

IV 発表業績

1. 学会発表

秋田県の男性泌尿器科受診者における尿中 HPV 検出状況

柴田ちひろ, 佐藤寛子, 斎藤博之
安部真理子, 千葉真知子, 能登 舞^{*1}
能登 彩^{*2} 能登宏光^{*3}

第 35 回秋田県医学検査学会
2011 年 10 月, 横手市

ヒトパピローマウイルス (HPV) は子宮頸がんの原因ウイルスとして知られているが, 男性の尿路・性器がんへの関与も指摘されている。しかし, 男性の HPV 感染状況については女性ほど研究が進んでおらず, その実態はほとんど分かっていない。そこで, 秋田県内の泌尿器科受診者を対象に男性における HPV 感染状況について調査した。

平成 21 年 6 月～平成 22 年 5 月に秋田泌尿器科クリニックを受診した尿路・性器感染症の自覚症状のある患者 103 名, 自覚症状の無い患者 13 名の計 120 名を対象に, インフォームドコンセントを得た上で初尿検体を採取した。検査は, 検体から DNA を抽出した後, 内部標準物質である β -globin が検出された場合のみを有効検体として nested-PCR による HPV の検出を行った。HPV 陽性検体はダイレクトシーケンスにより genotype を判定した。

120 検体中, β -globin が検出された有効検体は 98 検体であった。このうち HPV は 8 検体から検出され (検出率 8.2%), いずれも自覚症状のある患者から検出された。Genotype はハイリスク型が 6 例 (16 型 2 例, 18 型 1 例, 33 型 1 例, 52 型 1 例, 58 型 1 例), 中間リスク型が 1 例 (66 型), ローリスク型が 1 例 (11 型) であった。

今回, 男性からも HPV が検出されたことで, 今後は女性だけではなく男性も対象とした HPV 感染予防の啓発が必要であると考えられた。

^{*1}: 秋田大学医学部付属病院, ^{*2}: かつの厚生病院, ^{*3}: 秋田泌尿器科クリニック

疾病対策に活かすための保健統計-死亡統計に基づいた秋田県の疾病傾向の検討-

田中貴子

平成 23 年度全国保健統計協議会総会
2011 年 10 月, 秋田市

秋田県健康環境センターでは, 地方衛生研究所 (以下, 地衛研) の機能である公衆衛生情報の収集・解析・提供業務の一環として, 疾病対策や行政施策支援の一助を目的とした死亡統計に関する疾病状況を検討し関係機関へ提供してきた。今回はその解析結果の一部と業務について紹介する。1960 年～2005 年までの都道府県別年齢調整死亡率 (人口動態統計特殊報告) を用いて全国比較, 順位, 年次推移 (5 年毎) 等を把握した。また, 2005 年の主な死因について県・保健所別に標準化死亡比 (以下, SMR) を算出し解析した。基準は全国値 100 である。

本県の 1960 年～2005 年までの 10 大死因の年齢調整死亡率の年次推移は, 特に男性の全がんは横ばいで推移している。男性の部位別がんでは胃がんは減少しているもののいまだに高く, 次に気管・肺がん, 大腸がんが増加傾向にある。都道府県別順位 (男性) では, 胃がん, 食道がん, 脳梗塞, 自殺が 1960 年～2005 年まで 5 位以内に入り高い死亡率である。次に, 2005 年 SMR からみた県・保健所別疾病状況は, 胃がん (男性) は北秋田保健所を除き SMR 114.0～176.3 とほとんどの保健所で全国を上回っていた。自殺 (男性) は全保健所で SMR 109.1～221.1 と大幅に全国を上回っていた。

年齢調整死亡率の年次推移では, 長期的にみると各疾病の死亡率は確実に低下してきていることが分かった。しかし, 全国に比して高い疾病があること, SMR から各保健所の状況をみると, それぞれで高い死亡率を示す疾病があり, 今回の調査でターゲットとすべき疾病や地域を明らかにすることができた。

秋田県健康環境センター (地方衛生研究所) における保健師活動について

田中貴子, 栗盛寿美子

第70回日本公衆衛生学会総会

2011年10月，秋田市

地方衛生研究所（以下、地衛研）は、保健衛生行政の推進に必要な科学的・技術的中核機関としての業務を行っている。しかし地衛研に所属する保健師は少なくその活動はあまり知られていない。そこで平成22年度「地域診断から始まる、見える保健活動検討会」調査を参考に、昭和39年～平成22年に至る保健師業務を当センターの年報から抽出し検討した。

