315T	-	-	ND
7	2013/7/13	74	М	無	_	-15 C→T	_	ND
8	2012/7/26	80	F	有	_	NG	-	A14V
9	2012/8/6	68	F	有	_	_	_	_
10	2013/9/20	85	F	有	S315T	_	-	ND
11	2013/9/20	51	М	無	_	-	-	_
12	2013/10/30	84	М	無	_	_	_	_
13	2014/9/26	91	М	有	_	_	_	_

ND: 検査実施せず, NG: 検査不可, (): 耐性への関与不明な変異.

れたのは 13 株であった。また,過去に結核治療 歴があった人から分離された結核菌は 162 株の うち 22 株であった。イソニアジド耐性 13 株の うちの 7 株が治療歴のある人から分離された菌 株であり,治療歴の有無がイソニアジド耐性化 のリスクファクターとなっていた。

イソニアジド耐性株 13 株の katG, fabG1/inhA, ahpC, furA の変異保有状況を表に示す。13 株の うち,いずれかの遺伝子に何らかの変異が検出 されたのは 8 株で,耐性機構の解明率は 62%で あった。治療歴があった場合は,変異が検出さ れた結核菌の割合も 18%と高率であった。

最も頻繁に変異が検出された遺伝子は, katG であった。イソニアジドはプロドラッグであり, 結核菌の KatG (カタラーゼ-ペルオキシダーゼ) の作用により活性化され効力を発揮する。その ため、katG に変異が生じ、その酵素活性が低下 した結核菌ではイソニアジドが活性化されず耐 性となる<sup>5)</sup>。fabG1/inhA においては,2 株で遺 伝子上流の転写活性に関わる領域に変異が検出 され、その内の1株では katG にも変異が検出さ れた。ただし、この変異箇所は酵素の活性部位 や活性を発揮するために必要な補助因子の結合 部位とは近接していないことから、耐性への関 与は不明である<sup>6)</sup>。FabG1/InhAは,結核菌の細 胞壁を構成するミコール酸の合成に関与し、イ ソニアジドの標的となっている。転写調節領域 への変異により発現量が増加したために、イソ ニアジド耐性となったと考えられる<sup>5)</sup>。ahpCに おいても、1株で遺伝子上流に変異が検出され た。*ahpC*のコードする酵素は,KatGによるイ ソニアジドの活性化に抑制的に働くため, 変異 によりその抑制効果が高まったと考えられる 5)。 *furA* においては,1 株で変異が検出された。FurA は KatG の転写因子であり, *furA* の変異は *katG* の発現に影響する可能性がある。

ピラジナミドに関しては,抗菌活性が pH5.5 付近にあり,通常の感受性試験では検査が困難 なことが知られている。本研究においても,耐 性株3株を含む75株を検査したが, pncAの変 異は検出されなかった。このことから,県内で は実際に pncA に遺伝子変異を有するようなピ ラジナミド耐性結核菌は非常に稀と考えられた。

#### 3.2 秋田県における結核菌の遺伝系統の特徴

結核菌は進化と伝播の歴史の中で,地理的分 布と相関した遺伝系統を持っていることが報告 されている<sup>7,8)</sup>。遺伝系統はインド・オセアニ ア,東アジア,東アフリカ・インド,ユーロ・ アメリカ,西アフリカI,西アフリカIIの6つ の系統に大別される。国内で多い東アジア系統 は北京型とも呼ばれ,北京型はさらに祖先型と 新興型の遺伝子型に分けることができる。本研 究では,Seto, et al.<sup>4)</sup>の方法に従い VNTR による 分子疫学的解析から遺伝系統を推定した(図)。

結核菌の遺伝系統の内,北京型の結核菌はこ れまでの約 1,000 年の間で東アジア等における 人口増加に伴って変異してきた系統で,一部の 系統は薬剤耐性や感染力が強いなどの特徴を持 っている。県内で特に分離頻度の高かった北京 祖先型 STK は, Iwamoto, et al.<sup>9)</sup>の研究で若年層 には少ない系統であることが示唆されている。 一方,感染力が強く若年層を中心に感染が拡が っているとされる北京新興型の秋田県での割合 は,全国に比べるとやや低い傾向にあった。こ れらの結果は,本県における高齢者の結核の多



さを反映しているものと考えられた。また、多 剤耐性結核菌に多い系統とされる ST11/26 は分 離数こそ少ないが、イソニアジド耐性結核菌が 確認された。

薬剤耐性や感染力が強いなどの特徴的な遺伝 系統の結核菌が今後増加するかどうかについて は注視していく必要があり,遺伝系統の解析は 今後の結核菌サーベイランスに有用な情報を提 供するものと考えられた。

#### 謝辞

本研究に多大な御協力を頂いた市立秋田総合 病院呼吸器内科の本間光信先生,臨床検査科の 金田深樹先生に深謝いたします。

#### 参考文献

- Sekiguchi J., Miyoshi-Akiyama T., Augustynowicz-Kopeć E, Zwolska Z., Kirikae F., Toyota E., Kobayashi I., Morita K., Kudo K., Kato S., Kuratsuji T., Mori T., Kirikae T.: Detection of Multidrug Resistance in *Mycobacterium* tuberculosis, J Clin Microbiol, 45, 2007, 179-192.
- Fang Z., Doig C., Rayner A., Kenna D.T., Watt B., Forbes K.J. : Molecular Evidence for Heterogeneity of the Multiple Drug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Population in Scotland (1990 to 1997), *J Clin Microbiol*, **37**, 1999, 998-1003.
- Ramaswamy S.V., Reich R., Dou SJ., Jasperse L., Pan X., Wanger A., Quitugua T., Graviss E.A.:Single nucleotide polymorphisms in genes associated with

isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*, *Antimicrob Agents Chemother*, **47**, 2003 1241-1250.

- 4) Seto J., Wada T., Iwamoto T., Tamaru A., Maeda S., Yamamoto K., Hase A., Murakami K., Maeda E., Oishi A., Migita Y., Yamamoto T., Ahiko T.: Phylogenetic assignment of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing clinical isolates in Japan by maximum a posteriori estimation, *Infect Genet Evol*, 35, 2015, 82-88.
- 5) 谷口初美: 多剤耐性結核菌-その耐性機構を 中心に-, 産業医科大学雑誌, 22, 2000, 269-282.
- 6) Cardoso R.F., Cooksey R.C., Morlock G.P., Barco P., Cecon L., Forestiero F., Leite C.Q., Sato D.N., Shikama M.de L., Mamizuka E.M., Hirata R.D., Hirata M.H.: Screening and characterization of mutations in isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates obtained in Brazil, Antimicrob Agents Chemother, **48**, 2004, 3373-3381.
- 岩井和郎,前田伸司,村瀬良朗:結核菌と結 核症の考古学-その発生から世界流行まで 一,結核,85,2010,465-475.
- 8) 岩本朋忠:世界的感染拡大傾向が危惧される 結核菌北京型株,複十字,9,2009,20-21.
- 9) Iwamoto T., Fujiyama R., Yoshida S., Wada T., Shirai C., Kawakami Y.: Population structure dynamics of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing strains during past decades in Japan, *J Clin Microbiol*, 47, 2009, 3340-3343.

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 25~27 年度)

## カンピロバクターPenner PCR 型別法の確立と有用性の検証

#### 今野貴之 高橋志保 熊谷優子

カンピロバクターの血清型別法は、一般に Penner 法と呼ばれる受身血球凝集反応法により行われて いるが、型別率の低さが問題となっている。本研究では、Penner 法が対象にしている抗原遺伝子の特 異性をもとにした PCR 型別法を確立した。また、従来法で型別不能もしくは複数血清型に型別された 21 株のうち 19 株を PCR 型別法により型別した。さらに、食中毒を疑う集団感染事例においても型別 不能となった菌株の型別に活用し、行政対応上の有用性を示した。

#### 1. はじめに

カンピロバクターによる食中毒の事件数は、 細菌性食中毒の中で最も多く、ノロウイルスと 並んで頻度の高い食中毒の病因物質となってい る。カンピロバクターに起因する健康被害の防 止対策には、汚染源の把握やサーベイランスに よる集団感染事例の早期探知、菌の病原性解析 などの細菌学的な研究など様々な取り組みが必 要であり、血清型別による疫学的な解析がこれ に役立っている。また、食中毒発生時において も、患者等から分離された菌株間の関連性を解 明する上で、血清型別は有効な手段となってい る。

カンピロバクターの血清型別法は,一般に Penner法と呼ばれる受身血球凝集反応法により 行われているが,型別率の低さが問題となって いる<sup>1)</sup>。本研究では Penner 法の型別率の低さを 補うため, Penner 法が対象としている抗原につ いて遺伝子の特異性をもとに分類可能な PCR 型別法を検討した。さらに,その有用性につい て検証するため,従来法で型別不能もしくは複 数血清型に型別された菌株を用いて型別可能か 検討した。また,実際の食中毒疑い事例の解析 に活用し,菌株間の関連性について検討した。

### 2. 方法

#### 2.1 Penner 法による血清型別試験

カンピロバクターの菌種の確認は, PCR 法に より行った<sup>2,3)</sup>。Penner 法の血清型別試験は, 市 販のキット(デンカ生研)を用い, 受身血球凝 集反応法により25 種類の血清群に分類した(表 1)。

#### 2.2 Penner PCR 型別法による抗原遺伝子の解析

Penner PCR 型別法は, Poly et al.<sup>4)</sup>の方法をも とに一部改変して行った。

#### 結果と考察

#### 3.1 Penner PCR 法の確立

Poly らは、カンピロバクターの C. jejuni につ いて,その主要な抗原遺伝子を14対のプライマ ーを用いた 2 つの Multiplex PCR により分類す る方法を提唱した<sup>4)</sup>。この方法では, Penner 法 の対象とする抗原遺伝子を HS1, HS2, HS3, HS4-complex, HS6, HS8/HS17, HS10, HS15/HS31, HS23/36, HS41, HS42, 及びHS53 に型別可能である。しかしながら、PCR に使用 する Polymerase として Ex-taq HS (Takara), Multiplex PCR assay kit (Takara)を用いたとこ ろ, HS4-complex と HS41 に対する PCR の効率 が著しく低下した。そこで、PCRの反応系を2 つから4つに分割した。この際、国内の Penner 法で対象としていない HS42 について除外し た。また, HS2 の PCR 増幅断片が 62 bp と小さ く,検出感度が低かったことからプライマーの 末端に20塩基ずつアデニンを付加し,増幅断片 を 102 bp になるように変更した(図 1)。

国内の Penner 法の検査キットでは, その抗原 を A 群から Z7 群まで一部抗原性の類似した型 をまとめた血清群として検出している。そこで, 対象としている抗原とそれに類似する抗原に対 する PCR の特異性をカンピロバクターレファ レンスセンター保有の標準株を用いて確認し た。その結果, PCR 型別法で対象にしている抗
				H 0 1 0 1000	
血清群	抗原因子(HS)	血清群	抗原因子(HS)	血清群	抗原因子(HS)
A群	1, 44	K群	12	Y群	37
B群	2	L群	15	Z群	38
C群	3	N群	18	Z2群	41
D群	4, 13, 16, 43, 50	O群	19	Z4群	45
E群	5	P群	21	Z5群	52
F群	6, 7	R群	23, 36, 53	Z6群	55
G群	8	S群	27	Z7群	57
I群	10	U群	31		
J群	11	V群	32		

表1 Penner 法で型別可能な血清群の種類と含まれる抗原因子

□: PCR 型別法で検出可能だった抗原因子



図 1 Penner PCR 型別法

Lanes, m: 50 bp DNA size ladder, 1: 上から HS10,HS3,HS2, 2: HS1,HS8/HS17, HS23/36, 3: HS15/HS31,HS53,HS6, HS44, 4: HS4B, HS4A, HS41, M: 100bp DNA size ladder.

原因子を含む血清群のうち,D群ではHS50, R 群ではHS53でPCRの増幅ができなかった。 ただし,HS53については分離株を用いた解析 で検出可能であることが確認されている。標準 株のHS53が検出できなかった理由としては, レファレンスセンター保有の標準株と Poly et al<sup>4)</sup>が使用している標準株が異なっており,抗原 遺伝子に違いがある可能性が考えられた。実際, 分離株で検出された PCRの増幅断片をシーク エンス解析したところ,Poly et al<sup>4)</sup>の標準株と一 致した。また,PCR型別法ではHS4-complex を HS4AとHS4Bの2つのPCRで検出しているが, HS4,HS13,HS43はHS4Aでのみ検出され, HS16 は両方の PCR で検出可能であった。

また, PCR 型別法では A 群の HS1 と HS44 や R 群の HS23/36 と HS53 はそれぞれの抗原因子 として検出可能であり, 従来の Penner 法と同等 以上の特異度で主要な抗原因子を検出可能であ ることが示された(表 1)。

#### 3.2 Penner PCR 法の有用性の検証

平成 26 年に県内の医療機関から収集した散 発下痢症患者由来 47 株と食肉から分離した 13 株について血清型別試験を行ったところ, 21 株 が型別不能もしくは複数血清型に反応し,型別 できなかった。そこで,これらの菌株について PCR 型別法を行ったところ,19 株で型別が可能 であった(表 2)。PCR 型別法により型別され た 19 株の内 8 株は HS8/HS17 であり特定の型の 集積がみられた。この中には,鶏肉由来株もあ り,汚染食品の流通の可能性が示唆された。

平成26年11月に発生した焼鳥店が原因施設 と推定される食中毒疑い事例では,患者2名か ら分離された菌株のうち1株はG群に型別され たが,もう1株が型別不能となっていた。PCR 型別法では,両株ともにHS8/HS17に型別され, 菌株間の関連性を示すことができた。また,平 成27年4月に発生した焼肉店が原因施設と推定 された食中毒疑い事例では,PCR型別法により 患者4名から分離された菌株がいずれも異なる 型であることを明らかにした<sup>5)</sup>。カンピロバク ターは食品中ではほとんど増殖できず,食品の 汚染状況によっては同じ事例内で複数の血清型 が確認されることもある。この事例においても 単一食品の複数血清型の汚染を必ずしも否定す ることはできないが,カンピロバクター食中毒 においても共通の原因食品がある場合には,同 一の血清型が分離される傾向にあることから, この事例においては施設による食品の衛生管理 の不備による特定の汚染食品からの感染よりも 複数の汚染食品の関与が想定された。

カンピロバクターの Penner PCR 型別法によ り、これまで問題となっていた Penner 法の型別 率の低さを補うことが可能となり、より正確に 菌株間の関連性を推定することができるように なった。これにより、集団感染の早期探知や食 中毒等の事例対応時の原因究明に寄与すること が期待でき、PCR型別法の有用性が示唆された。

No.	由来	血清型別試験	Penner PCR型別法
1	ヒト	B/S	HS2
2	ヒト	B/L/S	HS2
3	ヒト	—	HS2
4	ヒト	—	HS2
5	鶏肉	L/S	HS8/HS17
6	鶏肉	L/S	HS8/HS17
7	鶏肉	L/S	HS53
8	鶏肉	L/S	HS2
9	鶏肉	P/S	—
10	ヒト	G/S	HS8/HS17
11	ヒト	—	—
12	ヒト	—	HS8/HS17
13	ヒト	—	HS1
14	ヒト	—	HS8/HS17
15	ヒト	—	HS8/HS17
16	ヒト	—	HS8/HS17
17	ヒト	—	HS2
18	ヒト	L/S	HS2
19	ヒト	L/S	HS53
20	ヒト	G/S	HS8/HS17
21	ヒト	—	HS1

表 2 Penner 法と PCR 型別法の比較

# 参考文献

- 甲斐明美:カンピロバクターの型別方法の検討と分離菌株の特徴,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年度総括・分担研究報告書,2014,33-38.
- Winters D.K., Slavik M.F.: Evaluation of a PCR based assay for specific detection of *Campylobacter jejuni* in chicken washes, *Mol Cell Probes*, 9, 1995, 307–310.
- 3) Linton D., Lawson A.J., Owen R.J., Stanley J.:

PCR detection, identification to species level, and fingerprinting of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* direct from diarrheic samples, *J Clin Microbial*, **35**, 1997, 2568–2572.

- Poly F., Serichatalergs O., Schulman M., Ju J., Cates C.N., Kanipes M., Mason C., Guerry P.: Discrimination of major capsular types of *Campylobacter jejuni* by multiplex PCR, *J Clin Microbial*, 49, 2011, 1750–1757.
- 5) 今野貴之, 髙橋志保, 樫尾拓子, 熊谷優子, 圓子隆信, 袴田知之, 金和浩: カンピロバク ターの Penner PCR 型別が有用であった食中 毒疑い事例への対応, Infectious Agents Surveillance Report, 36, 2015, 161–162.

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

# 雄物川流域におけるアカツツガムシ生息調査(2011 年~2014 年)

佐藤寛子 柴田ちひろ 秋野和華子 斎藤博之 安部真理子<sup>\*1</sup> 齊藤志保子 門馬直太<sup>\*2</sup> 東海林彰<sup>\*3</sup> 高橋守<sup>\*4</sup> 藤田博己<sup>\*5</sup> 角坂照貴<sup>\*6</sup> 高田伸弘<sup>\*7</sup> 川端寛樹<sup>\*8</sup> 安藤秀二<sup>\*8</sup>

2008 年 8 月,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、続いて 2010 年にも同型患者が確認された。このことを受け、我々は 2011 年~2014 年、この疾患 の過去の流行地であった湯沢市横堀地区~大仙市刈和野地区までの雄物川上流~中流およびその支流 の河川敷 74 地区におけるアカツツガムシ生息域の調査を黒布法で実施した。アカツツガムシの生息域 は湯沢市上関~大仙市北楢岡までと本調査対象地域内における 1964 年の調査報告よりも約 10 km 狭 まったが、支流との合流部や過去の患者発生地など 3 市 1 町の 40 地区と広い地域に渡った。この中に は以前は患者発生がなかったが、河川改修後アカツツガムシが定着し、一時的に患者が多発した地区 もあった。また、アカツツガムシの生息域は、広い河川敷の中でも川岸から極めて近い砂地や中州な ど、日常的な河川増水により水没しやすい地点に限定されていることを確認した。アカツツガムシ媒 介性のつつが虫病の再興は未だ周知に至っていない。今後も地域住民および県内外へ向けての情報提 供および注意喚起の継続が重要と思われる。

## 1. 緒言

つつが虫病はダニの一種であるツツガムシの 幼虫が媒介する,病原体 Orientia tsutsugamushi 感染によって起こる疾患で、急速に重症化し播 種性血管内凝固症候群、脳髄膜炎等の併発によ り死に至る場合があるため、早期診断、早期適 正治療の開始が極めて重要である。近年,日本 国内におけるつつが虫病患者の発生報告は年間 400 例以上であるが、その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<sup>1)</sup>。そのため,各地域にどのようなツツ ガムシ種が生息しているかを把握することが早 期診断のポイントとなる。現在, 我が国におい てつつが虫病は全ての都道府県で発生報告が あるが、主な媒介種はフトゲツツガムシ *Leptotrombidium pallidum* (秋~初冬,春), タテ ツツガムシ Leptotrombidium intermedium (秋~ 初冬)などとされている。これに対してアカツ ツガムシ Leptotrombidium akamushi 媒介性のつ

つが虫病は、新潟・山形・秋田の3県の特定河 川敷において夏季に発生する風土病として古く から知られた疾患であった<sup>2)</sup>。秋田県における 記録によると,江戸後期に活躍した菅江真澄が, 著書「雪の出羽路」に「阿隈川(角間川)をさ かのぼれば笹巻といふところあり。(中略)その わたりは沙蝨(ケダニ)ありて人をさせは死ぬ もの多し。(中略)雄勝,平鹿,仙北にもあるよ し、こと国にもあるにや。信濃川の流れの末に もありて、越後の国にては嶋虫と云ひまた恙ノ 虫ともいへり。」と記録している。この「ケダニ」 あるいは「恙の虫」(アカツツガムシの幼虫)に よる患者数が各県で年間100人を超える年もあ り,平均死亡率は20~30%と記録されている<sup>3)</sup>。 その後,この患者統計のうち,秋田県の患者に ついて検証した研究では,1920年~1948年にお けるつつが虫病患者数には非常に短期間で全治 した例が多く含まれていたことが指摘されてい る<sup>4)</sup>。発病から9日以下の全治例を除外した平

<sup>\*1</sup>元秋田県健康環境センター <sup>\*2</sup>福島県衛生研究所 <sup>\*3</sup>青森県環境保健センター <sup>\*4</sup>埼玉医科大学 <sup>\*5</sup>馬原アカリ医学研究所 <sup>\*6</sup>愛知医科大学 <sup>\*7</sup>福井大学 <sup>\*8</sup>国立感染症研究所 均死亡率は、原統計の 20.8%から 30.2%に上昇 し、とりわけ 1926年、1942年および 1946年は それぞれ 80.0%, 75.0%および 100%と高い死 亡率であったことが判明した。抗生物質の開発 以降,アカツツガムシに起因する患者数は各県 共に激減し,秋田県においても 1993 年を最後に 患者は途絶えていたため,アカツツガムシは消 滅したものと考えられていた<sup>5)</sup>。しかし,2008 年,大仙市角間川において15年ぶりに血清抗体 価が Kato 型に対して有意に高いつつが虫病患 者が発生した <sup>6)</sup>。患者は、感染が推定される時 期に当該地域で釣りをしており、長時間にわた り同じ場所に座っていたことでツツガムシに刺 されやすかったと推定された。これに続き 2010 年には2008年の患者感染推定地点から約20km 上流の河川敷で, 釣りをした後に発病した例が 確認された。これらを受けて我々は、夏季のつ つが虫病の媒介者となるアカツツガムシについ て,現在の生息域調査を実施すると共に,感染 リスク分析と啓発活動への反映ならびに生息域 形成過程の史学的検証を通して考察した。

なお,調査期間中の2014年には2008年の患 者感染推定地と同地点において釣りをした後に 発病した患者が新たに1名確認された。

# 2. 方法

## 2.1 調査時期

以下の日程で,晴れまたは曇りの日に実施し, 一部を除き各地区での調査は4年間を通して1 回とした。

2011年:7月28日~29日,8月4日~5日, 8月9日~11日,9月1日~2日

2012年:7月30日,8月2日~3日, 8月9日~11日,8月23日~24日

2013年:7月30日,8月8日~9日

2014年:7月28日~29日,8月4日

# 2.2 調査対象範囲および地区

調査対象とした地区は、患者が多発していた

年代に行われたアカツツガムシ生息地区に関す る調査記録である秋田県衛生科学研究所所報 (第9号, 1964年)の渡辺, 児玉による「羔虫 棲息地区」(図1)を参考に、荒れ地のため立ち 入り出来なかった仙北郡強首村(現;大仙市強 首)を除く,近隣地区の河川敷において行った。 調査地区は、雄物川本流河川敷においては、上 流部は湯沢市小野地区から中流部の大仙市刈和 野地区に至る 50 地区 (No.1~50,表 1-1), 雄物 川支流の河川敷 (玉川, 丸子川, 横手川, 出川, 西馬音内川,皆瀬川,成瀬川および役内川)お よび堰においては、24地区(No.51~74、表 1-2) とした(計74地区)。各地区の環境はそれぞれ 異なるが、おおよそ河川水際~法面までの低水 路内で行い、本流 50 地区のうち、3 地区につい ては高水敷内も行った。今後,河川敷の状態が 現状と大きく変化した場合でも同位置で追跡調 査ができるよう,各調査地区において GPS(世 界測地系 WGS84) により座標を記録した。なお, No.14 は 2008 年および 2014 年の患者感染推定 地である。

## 2.3 調査方法

ツツガムシ幼虫の地表面からの採集を,黒布 を用いた見取り法<sup>7)8)</sup>の変法<sup>9)</sup>によって行い、 調査時点でのアカツツガムシ生息の有無を確認 した(図2)。調査地区内では左右の幅25m~ 100m内に2名~5名の調査者が分散して行い, 各々20回程度黒布見取り法を実施した。「採集 したツツガムシ数÷(黒布を地表へ押しつけた 回数×調査員数) | が 0.1 未満であった地区は (+), 0.1 以上 0.5 未満の地区は (++), 0.5 以上の地区は(+++)とし、ツツガムシが採 集されなかった地区は(-)と分類した。例え ば、5人の調査員がそれぞれ20回黒布を地表へ 押しつけた場合,採取ツツガムシ数が10匹未満 は(+),11匹以上50匹未満は(++),50匹 以上は(+++)と表現することになる。採集 したツツガムシは、70%アルコールに保存し、

後日アカツツガムシであることの確認を病原ダ ニ図譜<sup>10)</sup>および日本ダニ類図鑑<sup>11)</sup>を参考とし, 鏡検によって行った。また,一部においては調 査域を広げて水際~法面~高水敷までを1.5~2 m間隔で調査し,地区内のアカツツガムシ分布 状況,採集頻度を確認した。本調査はアカツツ ガムシの現存確認を目的としたため,病原体保 有の有無については検討しなかった。



図2:黒布見取り法

# 3. 結果

# 3.1 雄物川本流のアカツツガムシ生息調査結果

調査対象 50 地区の調査で、アカツツガムシが 採集されたのは、35地区であった(表 1-1)。1964 年時点での本調査地区内における「恙虫棲息地 区」の最下流部は、大仙市北野目(旧仙北郡刈 和野町, No.2) であったが, 今回, アカツツガ ムシが採集された最下流部は大仙市北野目 (No.2) から約 7.5 km 上流の大仙市北楢岡の船 着き場(No.4)であった。ここから湯沢市中野 々目(No.37)までは湯沢市柳田(No.33),湯沢 市清水(No.35)の2地区を除き、ほぼ継続して アカツツガムシが採集された。1964年当時「恙 虫棲息地区」とされていなかった大仙市北楢岡 (No.4) ~大仙市大曲小貫高畠(No.10) でも多 くのアカツツガムシが採集された。湯沢市万石 (No.38)より上流は、湯沢市泉沢(旧雄勝郡小 野村と須川村の村境, No.49 と No.50 の間付近) までが「恙虫棲息地区」とされていたが、アカ ツツガムシが採集されたのは, 湯沢市山田 (No.45), 酒巻 (No.47) および上関 (No.48)

の3地区のみで、本調査におけるアカツツガム シ採集最上流部は1964 年当時よりも約2.5 km 下流の湯沢市上関(No.48)であった。

## 3.2 雄物川支流のアカツツガムシ生息調査結果

支流の調査対象 24 地区のうち, アカツツガム シが採集されたのは玉川流域の大仙市花館 (No.51), 横手川流域の大仙市藤木(No.63, 64), 皆瀬川流域の湯沢市岩崎(No.71, 72)の5 地区 であった(表 1-2)。このうち No.51 と No.64 は 過去の「恙虫棲息地区」では記録がなかったが, No.63, No.71 および No.72 は「恙虫棲息地区」 付近であった。

# 3.3水際~法面~高水敷のアカツツガムシ分布 調査

アカツツガムシが採集された地区のうち、採 集数が多く、(+++)と分類されたのは、雄物 川本流の大仙市北楢岡の船着き場 (No.4), 河川 緑地公園(No.7)と大曲西根(No.8, 9), 横手 市大雄の中州(No.17),横手市雄物川町沼館 (No.20), 湯沢市柳田 (No.32) と清水 (No.34) であった。またこれら8地区のうち No.7, No.20 に加えて、「ケダニ」が地名となった横手市十文 字睦合の砂虱(ケダニ)川原(No.30)の3地区 において,水際~法面~高水敷のアカツツガム シ分布状況の調査を行った。No.7は、低水路内 の水際砂地~法面ではアカツツガムシが多数確 認されたが、公園として利用されている高水敷 内の草地では確認されなかった(表 1-3,図 3)。 同様に No.20, No.30 においても低水路内では アカツツガムシが多く採取されたが、その採集 数は川から離れるに従って減少し、法面より上 では全く採集されなかった(表 1-3、図 4)。3地 区においてアカツツガムシが確認された地表面 は, 平常時は砂地あるいは草地であるが, 降水 量によっては年に数回,水没する位置であった (図5)。



図4: 雄物川町大沢~深井地区(No. 20 付近)の河川敷断面 \*図3,4 は国土交通省「川の防災情報」テレメータ水位の絵図を参照



図 5: (上) アカツツガムシが多く採 集できる水際の砂地, (下)河川敷 内におけるアカツツガムシの生息域

# 4. 考察

新潟県で水害後に患者数が増えることから, 日本洪水熱とも言われたアカツツガムシ媒介性 の古典型つつが虫病は,古くから河川や土壌と の密接な関係が知られており,土壌改良や堤防 工事の効果は早くから指摘されていた<sup>12),13)</sup>。秋 田県雄物川水系における治水工事は江戸時代か ら始まり、大仙市大曲以南では1615年に現在の 横手市雄物川町沼館付近(No.20周辺)で行わ れたものが最も古い<sup>14)</sup>。当時の工事目的は、洪 水防止の他に交通と商業の重要なルートであっ た雄物川の舟運の便を図る低水路作成,および 用水の確保であった。この後,現在までの約400 年の間に大規模な河川改修や築堤工事が幾多に も行われ、住民の住環境が整備されてきた。加 えて, 近年アカツツガムシの生態も解明された ことにより予防対策も進み,最近の患者発生は, 調査期間中の2014年に発生した1名を含め, 2008年以降,数年おきに1名ずつ計3名となっ ている。そのため、本調査の開始当初、アカツ ツガムシが採集できる地区は、これら3名の感 染推定地など一部に留まることが予想されたが, 調査の結果,1964年時点での「恙虫棲息地区」 の範囲内の74ヵ所中40カ所,3市1町に渡る 広い地域で生息が確認された。しかし, 上流部 の湯沢市では「恙虫棲息地区」とされていたが, 本調査ではアカツツガムシが採集されなかった。 中流部の大仙市では「恙虫棲息地区」とされて いなかったが,本調査ではアカツツガムシが採

集された地区があり,過去の状況と一致しない 地区が複数認められた。1964年時点では「恙虫 棲息地区」でありながら,今回の調査ではアカ ツツガムシが採集されなかった雄物川上流部の 湯沢市万石(No.38)以南の地区については, 調査回数が限られていたことが要因の一つと思 われるが,他にも次の2つの理由が考えられる。

第一は,過去に患者として報告されていた者 が真の患者であったかどうかが定かではない地 域があることである。1964年の「恙虫棲息地区」 は本調査のように実際にアカツツガムシの分布 を調べたものではなく、患者発生があったとい う記録がある地区を示したものである。須藤は、 当時の患者記録は県の公式な統計でありなが ら, 罹病から治癒までの日数が4日以内という 非常に早期に回復した症例なども多く含まれて いたことを指摘し、当時は確実な検査診断法が なかったため,真の患者ではない者が多く含ま れ、統計上の患者数が底上げされていたと報告 している4)。夏季に雄物川周辺でアカツツガム シに刺咬されたような痛みを感じたり、発熱が あったりした住民がいたことは確かと思われる が,回復までの日数が極めて早い疑似患者と思 われる者が雄勝郡(現;湯沢市および羽後町) に多かったことが示されていることから、それ が確実にアカツツガムシによるものであったの かは定かではない。

第二は,河川環境の変化である。過去におい ては確かにアカツツガムシが生息し患者発生が あったものの,年月が経過する中で堰の改築, 河道掘削等の度重なる河川改修に伴い、アカツ ツガムシの生息に適さない環境に変化したこと が推察される。本調査の対象地区外であるが、 雄物川上流部の大久保頭首工付近(No.29と No.30 の間)の河川環境の変化に関する調査報 告では, 1948年~2001年までの河川環境の変化 として, 雄物川の河床低下と低水路幅の縮小を 認めている<sup>15)</sup>。さらに砂州植生の樹林化,瀬や 淵,砂州面積の著しい減少,魚類の生息数減少 や樹種や植物種の変化など多くの事柄が指摘さ れている。こうしたことから,過去の患者発生 と現在のアカツツガムシ生息状況に不一致が認 められた地区にも同様の変化があり, アカツツ ガムシの生息に適さない環境になった可能性が ある。

また、ツツガムシの幼虫は、その後の成長過 程において1度だけ脊椎動物の組織液を取り入 れなくてはならず、その対象は地表を這う野ネ ズミが主である。毎夏つつが虫病患者が多数確 認されていた年代にNo.7~11付近の雄物川左岸 で実施された野ネズミ捕獲によるツツガムシ生 息調査では、捕獲した野ネズミのうち90数%が ハタネズミであったが<sup>16)~18)</sup>(寺邑, 1954; 吉 村, 1988;吉村, 1990), 15年の空白の後に再 び患者発生があった 2008 年以降の 2009 年~ 2010年に我々が実施した調査では、No.7の他、 支流においてもハタネズミの割合が 30数% に低下していた<sup>19), 20)</sup>。こうしたハタネズミ生息 数の減少傾向は全国的であり, 準絶滅危惧種と して指定する自治体も少なくない。また、1956 年4月からの1年間に新潟県長岡市で実施した ネズミ寄生ツツガムシの採集結果をみると, L. akamushi はアカネズミ 11 匹に 0, ドブネズミ 15 匹に 17, ハタネズミ 108 匹に 3,667 といった 記録があり、野ネズミ種によって寄生ツツガム シに違いをみている<sup>3)</sup>。このことは穴居性の強 いハタネズミはツツガムシの寄生頻度が高いと 考えられ、当該地域における野ネズミ種の変化 もまたアカツツガムシの生息密度に影響を与え たと考えられる。

1964 年当時は患者発生の記録がなく「恙虫棲 息地区」ではなかったが、今回の調査でアカツ ツガムシが採集された地区では、当時そこに生 息するアカツツガムシが病原体を保有していな かった可能性もあるが、雄物川中流部の大仙市 北楢岡(No.4)~大曲小貫高畠(No.10)につい ては、以下のような生息域の変遷を考察するこ とができる。