秋田県の成人病予防に寄与する目的で昭和39年に当センター内に成人病科が誕生し、保健師は昭和50年以降1名配置された。これまでの調査研究では、昭和期には成人病予防や循環器検診、老人保健事業等の研究を行ってきた。平成以降は若い世代の健康調査や個別健康教育手法の検討、近年はがん予防を中心としたテーマに取り組む等、行政ニーズを踏まえ市町村、保健所、課との連携により調査研究を進めている。公衆衛生情報の収集・解析・提供では厚生労働省の結核登録者情報調査等を実施し、結核月報・年報管理を行い、その集計解析結果を担当者会議、研修会、議会資料として提供し、保健所や県担当課と連携し感染拡大防止の監視を行っている。更にホームページへの掲載、出前講座等により一般への普及啓発を図っている。その他公衆衛生情報として、死亡統計を用いた地域診断を行い報告書を作成・配布し、その有用性を評価された。様々な職種で構成されている地衛研にあっても、保健師の課題発掘の視点、企画立案、連携調整、実行力は業務推進の大きな力であり、保健師は主体的にそしてチームの一員としてその力を十分に発揮できる可能性があると思われる。

中学生における食事バランスと肥満状況との関連について

村井幸子^{*1}，高桑克子^{*2}，古井美和子^{*3}，
田中貴子

第70回日本公衆衛生学会総会

2011年10月，秋田市

本研究では中学生の食事バランスと肥満状況との関連、肥満予防の観点から朝食の摂り方及び運動量（部活）との関連について検討した。平成13～17年の井川中学生の栄養調査結果を用い、親（主に母親）の食事は献立調査、生徒の栄養調査は朝昼夜別に分析した。また、生徒の食事バランス（食事構成）は三菜（主食、主菜、副菜）が揃っているか否かを調査日毎に判別した。同時に実施した健康調査結果から、肥満度をBMIの推計基準値を用いて算出した。体格状況はやせ、普通、肥満（軽度・中程度・高度肥満）に区分した。

親の食事バランスがとれている生徒（G群）と、とれていない生徒（N群）とで体格状況をみるとN群でG群より、男子でやせが、女子で肥満者の割合が高かった。朝食の食事構成をみると、男女とも三菜が2日間とも揃っていない生徒の割合がN群でほぼ80%と高かった。次いで、体格状況をみると、2日間とも三菜が揃っている生徒でやせが少なく、女子では肥満者も少なくなっていた。しかし男子では肥満者が多かったが、そのうちの6割が特定の部活の生徒だった。次に、親・子ともにバランスの悪い群で、朝食で顕著な野菜不足と過剰な菓子パンの摂取がみられた。今回の結果から、子どもの体格は、子どもの食事と運動量のバランスが関与していること、さらに親の食事が乱れた場合、子どもは特に朝食で手軽な菓子類を食べてカロリーを補っていることがわかった。親が自ら食事バランスを整えていくことが、子どもの正しい食生活につながると考えられた。

¹：井川町，^{*2}：元秋田県衛生科学研究所，
^{*3}：山本地域振興局福祉環境部

秋田県における三大生活習慣病の死亡動向に対する年齢・時代・世代要因の影響

三輪のり子^{*1}，田中貴子，中村隆^{*2}

第70回日本公衆衛生学会総会

2011年10月，秋田市

本研究では、経年推移だけではとらえ難い死

亡動向に対する年齢・時代・世代要因の影響を明らかにし、秋田県の三大生活習慣病に対するアプローチの方向性を得ることを目的とする。秋田県の1960～2005年（5年毎）における全がん・心疾患・脳血管疾患の各死亡数と人口（20～95歳）を、中村のベイズ型 Age-Period-Cohort モデル（交互作用効果モデルを含む）により分析し、死亡率に対する年齢・時代・世代効果を男女別に算出した。

年齢効果は、三疾病とも加齢と共に上昇しており、その傾向は心疾患で顕著であった。時代効果は、全がん・心疾患（女）では2000年から上昇傾向にあった。脳血管疾患では、1990年代まで下降が続いていたが、近年は上昇傾向に転じていた。世代効果は、全がんでは1890～1920年代生まれ、心疾患・脳血管疾患では1870～1910年代生まれの明治・大正世代で高く、三疾病のいずれもそれ以降の昭和世代は低くなっていた。三疾病の中で心疾患は特に変化幅が大きく生活習慣の積み重ねによる生体の変化が大きいことが示唆された。全がん・心疾患（女）及び脳血管疾患は、時代要因により死亡が増加する方向にあるため、その背景を社会環境から探り、県民全体に向けたアプローチを検討する必要がある。また、全がんと心疾患（女）は、1970年代生まれ世代から改善がみられなくなった背景をリスク因子の保有状況から探り、これら世代が受け入れやすい手段でアプローチすることが望ましいと考えられた。