北楢岡 (No.4) は,治水地形分類図<sup>21)</sup>をみる と,かつては東西約 4km,南北約 1.5km の大き な中州にあった。1948 年以降発行の国土地理院 の地図で確認すると,北楢岡は中州から地続き の土地に変わっており,その後は長年荒れ地で 人の立ち入りが困難な場所であった。歴史的にも, 河川港や船着き場などがなかったことから<sup>22)</sup>, 患者が多い時代にも人の出入りがほとんどなく, 仮に病原体保有アカツツガムシがいたとしても 被害者が発生しなかったと推察される。神宮寺

(No.5)も同様に,以前は川岸の河床であり, ここを離れるとすぐに荒れ地〜急勾配の山際で



図 6:河川緑地公園(No.7)周辺と大曲 捷水路(⇔) \*破線:元の河道,画像は Google Map より

あったことから「恙虫棲息地区」にならなかっ た可能性がある。

大仙市大曲西根(No.6) ~小貫高畠(No.10) は比較的アカツツガムシ採取数が多い地区であ るが,河川緑地公園(No.7)周辺は1958年まで は現在のような河川敷ではなく, 雄物川の西方 左岸に広がる広大な農地で, 落堀や河川流路跡 もないため水際を好むアカツツガムシの生息に は不向きと思われる土地であった。当時の雄物 川は農地を回避するように大きく曲がりくね り、川幅も狭く湾曲の頂点で市街地を流れる丸 子川と合流していたため河水の流下が妨げら れ,しばしば氾濫し市街地に浸水被害を起こし ていた。このことから, 丸子川との合流点を下 流に移すための採掘工事が左岸の農地内で行わ れ,河道を直線化した捷(しょう)水路が作ら れた(図 6)。現在の No.7 は, この堤防間幅約 500 m の捷水路右岸の人工河川敷にあたる。こ こでは, 通水が開始されてから9年後の1976年 に初めて患者発生が確認されるが、この年は No.7 の対岸(捷水路左岸)での感染者を含め3名の 患者が確認された。その後 1985 年までに No.7 の対岸を花火の打ち上げ場,右岸の公園(No.7) を観客席とする花火大会に参加した後に発病し た患者が花火師,観客を含めて18名確認されて

いる<sup>23)</sup>。もともと非生息域であったと思われる この地区にアカツツガムシが定着し,患者の発 生までみられるようになった要因の一つとし て,川床移動に伴う上流からの土砂移動が考え られる。雄物川大曲捷水路の変遷に関する報告 では、通水開始から 1967 年~1970 年を砂礫堆 の誕生期, 1971 年~1976 年を成長期, 1977 年 以降を草木などの植生が定着した完成期とし, ほぼ 10 年かけて上流からの土砂移動に伴い人 工河川が自然な川らしい姿に近づいていったこ とを示している<sup>24)</sup>。この完成期と患者発生開始 がほぼ同時期であることから、上流水際砂地で 生息していたアカツツガムシが数年以上の歳月 をかけて土砂と共に移動し定着したことが推察 される。このような河川改修による患者発生地 の移動現象は、本県と同様に古くから夏季のつ つが虫病発生地として知られる新潟県信濃川流 域でも確認されており,大規模な河川改修が直 ちに患者減少にはつながらないことも指摘され ている<sup>25)</sup>。すなわち,河川改修後でもツツガム シの生息は回復する可能性があることと、回復 後は患者発生がみられることを示している。こ の他, No.7 近隣の No.6, No.8~No.10 も捷水路 作成工事に伴う護岸,築堤工事によって河道と 水流が穏やかに整えられているため, No.7 と同 様に水際の土壌に変化があったと思われる。こ のように、No.7 周辺は人工河川の左右岸がアカ ツツガムシの新たな生息地となったが,現在の アカツツガムシの生息域は水際~法面に集中 し、人の通常活動域(高水敷の公園内の草地) ではない。また,花火大会等のイベント開催前 には殺虫剤の散布などを含めた害虫対策や地表 に直座りしないための桟敷席の整備が年々徹底 されたこと、加えて 2008 年の 15 年ぶりの患者 発生以降,県および地元自治体がつつが虫病予 防啓発に努めたことにより患者の発生が抑えら れていると思われる。

なお, 雄物川支流である玉川および横手川流 域でも過去には恙虫棲息地区ではなかったが今 回の調査でアカツツガムシ生息が確認された地 区が2ヵ所みられた。いずれも雄物川の合流部 付近で,河川改修工事により河道が大きく様変 わりした地区であることから, 雄物川本流と同 様の環境変化があった可能性がある。2ヶ所の うち, 横手川流域では 1990 年 8 月に釣りを感染 機会とした患者が1名発生したが、これ以降の 患者発生は確認されていない。

また、本調査では一部ではあるが同一地区内 におけるアカツツガムシ分布状況も検討した。 いずれも採集されるのは水際の砂地~法面まで で、多数のアカツツガムシが採取された地区で も、水際を離れると採集することができなかっ た。これにより、以前は「河川敷や中州に生息」 と広い範囲で表現されることが多かったアカツ ツガムシ生息地点は,近年の患者の感染要因が 全て釣りであることを裏付けるように川から極 めて近い砂地や中州などで、河川の増水によっ て浸水する低い地点に限定して生息することが 判明した。この地点は,各区域によって堤防の 大きさや河川敷幅が異なるが,調査対象地区近 辺の水位雨量情報<sup>26,27)</sup>で確認すると,おおよそ の目安として各地区で「水防団待機水位」とさ れる水位よりも低いところがアカツツガムシ生 息地点に当たることが分かった(図 3,4)。これ により,今回の分布状況調査の対象外であった アカツツガムシ生息確認地区における生息域は,

「水防団待機水位」以下の水際であると想定し て,注意喚起する必要があると思われる。治水 地形分類図によると,本調査でアカツツガムシ が採集された地区は,全て雄物川および旧河川 が網目のように広がった地域の中にあった。河 道が安定しなかった雄物川は,広いところでは 左右約 2kmに広がる砂地と植生があり,アカツ ツガムシにとっては好適な生息環境が広がって いたと思われる。過去の患者の感染要因は河川 敷の採草であったが<sup>28)</sup>(渡辺,児玉,1964),近 年は釣りであるように,ヒトの生活形態や河川 環境の変貌により感染の機会も変化している。

佐々は、「つつが虫病の最も有効な予防対策は 河川改修であり、それが大いに進んでいる」と 記している<sup>13)</sup>。秋田県においても一部にアカツ ツガムシの定着例があるものの、患者発生数は 激減し、河川改修はつつが虫病発生予防にも大 きく貢献したと言える。ただし、今後、患者発 生がみられない時期がしばらく続き、アカツツ ガムシも同時に消滅したという誤解が広がると、 再び患者が発生した際に診断の遅延が懸念され る。とりわけ危惧されるのは、古典型つつが虫 病に馴染みのない県外からの観光客が帰郷後に 発病した場合の受診や治療の遅れである。 アカツツガムシの生息状況モニタリングは, 自然環境の変化を注視しつつ,継続していくこ とが必要と思われる。併せて,県内における定 期的な注意喚起およびアカツツガムシによる夏 季のつつが虫病の全国的な啓発が不可欠である。

### 参考文献

- 国立感染症研究所,厚生労働省健康局結核 感症課:つつが虫病・日本紅斑熱 2006~
   2009,病原微生物検出情報,31,2010, 120-122.
- 田中敬助:日本洪水熱病原研究 第二回報
   告(続),東京医学会雑誌,22,1894,990-1003.
- Tamiya T. : Recent Advances in Studies of Tsutsugamushi Disease in Japan., Medical culture inc. Tokyo., 1962,309 pp.
- 4) 須藤恒久:届け出制度開始以前の恙虫病患者 数には非発病刺咬者も含まれていた,秋田 医報,1413,2013,15-16.
- 5) 国立感染症研究所感染症情報センター:感染症の話 ツツガムシ病(第13週号;2002年3月15日~3月31日),2002,〔accessed December 24, 2015〕.
  http://idsc.nih.go.jp/idwr/kansen/k02\_g1/k02\_13/k02\_13.html
- 佐藤寛子,國生泰範,柴田ちひろ,斎藤博 之,斎藤志保子,藤田博己,須藤恒久:秋 田県において 15 年ぶりに確認された古典 型つつが虫病の1 例,感染症学雑誌,84, 2010,454-456.
- Suzuki H. : Geographical and topographical differences in population densities of *Leptotrombidium scutellare.*, Jpn. J. Sanit. Zool., 37, 1986, 282 26.
- Uchikawa K., Kawamori F., Kawai S., and Kumada N.: Suzuki's Method (MITORI-HO), a Recommended Method for the Visual Sampling of Questing *Leptotrombidium scutellare* Larvae in The Field (Trombidiformes, *Trombiculidae*). J. Acarol. Soc. Jpn., 2,1993, 91-98.
- 9) Takada N., Fujita H., Kumazawa H., Chiya S., Yano Y., and Iwasaki H. : New findings of

Leptotrombidium scutellare (Acari: Trombiculidae) in western Japan, and its epidemiological significance., Med. Entomol. Zool., **52**,2001, 59-62.

- 10) 高田伸弘:病原ダニ図譜,金芳堂,京都, 1990,216 pp.
- 江原昭三:日本ダニ類図鑑,ツツガムシ科 (浅沼 靖,佐々 学,鈴木 博著),全国 農村教育協会,東京,1980,316-331.
- 田中敬助:日本洪水熱病原研究 第二回報
   告,東京医学会雑誌,20,1894,900-903.
- 13) 佐々学:日本の風土病,法政大学出版局, 東京, 1959, 334 pp.
- 14)秋田県建設技術センター:秋田県土木史(第 一巻),秋田県建設技術協会,秋田,1990, 281 pp.
- 15)工藤容子、小川鶴蔵、高田晋、野谷靖浩、 竹内善幸:雄物川における河川のダイナニ ズムと河川環境の回復について、リバーフ ロント研究所報告、13,2002,28-31.
- 16)寺邑誠祐:秋田縣下の恙虫および恙虫病の 研究,衛生動物,5,1954,26-41.
- 17)吉村堅太郎:つつが虫棲息実態に関する調 査研究,昭和 60・61 年度秋田県つつが虫病 に関する委託研究事業(吉村堅太郎,須藤 恒久著),秋田県福祉保健部,秋田,1988, pp.1-10.
- 18) 吉村堅太郎:つつが虫棲息実態に関する調 査研究,昭和 62・63 年度秋田県つつが虫病 に関する委託研究事業(吉村堅太郎,須藤 恒久著),秋田県福祉保健部,秋田,1990, pp.1-16.
- 19)藤田博己,佐藤寛子,柴田ちひろ,高田伸 弘,矢野泰弘,寺邑能美,金子紀子,門馬 直太,高橋守,安藤秀二,角坂照貴,藤田 信子:リケッチアを中心としたダニ媒介性 細菌感染症に関係するダニ類の実態調査-2010年度の東北各県と新潟県におけるア カツツガムシ調査成績-,厚労科研報告書 :リケッチアを中心としたダニ媒介性細菌 感染 262 症の総合的対策に関する研究(岸 本壽男編),東京,2010, pp.49-54.
- 20) 佐藤寛子,柴田ちひろ,斎藤博之,佐藤了 悦,齊藤志保子,高橋守,藤田博己,角坂 照貴,高田伸弘,川端寛樹,高野愛,須藤

恒久:アカツツガムシ親和性 Kato 型つつが 虫病患者の確認を受けての秋田県雄物川流 域における調査成績(2009),衛生動物,64, 2013,21-25.

- 国土地理院:治水地形分類図,国土地理院, 東京,1977.
- 22) 佐藤清一郎: 雄物川往来誌(上),秋田文化 出版社,秋田,1978,152 pp.
- 23)須藤恒久:七度目の年男からの「恙虫病警報」,秋田医報,1345,2010,20-21.
- 24)藤木修,石川進作:雄物川捷水路の変遷に ついて土木史研究,16,1996,425-434.
- 14葉徳爾: Medical Geography と民間医療, 明治大学人文科学研究所紀要, 25, 1987, 69-96.
- 26) 秋田県河川砂防課, 秋田県河川砂防防災シ ステム, 2015, [accessed December 17, 2015]. http://www2.thr.mlit.go.jp/akita/kawa/frame2. html
- 27) 国土交通省、リアルタイム 川の防災情報, 2015, [accessed December 17, 2015]. http://www.river.go.jp/nrpc0303gDisp.do?mod e=&areaCode=82&wtAreaCode=3224&itemK indCode=901&timeAxis=60
- 28)渡辺富雄,児玉栄一郎:秋田県における恙 虫病の発生状況について,秋田県衛生科学 研究所所報,9,1964,75-88.
- Takada N. : Recent findings on vector acari for rickettsia and spirochete in Japan., Jpn. J. Sanit. Zool., 46, 1995, 91-108.





# 表 1-1 雄物川本流のアカツツガムシ生息調査地点および採集結果

No.		調査地点の地名 (付近の公共施設,支流など)	右岸(R) 左岸(L)	調査地点;緯度(N) 経度(E)	アカツツガムシ +~+++/-
1		刈和野	R	39° 32'40.9"N 140° 21'58.8"E	_
2		北野目(三条川原)	R	39° 32'19.4"N 140° 21'59.8"E	—
3		神宮寺	R	39° 31'13.9"N 140° 21'43.1"E	_
4		北楢岡(船着場)	R	39° 29'25.1"N 140° 23'26.1"E	+++
5		神宮寺	L	39° 29'02.0"N 140° 25'29.0"E	+
6		大曲西根	デルタ地帯	39° 27'59.0"N 140° 27'35.4"E	+
7		小貫高畠(河川緑地公園)	R	39° 27'13.9"N 140° 28'00.2"E	+++
8		上 <b>开</b> 中(上井井小上桥)	L	39° 26'50.8"N 140° 28'05.0"E	+++
9	一大仙市	大曲四根(大曲化火大橋)	L	39° 26'46.6"N 140° 28'06.8"E	+++
10		小貫高畠	R	39° 26'42.3"N 140° 28'18.9"E	+
11		川目(上総川)	R	39° 25'44.1"N 140° 28'55.3"E	++
12		藤木(横手川)	R	39° 24'59.1"N 140° 28'54.4"E	++
13		藤木(角間川船着場)	R	39° 24'40.1"N 140° 28'43.1"E	++
14		角間川町大中島 *2008年患者感染地	R	39° 24'15.0"N 140° 28'09.9"E	++
15		角間川町旭森(木内川)	R	39° 23'23.7"N 140° 27'46.0"E	++
16		角間川町川西	R	39° 22'55.4"N 140° 27'50.5"E	++
17		大雄	中州	39° 21'01.0"N 140° 27'17.0"E	+++
18		大雄(阿気カヌー船着場)	R	39° 20'46.1"N 140° 26'50.8"E	++
19			R	39° 19'53.3"N 140° 25'47.8"E	+
20	· ·····		R	39° 18'16.1"N 140° 25'10.9"E	+++
21	傾手巾	雄物川町深井(雄物川河川公園)	R	39° 17'30.6"N 140° 24'43.6"E	++
22		<u></u>	R	39° 17'05.1"N 140° 24'36.0"E	++
23		<b>雄物川町</b> 深开	R	39° 16'53.1"N 140° 24'16.9"E	++
24		<b>雄物川町西野</b>	R	39° 15'12.7"N 140° 24'15.7"E	++
25	羽後町	高尾田上鵜巣(西馬音内川)	L	39° 15'08.7"N 140° 24'06.2"E	+
26			R	39° 14'44.7"N 140° 25'09.7"E	+
27		十文字町睦合(別明下川原)	R	39° 14'18.7"N 140° 25'44.6"E	+
28	楼手击	十文字町睦合(福島川原)	L	39° 13'56.7"N 140° 25'56.5"E	+
29	间一一两	十文字町睦合(砂出川原)	L	39° 13'41.0"N 140° 26'10.0"E	+
30		十文字睦合	R	39° 13'47.0"N 140° 26'17.2"E	+
		(唯口加省已场,沙虫川床)	D	20° 11'10 6"NI 140° 27'06 2"E	
		柳田(柳田椿)		20° 10'54 0"N 140° 27'26 2"E	тт 
		物田(物田恂)		$39^{\circ}$ 10'50 1"N 140 27'30.2 E	
				20° 00'50 5"N 140° 20'20 5"E	
		清水(文月橋)	к 	20° 00'59 4"N 140° 20'21 6"E	
				39 0936.4  N 140 2631.0  E	
		中期5日(中川原恆)	L	20° 00'25 6"NI 140° 20'42 0"E	т 
			 Р	39 0923.0 N 140 2843.9 E	— —
20				20° 00'10 0"N 140° 20'40 4"E	
40		周日 (約七方マ明川原)		39 0010.9 N 140 2049.4 E	
40	· 湯沢市	周口(彩左石工门川原) 	L	20° 07'49 0"NI 140° 28'51 2"E	_
41		(ト定桥)	D	20° 07'46.7"N 140° 20'52 6"E	
42			<u>г</u>	30° 07'46./"N 140° 20'52.0 ⊑	_
чэ 		下関(戸沢川)		30° 07'46 1"N 140° 20'50 1"⊏	
 15		山田	N	30° 07′08 0″N 140° 2033.1 ⊑	 
40 		山田(五ヶ村商苦工)	بــــــــــــــــــــــــــــــــــــ	39°06'5555"N 1/10°20'335"⊑	
۰۰۰ 47		四田(ユンゴ)坂日土/ (満巻(満巻巻)	L I	39° 06'25 3"N 140° 28'36 5"⊑	 +
 48				39° 06'22 8"N 140° 28'42 0"⊏	·
 <u>1</u> 0				39° 06'05 3"N 140° 28'38 6"E	
				39° 04'09 5"N 140° 26'38 0"F	_
~~		2 C	••		

# 表 1-2 雄物川支流のアカツツガムシ生息調査地点および採集結果

No.	(付近	調査地点の地名 fの公共施設, 支流など )	右岸(R) 左岸(L)	支流	調査地点;緯度(N)経度(E)	アカツツガムシ +~+++/-
51		花館	L		39° 28'57.1"N 140° 26'58.8"E	+
52		四ッ屋(玉川橋)	R		39° 29'44.4"N 140° 28'19.0"E	—
53		花館(玉川橋)	L		39° 30'02.5"N 140° 28'30.3"E	—
54		四ッ屋(勝田橋)	L		39° 30'20.0"N 140° 29'00.1"E	_
55		松倉	R		39° 30'51.6"N 140° 30'14.1"E	_
56		大曲西根(船着場)	L		39° 27'56.5"N 140° 27'43.2"E	—
57			R	-	39° 27'40.2"N 140° 28'25.3"E	—
58	大仙市	人田丸の内(人盈信)	R		39° 27'39.1"N 140° 28'35.4"E	_
59		大曲中通(丸子橋)	R	丸子川	39° 27'38.6"N 140° 28'41.6"E	_
60		大曲黒瀬(館の橋)	R	  横手川	39° 27'36.9"N 140° 28'54.0"E	—
61		据目内(田英士场)	R		39° 27'47.8"N 140° 30'34.6"E	_
62		堀兒内(田戊 <b>木</b> 橋)	L		39° 27'47.4"N 140° 30'37.0"E	_
63			L		39° 24'50.8"N 140° 28'58.2"E	+
64		藤木	R	横手川と出川の合流部	39° 24'32.5"N 140° 29'13.1"E	+
65			L	出川	39° 24'29.9"N 140° 29'16.1"E	-
66	楼壬士	推炼出旺源共	R	工的反答师	39° 17'39.2"N 140° 24'52.8"E	_
67	傾于叩	<b>雄物川町冰井</b>	L	<b>五</b> 即共闻地	39° 17'31.7"N 140° 24'57.1"E	—
68	羽後町	西馬音内	R	西馬音内川	39° 11'35.7"N 140° 23'10.8"E	—
69	横手市	十文字町植田(雄平橋)	R		39° 12'58.9"N 140° 28'27.8"E	—
70		角間川向(雄平橋)	L	长海山	39° 12'52.3"N 140° 28'32.3"E	_
71	湯沢市	岩崎(新岩崎橋)	L	"你们们的"。 "你们们们们们们们们们们们们们们们们们们们们们们们们们们们们们们们们们们们们	39° 12'36.0"N 140° 30'30.4"E	+
72		岩崎(奥羽本線岩崎鉄道橋)	L		39° 12'21.8"N 140° 30'52.8"E	+
73	横手市	増田(成瀬川橋)	L	成瀬川	39° 11'33.8"N 140° 33'03.1"E	_
74	湯沢市	橫堀(万石橋)	R	役内川	39° 03'37.0"N 140° 26'42.2"E	—

# 表 1-3 水際~法面~高水敷のアカツツガムシ分布調査

No.		調査地点の地名調査地点の地名調査地点		地表面	アカツツガムシ +~+++/-
			高水敷(公園内;法面から10m)	草地	_
7	7 大仙市 小貫高畠 <sup></sup> 7 大仙市 (河川緑地公園) <sub></sub>	高水敷(公園内;法面から1m)	草地	_	
		低水路内(水際砂地~法面)	砂地~草地	+++	
	 20      雄物川町沼館 	高水敷	草地	_	
20		低水路内(法面中程~上部)	砂地~草地	++	
		低水路内(水際~法面中程)	砂地~草地	+++	
	横于巾 ————————————————————————————————————	高水敷(法面から10m)	草地	_	
30	十文字睦合 (睦合船着き場;砂虱川原)	高水敷(法面から1m)	草地	_	
		低水路内(水際~法面)	砂地~草地	+	

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(平成 25~27 年度)

# パンソルビン・トラップ法の実用段階における問題点の検討

#### 斎藤博之 秋野和華子 野田 衛\*1

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機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。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。

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。問題解決の方策として,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。

#### 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>14-19</sup>。これらの実績を踏まえて,平成25年10 月22日付け「食安監発1022第1号」<sup>20)</sup>にて食品 中のウイルス検査法として通知されるに至った。 一方,本法の普及段階において,次のような問題 点が浮上してきた。

①市販のガンマグロブリン製剤は医薬品であり、 薬機法に規定される使用者義務が課せられるため、 購入・使用が困難な場合がある。そのため、医薬 品ではない試薬用のガンマグロブリンを検討する 必要がある。

②遺伝子解析技術の高度化に伴い,現行の PCR プ ライマーによる増幅領域を全て含む遺伝子断片を 扱う機会が増えることから,食品検査における偽 陽性対策(コンタミ対策)を強化する必要がある。 ③NoV 以外の食中毒起因ウイルスに対しても検 出系を最適化する必要がある。

④食品のウイルス検査に関して未経験の機関が導入することも考慮して、常に回収率を確認できるように内部標準物質を組み入れた方法を検討する必要がある。

⑤本法はあくまでも実験室内における検査法であ

\*1国立医薬品食品衛生研究所

り, 食中毒対策全体の中の位置付けと運用面での 検討を進める必要がある。

今年度は、①と②について解決策を検討し、③ 以降は次年度に引き継ぐこととした。

# 2. 方法

# 2.1 研究材料

ガンマグロブリンの検討に用いる食品として、 市販されているポテトサラダと焼きそばを用いた。 また、検出対象となるウイルスとして、NoV-GI.4 (AB685383), NoV-GI.6 (AB448733), NoV-GII.2 (AB685706), NoV-GII.4 (AB293424), NoV-GII.6 (AB685708)を含む糞便を用いた。

偽陽性対策の検討を行うための遺伝子断片としては、市販のブロッコリーから抽出したゲノム DNA (GQ891876)を用いた。

- 2.2 試薬類
- 2.2.1 食品洗滌液

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

2.2.2 医療用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 工業用ガンマグロブリン

米国 HDM Labs Inc.社の工業用ガンマグロブリン粉末を,アドビー・ジャパン社を通じて購入し,蒸留水にて 5%溶液とした。

2.2.4 パンソルビン

黄色ブドウ球菌を熱処理してホルマリン固定したものの懸濁液で、メルク社から購入した。

2.2.5 フェノール系 RNA 抽出キット

TRIzol-LS (invitrogen) を使用した。

2.2.6 カラム方式の RNA 抽出キット

QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen)を使用した。 2.2.7 再懸濁液

2.2.5 の抽出キット添付の AVL 液を用いた。

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

# **2.2.9 アミラーゼ** 枯草菌由来 α-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

AptaTaq Fast PCR Master (ロシュ),及びTaKaRa Ex-Taq Hot Start Version (タカラバイオ)を用いた。 2,2,12 逆転写酵素

ReverTra Ace (東洋紡)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 植物異物同定用プライマーセット ブロッコリーの遺伝子断片を得るために、ファ

スマック社より購入した。

2.2.15 Uracil-N-Glycosylase (UNG)

Antarctic Thermolabile UDG (New England BioLabs)を用いた。

2.2.16 逆転写反応に用いたプライマー

ガンマグロブリンの検討には COG1R<sup>22)</sup>,及び COG2R<sup>22)</sup>を用いた。カキ中腸腺からのウイルス検 出にはランダムプライマー (9mer,タカラバイオ) を用いた。

# 2.2.17 conventional PCR に用いたプライマー

NoV-GI に対しては COG1F<sup>22)</sup> / G1SKR<sup>21)</sup>, NoV-GII に対しては COG2F<sup>22)</sup> / G2SKR<sup>21)</sup>のプライ マーセットをそれぞれ用いた。ブロッコリー遺伝 子に対しては,図5と表4に示したプライマーセ ットを用いた。

- 2.2.18 conventional PCR 装置
  - アステック社製「PC-320」を用いた。
- 2.2.19 real-time PCR 装置
  - ロシュ社製「LightCycler 320S」を用いた。
- 2.2.20 real-time PCR 用酵素

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

2.2.21 real-time PCR 反応系 Kageyama<sup>22)</sup>らの方法に従った。

## 2.3 パンソルビン・トラップ法の手順

平成 22 年度に完成した汎用プロトコル (図 1) に従った。本研究では、工業用ガンマグロブリン の評価をするに当り、純粋に抗原抗体反応を比較 する必要から、逆転写反応には COG1R と COG2R を用いた。これは、次に続く real-time PCR 反応の 直近に位置するため、RNA の損傷度や逆転写反応 効率等のファクターを排除することができるから である。



図1 パンソルビン・トラップ法の操作手順

# 2.4 ガンマグロブリンの評価試験

工業用ガンマグロブリンを評価するに当たり, 次の3段階からなる検討を行った。

- (1) パントラ法に用いる際の添加量の最適化
- (2) 工業用と医療用ガンマグロブリンを用いた 際の回収率の比較
- (3) 食品を用いた添加回収試験
- 2.5 偽陽性対策に関する検討

日常の検査業務への影響を回避するため、ブロ ッコリーの遺伝子を用いた(業務では植物遺伝子 を扱わない)。図5に示すとおり、NoVの検出系 と同様の配置で、real-time PCR と nested PCR が行 えるようにプライマー・プローブセットを設計し た(表 4)。検討手順は図6に示したとおりであ る。最初に抽出したブロッコリーゲノム DNA を 鋳型として、「植物異物同定用プライマーセット」 を用いて 415 bp の増幅産物を得た。この反応にお ける酵素と基質として、Ex-Taq と通常の dNTP の 組み合わせと、dUTP を含む AptaTaq Fast PCR Master を使用した。後者の反応系で得られた DNA 断片は T の塩基が U に置換されている。これらの 断片を Broc-F2 / Broc-R2 / Broc-P を用いた real-time PCR で定量し、蒸留水で段階希釈するこ とで、 $10^4 \sim 10^1$  コピー/5  $\mu$ L のブロッコリー遺伝子 由来増幅産物を含む被検体を調製した。ここでの 定量コントロールは real-time PCR 増幅領域の部分 を化学合成したものを用いた。この被検体を、食 品検査においてキャリーオーバーによって混入し た PCR 産物と仮定し、無効化、あるいは鑑別する 方法を検討した。

1st. PCR プライマーセットである Broc-F1 / Broc-R1 と, 被検体 5 μL を含む AptaTaq Fast PCR Master (anti-Taq high によりホットスタート化し たもの)の反応系 20 μL を調製し次の条件でタッ チダウン PCR を行った。この際,反応液に UNG を加えたものと加えないものの 2 系統を調製した。 前者においては、混入した PCR 産物に含まれる U の塩基部分を分解することで、コンタミネーショ ンの影響を無くすことが期待できる。タッチダウ ン PCR におけるホットスタートは、非特異反応の 抑制に効果的であることが知られているが、ここ では U の分解処理後に不要となった UNG を不活 化する工程も兼ねている。

【タッチダウン PCR】

95℃2分1サイクル

95℃30秒 - (<u>60→55℃</u>)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 - 55℃30秒 - 72℃30秒 40サイクル 72℃7分 1サイクル

1st. PCR 終了後,反応液の一部を電気泳動で解 析すると同時に,蒸留水で10倍希釈したものを, Broc-Fn / Broc-Rn を用いた 2nd. PCR で再増幅した。 2nd. PCR の反応液には UNG を加えなかった (1st. PCR 産物が分解されるため)。同様に 1st. PCR 産 物に対して real-time PCR による再増幅も行った。

#### 3. 結果

#### 3.1 工業用ガンマグロブリンの有用性の検証

食品洗滌液 50 mL に NoV-GII.4 を投入し、ガン マグロブリンの添加量を変えて回収率を比較した 結果を表1に示した。回収率は、5%ガンマグロブ リンを150 µL 添加する条件で最適化された。ここ で最適化された添加量の工業用ガンマグロブリン を用いて, 種々の遺伝子型の NoV への反応性を確 認した(図 2A~2E,表 2)。その結果,本研究で 用いた5種類の遺伝子型については、工業用ガン マグロブリンは医療用と比べて同等以上の反応性 を有していることが明らかとなった。同様の結果 は,実際の食品検体を用いた添加回収試験におい ても得られており(図 3A~3B,表 3),工業用ガ ンマグロブリンの有用性が証明された。以上の結 果を踏まえて、工業用ガンマグロブリンを試薬と して包装されたものが一般に購入できるようにな り(図4),食品衛生検査指針<sup>24)</sup>に収載された。

#### 3.2 偽陽性対策に関する検討

Tの塩基がUに置換されたPCR 産物は,UNG で処理することで特異的に分解され,以後の結果 判定に影響しなくなることが示された(図 7)。 また,2nd.PCRで real-time PCRを用いた場合にお いても,UNG処理によってUを含んだ増幅産物 が検出されなくなった(図 8)。さらに,UNG処 理を行わない場合には当然の帰結として増幅カー ブが認められたが,10サイクル未満の非常に早い 段階でカーブが立ち上がることがわかった(図 8)。

添加抗体	回収量(機器表示値)	回収率(%)
Gammagard 150 µL	$4.750 \times 10^3$	46.8
5%HDM 75 μL	$4.819 \times 10^{3}$	47.4
5%HDM 150 μL	$5.282 \times 10^{3}$	52.0
5%HDM 300 μL	$3.537 \times 10^{3}$	34.8
抗体無し	$1.909 \times 10^{2}$	1.9

表1 反応系におけるガンマグロブリン添加量の検討

NoV GII.4 投入量: 1.016×10<sup>4</sup> コピー(機器表示値)

Gammmagard: 医療用ガンマグロブリン製剤 (Baxter 社)

HDM: 工業用ガンマグロブリン (HDM Labs 社, Advy Japan を通じて供給)



図 2A 回収率における工業用ガンマグロブリンと医療用ガンマグロブリンの比較 (NoV GII.4 の増幅曲線)



図 2B 回収率における工業用ガンマグロブリンと医療用ガンマグロブリンの比較 (NoV GI.4 の増幅曲線)



図 2C 回収率における工業用ガンマグロブリンと医療用ガンマグロブリンの比較 (NoV GI.6 の増幅曲線)



図 2D 回収率における工業用ガンマグロブリンと医療用ガンマグロブリンの比較 (NoV GII.2 の増幅曲線)



図 2E 回収率における工業用ガンマグロブリンと医療用ガンマグロブリンの比較 (NoV GII.6 の増幅曲線)

表2 回収率1	こおける工業用ナ	ĭンマグロブリ	ンと医療用ガン	ノマグロブリ	ンの比較	(総括)
---------	----------	---------	---------	--------	------	------

· 沃加拉休	NoVの遺伝子型と回収率(%)					
称加切口种	GI.4	GI.6	GII.2	GII.4	GII.6	
Gammagard 150 μL	37.6	6.1	38.2	46.8	13.3	
5% HDM Gamma Globulin 150 µL	35.7	12.1	38.6	52.0	15.5	



図 3A ポテトサラダにおける添加回収試験 (NoV GII.4 の増幅曲線)



図 3B 焼きそばにおける添加回収試験 (NoV GII.4 の増幅曲線)

表3 添加回収試験における工業用ガンマグロブリンと医療用ガンマグロブリンの比較

沃加拉休	食品の種類と回収率(%)		
	ポテトサラダ	焼きそば	
Gammagard 150 µL	34.7	32.4	
5% HDM Gamma Globulin 150 μL	40.6	33.5	



図4 試薬用に包装されたガンマグロブリン(左: 工業用粉末、右: 試薬バイアル)

		ブロッコリー	の rDNA 堆	曾幅断片	(415 bp)		
Bro	► c-F1					Broc-R1	402bp
	Broc-Fn				Broc-Rn	332b	p
		Broc-F2	Broc-P	Broc-R2		107bp	

図5 検討に用いたブロッコリー遺伝子とプライマー・プローブの配置

名称	配列(5'→ 3')	増幅サイズ(bp)
Broc-F1	TCGCGAGAAGTCCATTGAAC	409
Broc-R1	TTTCGCTACGTTCTTCATCGA	402
Broc-Fn	AGAGGAAGGAGAAGTCGTAAC	222
Broc-Rn	GTTGCCGAGAGTCGTTTTAGA	00 <u>7</u>
Broc-F2	GCTGATTTCGTGCCTACCGATTCC	
Broc-R2	CTTTTCGTGCCGGGGTTTGGTGATA	107
Broc-P	FAM- ACCGGCCCAGTTTCGGTTGGATC – TAMRA	

表4 検討に用いたブロッコリー遺伝子のプライマー・プローブ配列



図 6 ブロッコリー遺伝子を用いた UNG 処理の評価試験方法



図7 ブロッコリー遺伝子を用いた UNG 処理の評価試験結果(電気泳動) 段階希釈したブロッコリー遺伝子断片に対して 1st.PCR(左)→2nd.PCR(右)を行った。



図8 ブロッコリー遺伝子を用いた UNG 処理の評価試験結果 (nested real-time PCR) 段階希釈したブロッコリー遺伝子断片に対して 1st.PCR を行い,その増幅産物をさらに real-time PCR で再増幅した。ポジコンは参考値として加えた。

# 4. 考察

## 4.1 試薬としてのガンマグロブリンの必要性

パントラ法の基本原理は、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。開発段階において はウイルス捕捉抗体の供給源として医療用ガンマ グロブリン製剤を用いてきた。医薬品を試薬とし て用いること(オフラベルユース)については、 組織培養における抗生物質のように従前より各方 面で頻繁に行われており、何ら問題はない。ただ し、地方衛生研究所等で少量を使用する段階を超 えて、民間機関も含めてより大規模に普及した場 合を想定すると、次の4点について対策を講じて おく必要があった。

①医療用ガンマグロブリン製剤は、薬機法に定められている「特定生物由来製品」に該当するため、製造番号などの使用記録を 20 年間保管する義務が生じる。

②計画生産品であることから流通量に上限があり, 医療目的が優先されるために試験検査目的の場合 は安定供給されない可能性がある。

③医薬品であることから,医師のいない環境系試 験検査機関では購入が困難な場合がある。 ④将来, 試薬メーカーがパントラ法のキット化を 企画しても, 医薬品を組み入れることは難しい。

本研究では、これらの課題を根本的に解決し、 食品のウイルス検査の円滑な普及に繋げるために, 医薬品ではない,工業用ガンマグロブリンを用い ることを検討した。表1に示したとおり、パント ラ法における工業用ガンマグロブリンの添加量は 150 山 で最適化された。医療用ガンマグロブリン 製剤の添加量も150 uL であることから、プロトコ ルを改変することなしに、 ガンマグロブリンの部 分を置き換えるだけで済むことになる。次に食品 洗滌液からのウイルスの回収率を、工業用と医療 用のガンマグロブリンをそれぞれ用いた場合につ いて比較した(図 2A~2E,表 2)。ここでは、食 品を用いていないため、純粋に抗原抗体反応の比 較となる。その結果,工業用ガンマグロブリンは 医療用と比べて同等以上の効果を有することが明 らかとなった。さらに、実際の食品を用いて回収 率を比較した場合でも、工業用ガンマグロブリン の有用性は証明された(図 3A~3B, 表 3)。これ まで我が国では、ガンマグロブリンは医療用のも のしか販売されていなかったが,本研究の実績を 踏まえて,工業用のものを改めて試薬として包装

したものが一般に購入できるようになった(図4)。 このガンマグロブリンは、あくまでも試薬であっ て医薬品ではないことから、薬機法の適用を受け ず、パントラ法の円滑な普及に寄与するものであ ると考えられる。

#### 4.2 偽陽性防止対策強化の必要性

パントラ法が普及するにつれて、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。近年の遺伝子解析技術の高度化に伴って NoV の PCR プライマーの配置部位を全て包含す るような DNA 断片を扱う機会が増えるが、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。この問題対策 の布石として平成25年度の研究により,最終的に 得られる DNA 断片にウラシルが含まれるような 反応系を構築することができた。今年度はさらに 一歩進めて UNG (Uracil-N-Glycosylase)処理による 偽陽性防止策について評価を行った。

偽陽性の原因として考えられるコンタミ物質と しては,

①糞便

2 RNA

3cDNA

④ポジコン

#### ⑤以前に実施した PCR 産物

の5つが考えられる。①~③は増幅前の段階であ り、④も最大で10<sup>6</sup>コピー/ $\mu$ L程度の量であること から、これまでどおり封じ込めを主体としたコン タミ対策で十分である。しかし、PCR 産物を遺伝 子解析するために電気泳動ゲルから切り出し精製 する操作では  $10^{12}$ ~ $10^{15}$ コピー/ $\mu$ L に相当する高 濃度の DNA 断片を扱うことから、封じ込めだけ では限界がある。次に、コンタミ物質が混入する 機会としては、

# ①RNA の抽出段階

# ②cDNA の合成段階

③1st.PCR の反応液調製段階

④2nd.PCR の反応液調製段階

が考えられる。本研究では、最初に最もリスクの 高いケースとして、①~③の段階で以前に実施し た PCR 産物が微量混入した場合を想定して対策 を検討した(大量に混入した場合は陰性対照も陽 性となることから判別可能)。図7に示されたとお り、塩基としてTの代わりにUを含むDNA断片 は、UNG処理を行うことで特異的に分解され、以 後の判定には影響しないことが確認できた。UNG は1st.PCRの反応液に添加するだけであるから特 段の操作は必要とされない。塩基としてTが含ま れる通常のDNA断片はUNGの影響を受けないた め、真に陽性の場合だけ増幅反応が認められるこ とになる。

次に 2nd. PCR の反応液調製段階で,コンタミ物 質が混入した場合について対策を検討した。1st. PCRの増幅産物はすでにTがUに置換されている ため, 前述の UNG 処理は行うことができない (真 に陽性であっても分解除去される)。しかし, 2nd. PCR を real-time PCR で行うようにすれば,図8に 示されたとおり、陽性ならば非常に早いサイクル で増幅カーブが立ち上がることから判別が可能で ある。図8では、1st. PCR で UNG 処理を行わなか った場合の増幅カーブが示されているが、塩基が T である通常の DNA 断片も同様のパターンとな る。1st. PCR 産物を real-time PCR で再増幅する手 法は、ハイブリによる確認試験に相当することか ら多くの局面で用いられている。図9と図10には カキ中腸腺からの NoV 検出の場合を例示した。検 出と不検出は明確に区別され,陽性の場合は非常 に早いサイクルでカーブが立ち上がることが見て 取れる。パントラ法においては、図11に示したと おり汚染度として 35 コピー/g と 10 コピー/g の間 で検出・不検出が分かれるが,前者は20サイクル 程度で立ち上がっており、後者は完全にフラット である。

以上の知見を総括し、偽陽性防止対策を構築す ると図 12 のようになる。まず、日常の PCR は遺 伝子解析も含めて全て dUTP を含んだ基質を用い るようにする必要がある。塩基の T を U に置き換 えるには酵素の選択や、Mg 濃度の再調整が必須 であるが、AptaTaq Fast PCR Master (ロシュ)を 使用することで最初から U を含む PCR が可能で





COG2F / G2SKR で 1st. PCR を行い, その増幅産物を COG2F / COG2R / RING2-TP を用いた real-time PCR で再増幅した。



図 10 Nested real-time PCR によるカキ中腸腺からの NoV GI の検出 COG1F / G1SKR で 1st. PCR を行い、その増幅産物を COG1F / COG1R / RING1-TP を用いた real-time PCR で再増幅した。

ある<sup>26)</sup>。一方, 食品検体からパントラ法で抽出さ れたウイルス RNA を逆転写する際には通常の dNTPを用いるので,その塩基はTである。1st. PCR の反応液に UNG を添加しておくと, 仮に以前に

行った PCR の産物が混入しても、その塩基には U が含まれていることから分解除去され、本来のウイルス由来の cDNA だけが鋳型となって反応することになる。2nd. PCR では UNG 処理が行えない



図 11 パントラ法と Nested real-time PCR による焼きそばからの NoV GII の検出 (秋田県健康環境センター年報<sup>25)</sup>・図 2 より再掲)

様々な濃度で汚染させた焼きそばからパントラ法でウイルス RNA を抽出し, cDNA 合成の後, COG2F / G2SKR で 1st. PCR を行い, その増幅産物を COG2F / COG2R / RING2-TP を用いた real-time PCR で再増幅した。



図 12 dUTP / UNG を用いた偽陽性対策

が, real-time PCR の Ct 値に着目し, 20 サイクル 以上で増幅カーブが立ち上がるようならば, コン タミの可能性を考慮して再試験をするなど慎重に 対応することで偽陽性は防止できるものと考えら れる。ただし, Ct 値による判別をどのように運用 するかについては,機器や試薬によって差異を生 じるため,各試験機関であらかじめ増幅パターン を把握しておく必要がある。なお,本研究で検討 した偽陽性防止対策は、これまでの封じ込めを主 体とした対策と合わせて実施することで効果が得 られるものであることに留意しなければならない。

#### 4.3 今後の課題

NoV 以外の食中毒起因ウイルスについてもパ ントラ法が適用できることがすでに明らかとなっ ているが、本研究で導入した工業用ガンマグロブ リンの反応性の確認や、PCR 反応系の最適化を進 める必要がある。また、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。さらに、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

パントラ法の普及が拡大するにつれて浮上して きた諸問題について解決策を提示した。医療用ガ ンマグロブリン製剤の使用に関しては薬機法を考 慮に入れる必要があったが、本研究において最初 から試薬用途のガンマグロブリンを調達すること ができたため、根本的な解決に至った。また、高 度な遺伝子解析を実施する機会が増えていること から、偽陽性対策の強化が必要となった。本研究 では、dUTP と UNG の組合せによるコンタミ物質 の無効化と、Ct 値による判別をもとにして対応で きることを示した。

# 参考文献

- 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.
- 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,No.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, No.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.
- Saito H., et. al.: Development of a practical method to detect noroviruses contamination in composite meals. Food Environ. Virol., 7, 2015, 239-248.
- 20) 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.
- 21) Kojima S., et. al.: Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses. J. Virol. Method, 100, 2002, 107-114.
- 22) 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.
- 23) 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, No.12, 2011, 13-14.
- 24)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.

- 25)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,秋田県健康環境センター 年報,9,2013,61-72.
- 26) 斎藤博之,他: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,秋田県健康環境センター年報,10,2014,37-58.

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 25~27 年度)

# 1,4-ジオキサン分解能を有する活性汚泥の分解能向上と保存の検討

小林貴司 村山力則 中村淳子

1,4-ジオキサン分解能を有する活性汚泥について、分解能の向上と長期保存方法の検討を行った。 検討の結果、1,4-ジオキサンを高濃度で付加し、さらにリンを添加することで、1,4-ジオキサン減少速 度 0.95 mg/L/day の活性汚泥を 150 mg/L/day まで向上させることができた。活性汚泥の保存について は、遠心分離後-85℃の冷凍保存により、活性を維持したまま1年半以上の保存が可能であった。

## 1. はじめに

難分解性であり,水にも溶剤にも無制限に溶 解する<sup>1)</sup>1,4-ジオキサンは,一般的な廃水処理 施設では除去が難しいと<sup>2,3)</sup>されていたが, 県内の埋立処分場跡地の廃水処理施設では, 生物処理により効率よく処理されていること がわかってきた<sup>4)</sup>。水温が低下する冬季には, 処理能力が低下するという問題もあったが, 廃水処理施設へ加温設備を整備したことによ り,現在は一年を通じて排水基準を満たす処理 が可能となっている<sup>5)</sup>。しかし,春先になると 短期的な処理能力の低下がときおり生じること もあり,より安定した処理を実現するためにも, 処理能力が低下した活性汚泥の1,4-ジオキサン 分解能を向上させる手法の構築が必要とされ ている。

1,4-ジオキサン分解能を向上させる因子の 検討を行う中で特に着目したのが,廃水処理 施設の流入水中のリン濃度がおよそ 0.05 mg/L 程度と非常に低濃度な点である。検討では,活 性汚泥にリン酸を添加し,1,4-ジオキサン分解 能に及ぼす影響を評価した。

また,処理能力が完全に失われる等の不測の 事態にも対応できるように,活性汚泥の長期保 存方法についても検討を行ったので,その結果 について報告する。

# 2. 方法

#### 2.1 回分式による 1,4-ジオキサン分解能試験

分解能試験は,表1に示す試験系を用い,活 性汚泥試料 500 mL に対し1,4-ジオキサンを添 加し撹拌,1,4-ジオキサン濃度を適宜測定し,濃 度がほぼ0となったところで添加を繰り返す回 分式により行ったの。

1,4-ジオキサン減少速度は、添加直後と濃度が ほぼ0となる直前での濃度差を経過時間で除す ることで算出した。なお、この試験系での1,4-ジオキサン揮発速度は、濃度2mg/L、温度25℃ の条件下でおよそ0.012mg/L/dayである。

# 表1 1,4-ジオキサン分解能試験系

2.2 測定方法

撹拌器	トルネード SMT-103(アズワン)
回転数	200 rpm
500mLガラス容器	DURAN社(PPフタに φ 1cm程度の穴)
水浴	25 °C

1,4-ジオキサン濃度の測定には、ヘッドスペー スオートサンプラーTurboMatrix HS-40 (パーキ ンエルマー) および、キャピラリーカラム DB-624 (J&W)を取り付けたガスクロマトグラ フ質量分析計 GCMS-QP2010 (島津製作所)を使 用した。測定試料は 22 mL バイアルに試料水 10 mL と塩化ナトリウム 3.0 g 及び内標準液として d-1,4-ジオキサンを入れ、アルミキャップで密封 することで調製した。表 2 に測定条件を示す<sup>7.8)</sup>。

### 表 2 ヘッドスペース-GC/MS 測定条件

ヘッドスペースオートサンプラー	TurboMatrix HS-40
気液平衡温度 気液平衡時間 ニードル温度 トランスファーライン温度 加圧時間 インジェクション時間	60 °C 30 min 120 °C 120 °C 3 min 0.15 min
ガスクロマトグラフ質量分析計	GCMS-QP2010
キャリアーガス カラム	He 120kPa DB-624 60m×0 32mm 1.8um

 $40^{\circ}C(1min) - 10^{\circ}C/min - 200^{\circ}C(10min)$ 

2.3 活性汚泥の保存方法の検討

カラム温度

#### 2.3 活性汚泥の保存方法の検討

室温 25℃および冷蔵 5℃に用いる保存試料 は,活性汚泥 500 mL を溶液の状態で保存した。 冷凍-85℃に用いる保存試料は,グリセリン濃 度を 0%,30%,50%とした活性汚泥 500 mLを 遠心器(3000 rpm,10 min)により沈殿,上澄み を除去した後に冷凍保存した。保存後の試験開 始時に,生物処理槽の上澄み液で 500 mL に戻 し,試験溶液とした。分解能試験は,活性汚泥 500 mL に 1,4-ジオキサン 1 mg を添加,濃度 2 mg/L とし撹拌を行い,24 時間後の減少速度を算 出することで行った。1,4-ジオキサン分解能の保 存率は,保存開始時の活性汚泥の減少速度 0.91 mg/L/day を 100%とし,保存後の減少速度と比 較することで評価を行った。

# 結果及び考察

#### 3.1 回分式による 1.4-ジオキサンの減少傾向

図1に1,4-ジオキサン濃度が2mg/Lとなるように定期的に1,4-ジオキサンの添加を繰り返した回分試験での濃度減少とその減少速度を示す。水処理施設で採取した活性汚泥 500 mL に1,4-ジオキサン1mgを添加,濃度2mg/Lとし,25℃で撹拌を開始すると,その濃度は速やかに減少し,およそ2日程度で0となる。

濃度が0となる直前の定量値から、その減少 速度を算出すると添加1回目の減少速度は 1.5 mg/L/day であり,2回目は1.4 mg/L/day とほ ぼ同じ減少速度を示した。その後,濃度を0の 状態にし、5 日経過後に再び添加したところ, 添加直後~32時間はほとんど減少しない状態と なり,添加48時間後には再び減少を始めるがそ の減少速度は0.67 mg/L/dayと遅くなった。その 後,濃度が0の状態とならないように添加を繰 り返すと,減少速度は0.75~1.0 mg/L/dayとほぼ 同様の速度で減少を繰り返す結果となったこと から,活性汚泥の1,4-ジオキサン分解能を維持 するためには,1,4-ジオキサンを継続して供給し 続ける必要があると考えられた。

# 3.2 高濃度 1,4-ジオキサン添加による減少速 度の増加

図 2 に 1,4-ジオキサン添加量を徐々に増やし た場合の 1,4-ジオキサン濃度の減少の様子を示 す。2 mg/L の 1,4-ジオキサンを定期的に添加す る試験では,活性汚泥の 1,4-ジオキサン分解能 は,同様の減少速度を維持する結果となったが, 図 2 のように添加する 1,4-ジオキサン濃度を 2, 20,100 mg/L と濃くすると,徐々にその減少速 度は速くなった。試験開始時に減少速度 1.1 mg/L/dayであった汚泥が 77 日後には 13 mg/L/dayと分解能が 12 倍増加しており,こ れは活性汚泥に含まれる 1,4-ジオキサン分解菌 の増殖によるものと考えられた <sup>9~13)</sup>。





# 3.3 リン酸添加による効果

図3に活性汚泥にリン酸を添加した系で、回 分式により1,4-ジオキサン濃度を2mg/Lとした 場合の減少速度の推移を示す。リン濃度0g/L の試験系は、リン酸を添加せずに1,4-ジオキサ ン1mgの定期的な添加の繰り返しのため、図1 とほぼ同様の状態である。1日目の減少速度1.1 mg/L/day であったものが12日後にも1.3 mg/L/day とほぼ同じ値を示し、図1と同様に分 解能をほぼ一定に維持する結果を示した。

一方,リン酸を添加した系での12日後の減少 速度は、およそリン濃度が濃いほど減少速度の 増加が大きく、リン濃度0.44g/Lの系で最大値 **4.2 mg/L/day** を示した。12 日間で分解能が約 4 倍 増加したことになる。

表3にリン酸添加後のpHの変化を示す。試 験開始時にリン酸を添加するとpHは低下し, リン濃度0.44 g/L,0.57 g/LのpHは4以下であ った。リン濃度0.44 g/L,0.57 g/Lの試験開始時 の減少速度は顕著に遅くなっており,pH4以下 で1,4-ジオキサン分解菌は急激に活性が低下す るものと考えられた。その後,リン濃度0.44 g/L の系は、1日間でpH4以上となってから活性を 取り戻し、今回の試験系の中では、最大値を示 すほど減少速度が増加する結果となった。



図3 リン濃度の違いによる1,4-ジオキサン減少速度の推移

# 表3 リン酸添加後の pH 変化

リン濃度 [g/L]	0	1	2	4	5	6	7	8	9	12	[da
0	7.6	7.8	7.8	7.8	8.0	8.0	8.2	8.0	8.2	8.1	
0.06	6.1	6.7	6.8	6.8	7.0	7.0	7.1	7.0	7.1	7.1	
0.19	4.9	5.7	5.9	6.1	6.3	6.4	6.4	6.5	6.5	6.5	
0.32	4.0	5.2	5.6	5.7	5.9	6.0	6.0	6.0	6.1	6.2	
0.44	3.4	4.4	4.6	4.8	5.2	5.3	5.3	5.4	5.5	5.6	
0.57	3.2	3.5	3.7	4.1	4.5	4.7	4.7	4.8	4.8	5.0	

3.4 活性汚泥の 1,4-ジオキサン分解能向上の 検討

1,4-ジオキサン分解能を向上させる因子であ る高濃度 1,4-ジオキサンの添加およびリン添加 を同時に行い,1,4-ジオキサン分解能向上の検討 を行った。リン濃度は0.32 g/Lとした。図4に 活性汚泥の 1,4-ジオキサン分解能向上試験での 減少の様子を示す。 図 2 と同様に添加する 1,4-ジオキサン濃度を 2, 20,150,300 mg/L と濃くすると,徐々にその減 少速度は速くなった。リン濃度を 0.32 g/L とし て試験を行ったため,図 2 に比べ減少速度の増 加が速く,試験開始時に減少速度 0.95 mg/L/day であった汚泥が 87 日後には 150 mg/L/day とな り,分解能を 157 倍まで増加することができた。



# 3.5 活性汚泥保存条件の検討

表 4 に室温 25℃と冷蔵 5℃で保存した活性汚 泥の 1,4-ジオキサン分解能の保存率を示す。

室温 25℃で保存した活性汚泥の保存率は,4 日後で 63%と1,4-ジオキサン分解能の低下が速 く,12日後には13%まで低下した。冷蔵5℃の 保存では,7日後に保存率91%と1,4-ジオキサン 分解能の低下は遅くなっているが,28日後には 13%まで低下しており,長期の保存はできなか った。

表 5 に冷凍-85℃で保存した活性汚泥の

1,4-ジオキサン分解能の保存率を示す。

冷凍-85℃で保存した活性汚泥は、グリセリ ンの有無に関わらず、560 日間の保存期間を経 ても保存率 92~104%を維持しており、容易に 長期保存できることがわかった。冷凍による脱 水を防ぐために添加したグリセリンが必要ない 結果となったが、グリセリン濃度に応じて、活 性汚泥の性状は、脱水作用により泥状から砂状 へと変化しているため、保存試験を継続して行 い、グリセリンの必要性を評価する予定である。

表 4 🗄	室温 25℃と冷蔵	5℃での	1.4-ジオキサ	ン分解能の保存率
-------	-----------	------	----------	----------

保存温度	0	4	7	12	21	28	[day]
室温 25℃	100	63	23	13			[%]
_ 冷蔵 5℃	100	97	91	62	23	13	_

	表 5	冷凍-85℃での 1	1.4-ジオ	-キサン	ノ分解能の	保存率
--	-----	------------	--------	------	-------	-----

がリセリン濃度	0	1	7	30	92	182	271	361	455	560	[day]
0%	100	107	98	98	101	100	105	100	99	104	[%]
30%	100	110	110	108	107	121	110	109	121	103	
50%	100	110	100	99	101	105	98	101	91	92	_

# 4. まとめ

1,4-ジオキサン分解能を有する活性汚泥に,高 濃度の 1,4-ジオキサンを添加し, 好気条件下で 撹拌することでその分解能は徐々に向上した。 さらにリン酸を添加することにより分解能の増 加は速まり、87日間の試験で分解能を157倍ま で高めることができた。また,活性汚泥の保存 の検討では、遠心分離後-85℃での冷凍保存に より,活性をほぼ100%維持したまま,1年半以 上の保存が可能であることがわかった。これら の検討により, 廃水処理施設で不測の事態が生 じた際にも、1,4-ジオキサン分解活性を復活させ る対応がとれるようになったことになる。実際 に平成24年4月に廃水処理施設の1,4-ジオキサ ン除去率が低下した際には、生物処理槽内にお いて1,4-ジオキサン分解能向上試験を行い,1,4-ジオキサン活性を復活させることに成功してお り<sup>14)</sup>,実効性のある手法であると考えている。

ただし、図4のような試験により、高濃度1,4-ジオキサンで分解能を向上させた活性汚泥の細 菌叢を解析すると、1,4-ジオキサン分解菌のう ち、Afipia 属だけが急激に増加し、実際の廃水 処理施設で優占度が高い Mycobacterium 属は数 倍にしか増加していないことも判明している<sup>13)</sup>。 今後は、実際の廃水処理施設での処理効率に大 きく寄与する 1,4-ジオキサン分解菌を見極め、 より効率の良い手法を模索する予定である。

#### 参考文献

- 環境省環境保健部環境リスク評価室:化学物 質の環境リスク評価 第2巻,2003,150.
- 2) 牧野良次,蒲生昌志,佐藤修之,中西準子: 1,4-ジオキサンの下水処理場における除去率 について,水環境学会誌,28,3,2005,211-215.
- 3)高木総吉,宮野啓一,小泉義彦,安達史恵, 渡邊功,織田肇:大阪府内水道水源および淀 川水系における 1,4-ジオキサンレベルの実態 調査,環境化学,16,4,2006,669-676.
- 4) 小林貴司,小川千春,菅原剛,八柳潤:1,4-ジオキサンを含む埋立処分場浸出水の効率的

な処理に関する検討,第47回日本水環境学会 講演集,2013,623

- 5)小林貴司,小川千春,菅原剛,八柳潤:1,4-ジオキサンを含む埋立処分場地下水等の効率 的な処理に関する検討,秋田県健康環境セン ター年報,2012,79-84.
- 6)小林貴司,岡野邦宏,菅原剛,宮田直幸:1,4-ジオキサン分解能を有する活性汚泥の評価方法の検討,第48回日本水環境学会講演集,2014,596
- 7)小川千春,小林貴司:新規制物質1,4-ジオキ サンの固相抽出及びヘッドスペース分析法の 検討,秋田県健康環境センター年報,2010, 77-80.
- 小川千春,小林貴司,木口倫:ヘッドスペース GC/MS 法による水中1,4-ジオキサン分析方法の検討,第 21 回環境化学討論会,2012,697-698.
- Bernhardt D., Diekmann H. : Degradation of dioxane tetrahydrofuran and other cyclic ethers by an environmental *Rhodococcus* strain, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **36**, 1, 1991, 120-123
- 10) Parales R.E., Adamus J.E., White N., May H.D.
  : Degradation of 1,4-dioxane by an actinomycete in pure culture, *Applied and Environmental Microbiology*, **60**, 12, 1994, 4527-4530,
- 三好益美,藤田久雄:1,4-ジオキサンの生物 学的処理特性,香川県環境保健センター所 報,8,2009,138-141
- 12) Sei K.,Kakinoki T.,Inoue D.,Soda S.,Fujita M., Ike M. : Evaluation of the biodegradation potential of 1,4-dioxane in river ,soil and activated sludge samples, *Biodegradation*, 21, 2010,585-591
- 13) 岡野邦宏,小林貴司,宮田直幸,尾崎保夫 :1,4-ジオキサンを含む埋立浸出水の生物処理 における細菌叢解析第48回日本水環境学会 講演集,2014,66
- 14) 菅原剛,小林貴司,小川千春,八柳潤: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,第 23 回環境化学討論会,2014,507-508

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 25~27 年度)

# 玉川上流部で実施した中和実証試験の結果の検討

# 生魚利治 鈴木純恵

玉川上流部において, pH 目標値を設定した地点の pH を上昇させ保持する方法の検討と,中和材投入中の各調査地点で起きる水質変化の把握を目的に,中和材の連続投入を行う中和実証試験を平成 25 年度から 27 年度にかけて計 4 回実施した。その結果, pH を 5 付近まで上昇させ保持すること,及び PP 酸度量を減少させることが可能であった。また,実証試験前の PP 酸度量の推移とは異なり,実証 試験中は PP 酸度減少量が流下に伴い小さくなる傾向が見られたことから,4 時間程度の中和材投入で は,河川を流下する間に何らかの要因で河川中のアルカリ分が消費されていることが考えられた。

#### 1. はじめに

秋田県仙北市の中程に位置する田沢湖は,電 源開発と農業用水利用を目的として,昭和 15 年に強酸性の玉川温泉水が流入する玉川の水を 導水したことから,酸性湖沼となった。平成元 年には,玉川温泉付近に玉川酸性水中和処理施 設(中和処理施設)が建設され,温泉水の大部 分が中和処理されたことにより,田沢湖の pH (図1)は改善傾向を示した。しかし,平成14 年頃から玉川温泉水の酸度上昇等の水質変化が 観測され,中和処理施設では石灰石の投入量を 増加し,放流水のpHを3.5に維持したものの, 田沢湖の pH は平成12年の5.7 から低下した。 近年の pH は,およそ5.2 と水質管理基準である 6.0 は達成されていない状況にある。



本研究では、玉川温泉水の水質変化に対する 水質改善方法を検討するため、玉川上流部にお いて追加的に中和材の連続投入を行う中和実証 試験(実証試験)を、平成25年度から27年度 にかけて計4回実施した。本報では、pH目標設 定地点において目標 pHまで上昇させ保持する 方法の検討と、中和材投入中の各調査地点の水 質変化について報告する。また,溶存する鉄及 びアルミニウムが流域の水質に影響を与えると 考えられることから,両元素の酸性水中での挙 動を把握するために室内実験を行い,この結果 を踏まえて実証試験結果の考察を行った。

# 2. 方法

# 2.1 鉄及びアルミニウムの酸性水中での挙動

1mM HCl 溶液のみ, 1mM HCl 溶液中の2価 鉄,3価鉄及びアルミニウムがそれぞれ0.3mM となるように4種類の溶液を作成した。各溶液 300 mL を,フェノールフタレイン(PP)酸度と 同様に pH が 8.3 となるまで0.1M NaOH 溶液で 滴定し,水酸化物イオン(OH<sup>-</sup>)添加量と pH の関係を調べた。

#### 2.2 実証試験

実証試験は、玉川温泉から玉川ダム流入前ま での玉川上流部(図 2)において実施した。水 量への影響を考慮し、前日にまとまった降雨が 無かった平成 25年10月2日(第1回),平成 25年10月23日(第2回),平成26年10月2 日(第3回)及び平成27年9月9日(第4回) に行った。中和材には、乳化液状にした酸化カ ルシウム(CaO)を用いた。中和材の投入は、 玉川温泉水の一部が中和処理施設を経由せず支 川を経由して渋黒川に流入する地点の直下にお いて、約4時間連続して行った。中和材投入効 果の調査地点は、図2に示す①~⑤の5地点と した。試験回毎に、河川のpH目標設定地点及 びpH目標値を設定した。pH目標値に対応する



図2 玉川上流部の調査地点概略図

表1 各実証試験の目標設定地点, pH 目標値, 及び中和材投入量

実証試験回	第1回	第2回	第3回	第4回
実証試験日	H25.10.2	H25.10.23	H26.10.2	H27.9.9
目標設定地点	1	1	2	2
pH目標値	7±1.0	5±0.5	4.8以上	5.0
中和材投入量 (kg/min)	3.3 <b>~</b> 3.5	3.2	5.0 <b>~</b> 5.5	5.0 <b>~</b> 5.2

量の中和材を投入した(表1)。

調査項目は, pH, 流量, 全鉄(T-Fe)量, 溶 存態鉄(d-Fe)量, 懸濁態鉄(p-Fe)量, 全ア ルミニウム(T-Al)量, 溶存態アルミニウム(d-Al) 量, 懸濁態アルミニウム(p-Al)量, PP 酸度量 とした。なお, 第2回試験の, PP 酸度量の調査 は行っていない。

pHは,各調査地点にてメモリー機能付きポー タブル pH メーター (IM-32P 東亜ディーケー ケー)を用いて連続測定を行った。流量は、実 証試験当日に各調査地点で2回ずつ測定し、そ の平均値を地点流量とした。各態の鉄量、各態 のアルミニウム量及び PP 酸度量は、各調査地 点で採水したものを実験室に搬入し、各濃度を 測定後に流量との積から算出した。採水回数は, 鉄及びアルミニウムは、中和材投入前及び pH 上昇開始2時間後の計2回とし, PP 酸度は中和 材投入前及び各地点の pH 上昇開始後 1, 2, 3 時間の計4回とした。鉄及びアルミニウム分析 用の試料は、採水直後に 0.2µm メンブランフィ ルターによりろ過を行う試料の他に、ろ過を行 わない試料の2種類を用意した。いずれも、採 水直後に試料100に対し1の割合で濃塩酸を添 加した。ろ過を行わない試料の分析結果を全量 態とし,ろ過試料の分析結果を溶存態とした。 また,全量態と溶存態の差を懸濁態とした。鉄 及びアルミニウム濃度は,JIS K 0102 (2013) に従い ICP 発光分析法 (iCAP-6300 Thermo) を 用いて測定した。PP 酸度は,JIS K 0101 に記さ れている滴定法 (pH8.3)を用いて測定し,結果 の表記は酸化カルシウム消費量 (CaO kg/hr)換 算とした。

### 3. 結果

# 3.1 鉄及びアルミニウムの酸性水中での挙動 (図3)

pH8.3 まで上昇させるために必要な OH<sup>-</sup>添加 量は, 1mM HCl 溶液に比較し, 2 価鉄, 3 価鉄 及びアルミニウムを含む溶液が大きくなった。2 価及び 3 価の鉄を含む溶液は, OH<sup>-</sup>の添加開始 直後から pH の上昇が緩やかであった。一方, アルミニウムを含む溶液は, pH4.0 付近から pH の上昇が緩やかになり, pH4.5 から 5.5 の間の OH<sup>-</sup>添加量が大きくなった。



# 3.2 実証試験

## 3.2.1 pH (図 4)

第1回試験(目標:地点①, pH 7±1.0)は, 経時的な変動が大きく pH 5.0~8.9 の範囲であ った。第2回試験(目標:地点①, pH 5±0.5) は, pH 4.3~6.0 の範囲であり,瞬間的に目標 値の範囲を超えることはあったが,概ね pH 5.2 で推移した。第3回試験(目標:地点②, pH 4.8 以上)は,試験開始直後に瞬間的に目標値の範 囲を超えたが,概ね pH 4.0~4.6 で推移した。 第4回試験(目標:地点②, pH 5)は,概ね pH5.0 で推移した。



表 2 各地点における試験開始前及び 3h 後の pH 及び pH の上昇幅

	第1回試	、験(H2	25.10.2)	第2回試験(H25.10.23)			第3回試験(H26.10.2)			第4回試験(H27.9.9)		
地点No.	開始前	3h後	上昇幅	開始前	3h後	上昇幅	開始前	3h後	上昇幅	開始前	3h後	上昇幅
1	2.7	7.6	4.9	2.7	5.4	2.7	2.4	10.0	7.6	2.4	5.7	3.3
2	2.9	4.5	1.6	3.0	4.2	1.2	2.6	4.6	2.0	2.8	4.9	2.1
3	3.1	3.5	0.4	3.1	3.5	0.4	2.7	3.0	0.3	2.9	3.9	1.0
<b>(4</b> )	3.4	3.6	0.2	3.4	3.8	0.4	3.0	3.1	0.1	3.1	3.7	0.6
(5)	3.7	4.1	0.4	3.8	4.1	0.3	3.5	3.8	0.3	3.9	4.6	0.7

また,各地点における実証試験開始前及び開 始後3時間のpH及びpHの上昇幅を表2に示す。 いずれの試験においても下流の地点ほど pH の 上昇幅が小さくなる傾向が見られた。

# 3.2.2 PP 酸度量 (図 5)

PP 酸度量は、いずれの地点においても実証試 験開始前に比較して減少した。また、各地点に おける実証試験中の3回の測定結果は、ほぼ同 様の値を示した。

# 3.2.3 鉄量(図6)

実証試験開始前の T-Fe 量に占める各態の鉄の割合は,各地点とも d-Fe 量が大きく,それに比較し p-Fe 量は小さかった。各回の 2h 後の鉄量は,実証試験開始前に比較し地点①及び②において,T-Fe 量に大きな変化は見られないが,

**d-Fe** 量が減少し **p-Fe** 量が増加する傾向が見ら れた。特に第1,3及び4回試験では,地点①で ほぼ全量が **p-Fe** となった。また,各回において 地点③以降では,**T-Fe** 量が減少し,各態鉄の割 合は **d-Fe** 量が減少し **p-Fe** 量が増加する傾向が 見られた。

#### 3.2.4 アルミニウム量 (図7)

実証試験開始前の T-Al 量に占める各態のア ルミニウムの割合は,各地点ともd-Al 量が占め, p-Al 量はほぼ存在しなかった。各回の 2h 後の 各態のアルミニウム量では,実証試験開始前に 比較し地点①及び②において,T-Al 量に大きな 変化はみられないが,d-Al 量が減少し p-Al 量が 増加する傾向が見られた。しかし,地点③より 下流の調査地点では T-Al 量, d-Al 量及び p-Al 量のいずれにも大きな変化は見られなかった。


#### 4. 考察

4.1 鉄及びアルミニウムの酸性条件下での挙動 水酸化鉄及び水酸化アルミニウムは、その溶 解度積が求められており、pHによって飽和濃度 が決定される。本報では、次式<sup>1)</sup>に示す溶解度 積を用いて検証を行った。なお、温度による溶 解度積の変化は考慮に入れていない。

 $\begin{aligned} & \text{Fe(OH)}_2 \quad \text{K}_{\text{sp}} = 1.6 \ \times \ 10^{-14} \\ & \text{Fe(OH)}_3 \quad \text{K}_{\text{sp}} = 1.1 \ \times \ 10^{-36} \\ & \text{Al(OH)}_3 \quad \text{K}_{\text{sp}} = 1.92 \ \times \ 10^{-32} \end{aligned}$ 

実験により得られた OH<sup>-</sup>添加量と pH の関係 (図 3)では,鉄及びアルミニウムのいずれか を含む溶液が,1mM HCl のみの溶液に比較し pH の上昇を抑制している。また,3 価鉄を含む 溶液の pH は,添加開始時から他の溶液に比較 し低い。これは,3 価鉄が添加開始時点におい て,すでに飽和濃度に達しており,OH<sup>-</sup>を消費 し pH を低下させていたと考えられる。2 価鉄を 含む溶液では,溶解度積から算出した2 価鉄の



0.3mM が飽和となる pH はおよそ 8.4 であり, この pH8.4 までは 1mM HCl のみの溶液と同様 の挙動になると考えられたが,実際には pH の 上昇が抑えられていた。これは,滴定中に2価 鉄の一部が酸化され3価鉄となり OH<sup>-</sup>を消費し たためであると考えられる。また,アルミニウ ムは,pH4.0 から 5.5 の間の上昇が抑制されてい る。これは,溶解度積から算出したアルミニウ ム 0.3 mM が飽和となる pH はおよそ 4.3 であり, 99 %以上が水酸化アルミニウムとなる pH はお よそ 5.3 であることを,反映したものであると 考えられる。

#### 4.2 実証試験

#### 4.2.1 pHの経時変化について

第1回試験のpH目標地点①でのpH経時変化 は、変動が大きくなったが、この地点の鉄及び アルミニウムは,ほぼ全量が懸濁態となった(図 6,7)。これは、pH目標値の7.0±1.0が、鉄及 びアルミニウムが OH<sup>-</sup>を消費する範囲の外(図 3)にあったことから,中和材投入量の少量の変 化でも pHの変動が大きくなったと考えられる。 一方,第 2~4回調査における pH 経時変化は, 概ね安定した pH 推移を示した。これは,図 7 が示すように pH 目標設定地点とした第 2回調 査の地点①,第3及び第4回調査の地点②にお いて,実証試験開始前に T-Al 量のほぼ全量を占 めていた d-Al が,試験中は全量ではなく一部の みが p-Al となっており,溶存するアルミニウム によって pH 上昇が抑制される範囲に入ってい たため,中和材投入量の少量の変化が pH の変 化に反映され難かったと考えられる。

以上のことから,目標 pH が 5.0 付近の場合は, pH を安定して保持することは可能であったが, 溶存するアルミニウムの作用によると考えられ たことから,実際に中和が安定して行えている かの判断は, pH では困難であると考えられた。 このため, PP 酸度を用いた検証を行った。

#### 4.2.2 PP 酸度による投入効果の検証

PP 酸度量は,実証試験開始前に比較して各回 各地点とも減少し,実証試験中の3回の測定結 果は、ほぼ同様の値を示した(図 5)。この結 果から,投入時間中は安定して河川中の PP 酸 度量を減少させることが可能であったと考えら れる。この中和材投入による PP 酸度の減少効 果を把握するため、中和材の投入量と PP 酸度 減少量の比較を行った(図8)。PP酸度減少量 の算出は,試験開始前の PP 酸度量から試験中3 回 PP 酸度量の平均値を減算し求めた。各回の 試験中の PP 酸度減少量は,投入地点付近の地 点①及び②では,投入した中和材の量の1時間 値とほぼ同一の値を示し、投入した中和材のほ ぼ全量が PP 酸度量を減少させる働きをするこ とが明らかとなった。しかし、この中和材投入 量に応じた PP 酸度減少量は、流下しても変わ らないと考えられたが、結果は下流の地点ほど 小さくなる傾向を示した。また、各地点におけ る pH の上昇幅(表 2) でも同様に下流の地点ほ ど小さくなる傾向を示した。一方,各回の試験 開始前、すなわち中和処理施設のみが稼働する 平常時の PP 酸度量は、下流の地点ほど小さい 値となる(図 5)。このことから、中和処理施 設から恒常的に供給されるアルカリは,流下に



伴い消費されることはない。実証試験の PP 酸 度減少量が下流の地点ほど小さくなる傾向は, 中和材投入が4時間程度では短いため,何らか の要因によってアルカリ分が消費されているこ とが考えられる。この要因には,実証試験中の 河川水と河床の間に pH 及び酸度の勾配が発生 し,平衡化のために河床が河川中のアルカリを 消費することなどが推測されるが,解明は今後 の課題である。

# 4.2.3 鉄及びアルミニウムの流下に伴う挙動に ついて

各回の実証試験中に地点①及び②で観測され た d-Al から p-Al への変化は,地点③以降では ほとんど観測されていない(図 7)。また,T-Al 量は,ほとんどの地点において実証試験前と実 証試験中で大きな差異が見られないことから, 地点①及び②で OH<sup>-</sup>と結合し p-Al となった後 に,地点②以降の流域で再溶解していると考え られる。このアルミニウムが再溶解する要因は, 河川の pH が低下し,その時点でのアルミニウ ムの飽和濃度を下回ったことによると考えられ る。この河川 pH が低下する要因には,次の 2 つの要因が考えられる。一つは,前述の流下中 にアルカリ分が消費されることであり,もう一 つは,流下中の鉄の2価から3価へ酸化である。 鉄は,ほぼ全量が2価鉄の形態で玉川温泉から 湧出<sup>2)</sup>する。この2価鉄の形態では,その溶解 度積の関係から,玉川上流部のpHではOH<sup>-</sup>を 消費しない。しかし2価鉄は,化学酸化や玉川 上流部において生息が確認されている鉄酸化細 菌<sup>3)</sup>の活動によって,流域内で2価から3価へ と酸化される。3価鉄は,玉川上流部のpHでも OH<sup>-</sup>を消費し水酸化鉄を生成するため,玉川の pHが低下する。このような機構によるpH低下 のため,水酸化アルミニウムは再溶解すると考 えられる。

また、実証試験開始前の d-Fe 量及び d-Al 量 は,各地点間で比較すると,下流の地点ほど低 い値を示す。河川中の d-Fe の一部は、 pH の上 昇とともに OH-を消費し, 水酸化鉄の沈澱物の 形成等により玉川河川中から流出・減少すると 考えられる。一方, d-Al は, 玉川上流部の pH 領域では,溶解度積との関係から水酸化物の沈 殿物としては流出しない。このため、実証試験 開始前の d-A1 量が下流の地点ほど低い値を示 すことは,水中のOH-を消費する水酸化アルミ ニウムの生成とは別の機構によるものと考えら れる。また, PP 酸度量の中には, 図3 が示すよ うに d-Fe 量及び d-Al 量が消費する分の OH<sup>-</sup>量 が含まれる。前述した, 恒常的な中和処理時を 反映する実証試験開始前の PP 酸度量が下流の 地点ほど小さくなる傾向には, d-Al 量が水酸化 アルミニウムの生成とは別の機構によって減少 したことによって、d-Al 量分が消費する OH-量も減少することが関与すると考えられる。

このことから,より効率的に玉川上流部の PP 酸度量を減少させるためには,流域内において, 水酸化アルミニウムの生成とは別の機構による d-Al量の減少を促進させる方法が1つとして考 えられる。このために必要な河川中の条件の把 握については,今後の課題である。

#### 5. まとめ

田沢湖を含む玉川上流部の水質改善方法を検 討するため、玉川上流部において追加的に中和 材の連続投入を行う中和実証試験を実施した。 この結果,pH 目標値を設定した地点における pH を上昇させ保持する技術の確立については, 目標とした pH が 5.0 付近であれば保持すること は可能であったが,溶存するアルミニウムが関 与することから,中和効果の判断をする項目は, pHではなく PP 酸度量で行う必要があることが 明らかとなった。

各地点の PP 酸度量は、いずれも中和開始前 に比較し減少し、実証試験中は安定して PP 酸 度量を減少させることが可能であったと考えら れた。また,投入した中和材の量と試験中地点 ①及び②の PP 酸度減少量がほぼ同一の値を示 し、投入した中和材量のほぼ全量が PP 酸度の 減少に寄与することが明らかになった。この PP 酸度減少量は、下流の地点ほど投入量よりも小 さくなる傾向を示したが、これは、4 時間程度 の中和材投入では,河川を流下する間に何らか の要因で河川中のアルカリ分が消費されている ことが考えられた。また,実証試験開始前の流 域では, d-Al量は下流の地点ほど低い値を示し, このことは,水酸化アルミニウムの生成とは別 の機構による減少と考えられた。より効率的に 玉川上流部の PP 酸度量を減少させるためには, 流域内において, d-Al 量の水酸化アルミニウム 生成以外の減少を促進させることが、方法の1 つとして考えられた。

今後,玉川上流域及び田沢湖において,追加 的な中和材投入によって水質改善を考える場合 には,減少させなければならない PP 酸度量を把 握することが課題となる。

#### 参考文献

- 大木道則,大沢利昭,田中元治,千原秀明
   (編):化学事典,東京化学同人,1994.
- 2)後藤達夫:世界的にみて最も大規模な火山性 強塩酸酸性泉の玉川温泉の水質特徴ならびに 玉川の水質改善効果について(1),水,45,13, 2003,61-68.
- 3) 大原典子,和田佳久,成田修司,八柳潤,布 田潔:玉川温泉下流域における鉄酸化細菌の生 息分布,水環境学会誌,32,1,2009,29-32.

# IV 発表業績

#### 1. 学会発表

# 食品のウイルス検査法における捕捉抗体の 供給源に関する研究

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

# 第 25 回秋田応用生命科学研究会 2015 年 6 月 秋田市

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 で用いてきた医療用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。一方で, 薬事法に定めのある特定生物由来製品に該当す ることから使用者義務が課せられ、計画生産品 であることから流通量に上限があり, 当然のご とく医療目的での使用が優先される。さらに, 医薬品であることから, 医療機関ではない試験 検査機関で用いるのは難しい。そこで、本研究 では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いる。

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,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 いた系は医療用のそれ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 大変合理的であり,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た。

\*1: 堺市衛生研究所

\*2:国立医薬品食品衛生研究所

# 紅斑熱群リケッチア症とつつが虫病, 抗体 検査における抗原最適化とその効果

佐藤寬子,藤田博己\*1,2,村井博宣\*3

# The 23th Seminar on Acari-Disease Interface 2015 年 6 月 名取市

1992年4月~2011年3月までに、発熱、発疹、 CRP(+)であり、かつ刺し口の存在や肝機能 異常などの症状があった例のうち、当時つつが 虫病抗体陰性と判定されていた 123 例 197 検体 (急性期血清 123 検体,回復期血清 74 検体)に ついて, IP 法により紅斑熱群リケッチア症およ びつつが虫病の抗体検査を実施した。抗原とし て使用した分離株は、紅斑熱群は LON-1, Sendai-16, IM-1 株, つつが虫病は, 血清型 Kato の株の他、当時使用していない血清型 Irie/Kawasaki, Hirano/Kuroki 型および Shimokoshiの株と遺伝子型 JG, JP-1の株,計6 株を使用した。加えて発疹熱、野兎病の抗体検 査および HHV-6, HHV-7, EBV, CMV, HSV-1 および Parbo B19 についても検索した。その結 果,123 例中,紅斑熱群リケッチア症疑い例が1 例, つつが虫病抗体陽性が 14 例(Karp型(JP-1) 10 例, Shimokoshi 型が 3 例, Gilliam 型 (JG) が1例)確認された。また、10例から発疹症ウ イルスが検出された(EBV:6例, HSV-1:2例, HHV-7:1例, CMV+EBV+HSV-1:1例)。野 兎病と発疹熱の抗体陽性例はなかった。

秋田県において初めて紅斑熱群リケッチア症 患者の存在が確認された。また,つつが虫病に おいては,国外分離株が標準とされていること で当時陰性と判定されていた患者がいたものと 推察される。より早期の抗体検出と確実な検査 診断のため,今後つつが虫病における「標準」 は「国内標準」とすることが望ましいと思われ る。また,ウイルスが複数検出されたが,これ は潜在していたウイルスが再活性化したものと 推察され,これらが症状を複雑化し,診断がよ り困難となっていたと考えられた。

\*1:馬原アカリ医学研究所

\*3:泉皮膚科クリニック

<sup>\*2 :</sup> MFSS

# 高齢者福祉施設等における結核対応ガイド ブック作成のためのインタビュー調査結果

#### 田中貴子

# 第 64 回東北公衆衛生学会 2015 年 7 月 秋田市

# 高齢者福祉施設等における結核対応に関す るインタビュー調査結果

田中貴子

### 第 74 回日本公衆衛生学会総会 2015 年 11 月 長崎市

秋田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。

対象: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及び老人保健施設(以下, 施設),通所介護事業所(以下,事業所)の10 か所。回答者は施設長,看護師長,管理者(介 護支援専門員)等。方法:平成26年12月~平 成27年2月に,対象施設にて約90分のインタ ビュー調査を実施した。項目は,結核患者発生 時の不安,平常時の結核の意識や結核情報,施 設及び事業所における結核マニュアルの有無等 36項目であった。

結核患者発生時の不安は,結核の知識や理解 不足による日常的な食器消毒,衣類・寝具の洗 濯,家族への連絡等であった。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 に乏しい職員もいて対応に困った。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 に困惑した施設もあった。また,利用者や職員 の結核への偏見があり,風評被害の対応に苦慮 した事業所もあったが,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。他方で保健所の役割を知らない事業所もあった。平常時の結核の意識や結核情報では,普 段は結核を考えることがなく研修の機会もない という施設や,ネットでの情報量がありすぎて 結核の正しい情報を得るのが困難だという事業 所もあった。施設及び事業所における結核マニ ュアルの有無については,結核単独のものを保 有している所は2か所であったが1か所は古い 内容であった。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おり, その内容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。入所施設や通所事業所等の介護福祉現場に おいては結核に関する知識や理解が十分でない ことが明らかになった。特に最近増加している 通所介護事業所においてはその傾向が顕著であ り,今後の結核対策の課題とも考えられた。

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>\*2,3</sup> 安藤匡子<sup>\*4</sup>,門馬直太<sup>\*5</sup>

# 第 64 回東北公衆衛生学会 2015 年 7 月 秋田市

強毒性とされる Kato 型の野鼠由来 Kakuma-2 株(強毒型株)および弱毒性とされる Shimokoshi 型の患者由来 Matsui 株 (弱毒型株)を使用し致 死毒性の確認と共にマウスの血中 Ot コピー数 を経時的に定量した。両株は、1.0E7 および 1.0E5copies/ml に調製後, 各株各濃度 100 µ1 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,マウス尾静脈 採血を1日1回8日間,9日目以降は1~2日毎 に行った。マウス血液は DNA 抽出後, Real-time PCR により Ot コピー数を定量し各群の 1 ml 当 たりに換算した平均値を求めた。同様に 2011 年~2013 年に本県で発生したつつが虫病患者 26 例について急性期血液中の Ot のコピー数を 定量し、比較検討を行った。

強毒型の接種系における Ot 検出開始は, A 群 が接種後1日目(6.5E3), B 群が3日目(1.16E3) 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った。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(1.1E4), B 群が 5 日目(3.1E3) であったが,その後コピー数に顕著な増加はな く,マウスは 1ヶ月以上生存した。C 群と D 群 も同様に強毒型株と弱毒型株を接種したとこ ろ,両群は共に死亡したが,死亡時の Ot コピー 数は,A 群 B 群に比較して Kakuma-2 株が約 10 倍, Matsui 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の増殖が急 激であることから,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。

患者血液から検出された 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)は,共に平均値は1.1E4 であった。一方, DIC 併発/治療前例(同4.0日) は平均値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,同じ血 清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,重症化防止のためには,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。

- \*1:静岡県環境衛生科学研究所
- \*2:馬原アカリ医学研究所
- \*3 : MFSS
- \*4:鹿児島大学共同獣医学部
- \*5:福島県衛生研究所

食品検体の病原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 110 回日本食品衛生学会学術講演会 2015 年 10 月 京都市 パンソルビン・トラップ法は、食品検体から ノロウイルス(NoV)に代表される病原ウイル ス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、試験研究用等のガ 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 11 種類の病原ウイルスについて食品洗滌 液からの回収を試みたところ、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,野田 衛\*1

第 36 回日本食品微生物学会学術総会 2015 年 11 月 横浜市

パンソルビン・トラップ法は、食品検体から 病原ウイルスを検出するために開発された実践 的な手法である。パントラ法にはウイルス粒子 の回収に黄色ブドウ球菌(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、ノロウイルス (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。一方、サポウイル ス(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, パントラ法 で用いるには,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ことを目的としてい 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, 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℃ に設定したところ,パントラ法抽出物存在下で も、蒸留水による希釈系列と同様に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<sup>-5</sup> 希釈まで検出できるようになっ た。さらに、SaV-GII、GIV、GV においても有 効であることを確認した。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。

\*1:国立医薬品食品衛生研究所

# 食品のウイルス検査における偽陽性防止対 策に関する検討

秋野和華子,斎藤博之,野田 衛\*1

第 36 回日本食品微生物学会学術総会 2015 年 11 月 横浜市 パンソルビン・トラップ法は、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。一方、 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、偽陽性防 止対策の強化が必要とされた。本研究では、問 題 解 決 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について検討 した。

ブロッコリー遺伝子の 1st. PCR の反応液に dUNG を添加することで,104 コピー/20  $\mu$ Lに 相当する,TをUに置換した PCR 産物を分解除 去できた。2nd. PCR に real-time PCR を用いた場 合の検討では,検出限界濃度 ( $10^1 \sim 10^2$  コピー /20  $\mu$ L) における Ct 値は 6.2 サイクルであっ た。同様に,  $10^3$  コピー/g の NoV を含むカキ中 腸腺では  $13 \sim 14$  サイクル, 35 コピー/g の NoV で汚染させた焼きそばでは 17 サイクルで増幅 カーブが立ち上がった。以上のことから, 1st.PCR 時のキャリーオーバーは UNG を用い て無効化し, 2nd. PCR に real-time PCR を用い て、Ct 値を基準に陽性判定をする (20 サイクル を目途とする) 方法が推奨できるものと考えら れた。

\*1:国立医薬品食品衛生研究所

Optimization of RT-PCR to detect Sapovirus RNA recovered by PANtrap method

斎藤博之,秋野和華子,野田 衛\*1

第63回日本ウイルス学会学術集会2015年11月 福岡市

パンソルビン・トラップ法は、食品検体から ノロウイルス(NoV)を検出するための実践的 な手法として開発されたが、NoVと並んで食中 毒原因物質とされているサポウイルス(SaV) にも適用することができる。本法はウイルス粒 子の回収に黄色ブドウ球菌(ブ菌)を用いてい ることから,得られた RNA サンプルに菌由来 の遺伝子が大量に混入するという性質があるも のの,NoV については効率的な RNA 検出系が 確立している。本研究では,パントラ法によっ て得られた SaV-RNA の検出系の最適化を試み た。

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 は原法により 10<sup>-4</sup> 希釈まで 800 bps の増幅バン ドが確認できたが,負荷物質を含む希釈系列で 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<sup>-2</sup> 希釈までしか検出できなかっ 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℃に設定したところ,負 荷物質存在下でも、10<sup>-4</sup>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<sup>5</sup>希釈までSaVのバンドが認め られたが、負荷物質存在下では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<sup>-5</sup> 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。

\*1: 国立医薬品食品衛生研究所

# LNA (Locked Nucleic Acid)修飾プライマー を用いたサポウイルス RNA 検出系の最適化

斎藤博之,秋野和華子,野田 衛\*1

# 第 26 回秋田応用生命科学研究会 2015 年 11 月 秋田市

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として開発されたが,NoV と並んで食中毒原因物質とされているサポウイ ルス(SaV)にも適用することができる。本法 はウイルス粒子の回収に黄色ブドウ球菌(ブ菌) を用いていることから,得られた RNA サンプ ルに菌由来の遺伝子が大量に混入するという性 質があるものの, NoV については効率的な RNA 検出系が確立している。本研究では,パントラ 法によって得られた SaV-RNA の検出系の最適 化を試みた。

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 は原法により 10<sup>-4</sup> 希釈まで 800 bps の増幅バン ドが確認できたが、負荷物質を含む希釈系列で 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<sup>-2</sup> 希釈までしか検出できなかっ 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℃に設定したところ,負 荷物質存在下でも、10<sup>-4</sup>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<sup>-5</sup>希釈までSaVのバンドが認め られたが,負荷物質存在下では 10<sup>-3</sup> 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<sup>-5</sup> 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。

\*1: 国立医薬品食品衛生研究所

#### 秋田県におけるマダニの生息調査(2015)

佐藤寛子,柴田ちひろ,上田里緒奈 上田かおり<sup>\*1</sup>,坂本尚志<sup>\*2</sup>,齊藤志保子

### 第22回リケッチア研究会合同研究発表会 2015年11月 東京都

2014年9月,秋田県において初めて Rickettsia helvetica を保有するヒトツトゲマダニ刺咬症例 が確認された。これを契機に過去(1992年~ 2011年)につつが虫病が疑われて否定された症 例について紅斑熱群リケッチア抗体を検査した ところ,1995年に紅斑熱患者が発生していたこ とが判明した。そこで,県内において今後の患 者発生の危険性を明らかにするため,マダニ類 とマダニ保有リケッチアの調査を行った。

植生上からの採集:秋田駒ヶ岳の中生保内登 山口(2014年の刺咬症例発生地)および大仙市 の丸子川河川敷(1995年発生の感染推定地)で 旗ずり法によるマダニ採集を行った。実施時期 は中生保内が2015年9月上旬,大仙市が7月下 旬,8月上旬,9月上旬および下旬の計5回であ る。大仙市ではマダニの採集数は0であったが, 中生保内ではヤマトマダニが18匹,ヒトツトゲ マダニが1匹,キチマダニ1匹が採集され,こ のうち1匹のヤマトマダニから*R.asiatia*,ヒト ツトゲマダニから*R.helvetica*の遺伝子がそれぞ れ検出された。17kDa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, *R.helvetica*は2014年の刺咬症例のものと系統樹 解析において100%一致した。

大からの採集:2015年3月~6月の間に秋田 市内の動物病院を受診した犬から採集されたの はフタトゲチマダニ2匹,タヌキマダニ1匹, キチマダニ1匹で,このうちタヌキマダニ1匹, *た*の*didatus R.tarasevichiae* が検出された。また, 6月~9月の間に県内で捕獲された放浪犬から フタトゲマダニ3匹,ヤマトマダニ2匹,タネ ガタマダニ1匹が採集され,このうちタネガタ マダニからから *R.monasensis* の遺伝子が検出さ れた。

検出された紅斑熱群リケッチアのうち, R.asiatia を除く3種はヒトに対して病原性があ ることが確認されている。本県において紅斑熱 群リケッチア症は、一般県民はもとより医療機 関においても未だ危機意識が低く患者の潜在が 懸念される。

は,国土交通省玉川酸性水中和処理施設の敷地 内を流れる玉川支川の渋黒川で行った。玉川温 泉由来の未処理強酸成分(pH約2,流量約20,000 L/min) 中和のため、中和材として酸化カルシウ ム(CaO)を乳化状に調整し、渋黒川に投入し た。本試験における平成25年度のpHの改善目 標値は、中和材投入地点から下流約100mの地 点(以降地点 A)で pH(7±1)とした。さらにこ の下流では、約 pH3.5 の中和処理施設放流水が 合流する影響を考慮し, 平成 26 年度は地点 A の 約40m下流(以降地点B)において pH4.8以上 の改善目標値とした。これら試験の結果,H25 年度は地点 A において, 試験前の pH2.7 から pH7.6 に改善した。平成 26 年度は, 地点 A におい て試験前の pH2.3 から pH10.6 まで改善したが地点 B では pH4.5 となり, 目標値である pH4.8 以上を達 成できなかった。また,両年度の最下流部の調査 地点(以降地点 C)における試験中の pH は, それ ぞれ 4.0, 3.8 となり, 地点 A において改善された pH の上昇が、地点 Cにおいては反映されなかった。し かしながら、地点 C における平成 26 年度の試 験中の酸性成分負荷量 110 kg/h (MO 酸度と流 量積から算出)は、平成25年度の値(206 kg/h) と比較し低下していた。以上の結果から, pHの 上昇挙動及び上記負荷量の減少挙動は、必ずし も一致しないことが明らかとなった。

\*1:秋田大学大学院工学資源学研究科
\*2:秋田県立大学生物資源科学部

<sup>\*1</sup>:秋田県動物管理センター <sup>\*2</sup>:さかもと動物病院

#### 玉川酸性水に対する実証的中和の効果

成田修司,布田潔\*1,宮田直幸\*2

### 第 50 回日本水環境学会年会 2016 年 3 月 徳島市

本年会では、平成 25 年 10 月及び平成 26 年 10 月に実施した中和実証試験(以降,本試験) における、下流域の MO 酸度(JIS K0102:pH4.8) の挙動について pH と併せて報告した。本試験

#### 2. 他誌掲載論文等

#### 死亡例を含むA型肝炎の家族内感染事例

斎藤博之,秋野和華子,佐藤寛子 柴田ちひろ,佐藤由衣子,安部真理子 飯塚禮子<sup>\*1</sup>,木内雄<sup>\*2</sup>

# Infectious Agents Surveillance Reports, **36**, No.5, 2015, p15.

A型肝炎の予後は一般に良好であり, 医療体 制の整っている我が国では劇症例・死亡例は稀 であるが,今回死亡例を含む家族内感染事例を 経験したので報告する。5人家族の内,1月13 日に最初の患者が発症し、1~2週間の間隔をお いて次々と発症例がみられた(発症4名、無症 状1名)。その内,50代男性が発症15日後に 急性肝不全で死亡した。民間検査機関において, 無症状者も含めて全員の血清からA型肝炎ウイ ルス(HAV)に対する IgM が検出された。当セ ンターでは,民間検査機関に残存していた血清 を取り寄せて, リアルタイム PCR によるウイル スゲノム RNA の検出を試みたところ、入手で きた3検体から HAV の遺伝子が検出された。 次に semi-nested RT-PCR により,遺伝子断片の 増幅を試みたところ,2検体から615 bpの増幅 断片を得ることができた。両者の塩基配列は完 全に一致しており,分子系統解析では IB 型と分 類された。IB 型は国内では報告が少ないが, 2014 年に千葉県で検出されたウイルスに最も 相同性が高かった。聞き取り調査では、5人と も海外渡航歴は無かった。本事例は、医療機関 から保健所に届け出があったのが初発から一か 月以上経過した3月4日であり,共通食材など の感染ルートを特定することはできなかった。 A型肝炎は感染症法上の全数把握疾患の4類感 染症であり、1 人でも確認したら直ちに保健所 に届け出る必要があることを今一度周知徹底し ておく必要がある。

\*1:秋田県仙北地域振興局福祉環境部

<sup>\*2</sup>:秋田県健康福祉部健康推進課

Development of a practical method to detect noroviruses contamination in composite meals.

> Hiroyuki Saito, Miho Toho<sup>\*1</sup> Tomoyuki Tanaka<sup>\*2</sup>, Mamoru Noda<sup>\*3</sup>

Food and Environmental Virology, **7**, No.3, 2015, 239-248.

Various methods to detect foodborne viruses including norovirus (NoV) in contaminated food have been developed. However, a practical method suitable for routine examination that can be applied for the detection of NoVs in oily, fatty, or emulsive food has not been established. In this study, we developed a new extraction and concentration method for detecting NoVs in contaminated composite meals. We spiked NoV-GI.4 or -GII.4 stool suspension into potato salad and stir-fried noodles. The food samples were suspended in homogenizing buffer and centrifuged to obtain a emulsion. Then. anti-NoV-GI.4 food or anti-NoV-GII.4 rabbit serum raised against recombinant virus-like particles, or commercially available human gamma globulin, and Staphylococcus aureus fixed with formalin as a source of protein A, were added to the food emulsion. NoV-IgG-protein A-containing bacterial complexes were collected by centrifugation, and viral RNA was extracted. The detection limits of NoV RNA were 10-35 copies/g food for spiked NoVs in potato salad and stir-fried noodles. Human gamma globulin could also concentrate other NoV genotypes as well as other foodborne viruses, including sapovirus, hepatitis A virus, and adenovirus. This newly developed method can be used as to identify NoV contamination in composite foods and is also possibly applicable to other foodborne viruses.

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

# カンピロバクターの Penner PCR 型別が有用 であった食中毒疑い事例への対応

今野貴之, 髙橋志保, 樫尾拓子, 熊谷優子 圓子隆信, 袴田知之<sup>\*1</sup>, 金 和浩<sup>\*1</sup>

# Infectious Agents Surveillance Report, **36**, No.8, 2015, 161-162.

2015 (平成 27) 年4月に秋田県内の焼肉店が 原因施設と推定される食中毒疑い事例が発生 し,その事例対応の検査において, PCR型別法 の有用性を示した。

事例は、患者4名で、医療機関からのカンピ ロバクター検出の報告により探知した。保健所 の調査により、患者らが同一焼き肉店を利用し ていたことが判明したことから食中毒を疑い、 従業員の検便4検体、施設の拭き取り10検体に ついて、カンピロバクターを検査した。患者4 名については医療機関においてカンピロバクタ ーがすでに分離されていたことから、菌株の提 供を受け、菌種の確認と血清型別試験を実施し た。

その結果,従業員便,冷蔵庫,まな板,包丁 や食器棚等の拭き取りからはカンピロバクター は検出されなかった。患者から分離されたカン ピロバクターについて,PCR法により菌種の確 認を行ったところ,いずれも*C. jejuni*であった。 血清型別試験においては,Penner法で3名が型 別不能であり,菌株間の関連性について検討す ることができなかった。Lior法では,4株とも 型別可能であり,2名が一致した。PCR型別で は,患者4名由来の菌株はいずれも異なる型に 同定された。

食中毒等の事例対応の検査において,血清型 の同定は疫学的な関連性を推定する上で非常に 重要である。カンピロバクターの Penner PCR 型 別はこれまで問題となっていた Penner 法の型 別率の低さを補うことが可能であり,食中毒等 の事例対応時の疫学解析に寄与するものと考え られる。 Molecular Epidemiology of Monophasic Salmonella enterica serovar 07:-:1, 5 Isolates in Akita Prefecture, Japan

> Takayuki Konno, Shiho Takahashi Yuko Kumagai

Jpn J Infect Dis, 69, No.2, 2016, 161-163.

A total of 37 Salmonella strains were collected from medical institutions in Akita prefecture, Japan, in 2010, 4 of which were serotyped O7:-:1,5 by standard serological typing procedures. The frequent isolation of the O7:-:1,5 strains raised the question of their phylogenetic origin. Among Salmonella O7 group, S. Infantis (O7:r:1,5), Thompson (O7:k:1,5), and Bareilly (O7:y:1,5) have been often isolated in Akita prefecture. S. Paratyphi C and S. Choleraesuis (O7:c:1,5) have been rarely isolated from diarrheal patients in Akita prefecture, but it have higher mortality rates in humans than other Salmonella serotypes. Therefore, we designed four primers targeting the central variable regions of the phase 1 flagellin (H1) gene, *fliC*, to detect H1 antigen, 'c', 'r', 'k' and 'y'.

We could successfully serotyped the O7:-:1,5 strains as *S*. Thompson by PCR-based serotyping, and PFGE analyses indicated that these isolates were derived from *S*. Thompson isolates from North area of Akita prefecture. It will be concerned for public health whether the isolation of such atypical monophasic variants increases or not. The PCR-based serotyping is useful for the surveillance of *Salmonella* infections by atypical monophasic variants as complementary tool of the classical serological typing.

\*1:秋田県北秋田保健所

# 秋田県健康環境センター年報

第11号 2015

発行日 平成28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