*1：千里金蘭大学 看護学部，*2：情報・システム研究機構 統計数理研究所

結核対策における地方感染症情報センターの役割－秋田県健康環境センターの実施状況

田中貴子

地方衛生研究所全国協議会
関東甲信静支部公衆衛生情報研究部会

2011年11月，東京都

秋田県健康環境センターでは、昭和56年から

結核サーベイランス業務を行っている。厚生労働省の結核登録者情報調査を中心に、具体的には結核月報・年報管理を行い、その集計・解析結果を担当者会議、研修会、議会資料として提供し、さらにホームページへの掲載、出前講座等により一般への普及啓発を図っている。また保健所及び県担当課と連携し、感染拡大防止の監視を行っている。このように現在実施している結核情報業務は、実に多岐に渡っておりその中でも「集計・解析」「情報の還元・公表」「結核対策への反映」が特に重要な業務として考えられる。

結核情報の意義および健康環境センターの役割についてまとめると、1) 結核情報は秋田県の結核対策を推進するための根拠となる基礎的、科学的かつ重要な情報である。2) 秋田県の結核の低まん延化を目指し、結核対策に反映できるより有益で精度の高い結核情報を提供することが大切である。3) 健康環境センターは結核登録者情報調査から得られた情報を的確に集計・解析し、行政機関や一般住民等に目的に応じて迅速かつタイムリーに提供していくことが重要である。4) 健康環境センターは引き続き保健所、関係機関等と連携を取りながら、結核情報に係わる業務の中核的役割を担っていくことが必要である。最後に、担当者は情報を的確に解析する能力を高め、結核情報の集約・発信の中心的役割を担うことを認識し今後も業務に取り組むことが必要である。

Characterization of *Kluyvera cryocrescens* strains harboring a novel variant of *bla*_{CTX-M} gene isolated from retail poultry in AKITA, Japan.

Jun Yatsuyanagi, Sioko Saito, Masanori Watahiki^{*1}, Yutaka Shiraki^{*2}, Masahiro Suzuki^{*3}, Fubito Ishiguro^{*4}, Nami Kanno^{*5}, Katsuhiko Sunaoshi^{*6}, Koichi Murakami^{*7}, Kikuyo Ogata^{*8}, and Yoshichika Arakawa^{*9}

IUMS

October 2011, Sapporo

CTX-M ESBL-producing strains have increasingly been of clinical concern worldwide. Origin of the *bla*_{CTX-M} genes has been attributed to natural chromosomal CTX-M-like genes of *Kluyvera* strains. However, little is known about reservoir of *Kluyvera* strains in Japan. The aim of this study was to isolate and characterize *Kluyvera* strains harboring the *bla*_{CTX-M} gene from retail poultry in AKITA, Japan.

Sixteen retail poultry were employed. Broth cultures of the poultry were inoculated onto MacKonkey plates containing 1% cellobiose and 2 micro g/ml Cephalothin. The *bla*_{CTX-M} gene-harboring strains were isolated by using PCR. *Bam*HI restriction fragment of chromosomal DNA from the *Kluyvera* isolates were cloned into pBCKS vector, and *E. coli* JM109 transformants expressing Cephalotin-resistant phenotype were obtained. DNA sequence of the inserts and resistance phenotype of the transformants were determined. Two *Kluyvera cryocrescens* strains, #4-5 and #8-5, were isolated from the poultry, and two JM109 transformants, JM109-4 and JM109-8, containing the *bla*_{CTX-M} gene from strain #4-5 and #8-5, respectively, were obtained. The *K. cryocrescens* strain #4-5 and #8-5 harbored a novel *bla*_{CTX-M3} variant and *bla*_{CTX-M10} variant gene, respectively. Both of the JM109-4 and JM109-8 showed 4 micro g/ml and <1 micro g/ml MIC of CTX and CAZ, respectively. Both of the JM109-4 and the JM109-8 contained a putative asparatase amino transferase gene, the novel *bla*_{CTX-M} gene, and the orf477-like gene, which is identical configuration to that previously reported about *K. ascorbata* *bla*_{CTX-M3} gene. Both of the fragments, however, didn't contain ISEcp1 associated with plasmid-mediated *bla*_{CTX-M} genes. These results support the hypothesis that *Kluyvera* strains serve as a gene pool of the *bla*_{CTX-M} genes. Our results also suggested a role of poultry as a reservoir of the *Kluyvera* strains in Japan. Further studies should be conducted to characterize *bla*_{CTX-M} gene possessing strains in poultry produced in Japan.

*1:Department of Bacteriology, Toyama Institute of

Health

*2:GIFU Prefectural Research Institute for Health and Environmental Sciences

*3:Laboratory of Bacteriology, Aichi Prefectural Institute of Public Health

*4:Fukui Prefectural Institute of Public Health and Environmental Science

*5:Bacteriology, FUKUSHIMA Prefectural Institute of Public Health

*6:Clinical Microbiology, Saitama Institute of Public Health

*7:Department of Health Sciences, Fukuoka Institute of Health and Environmental Sciences

*8:Bacteriology, OITA Prefectural Institute of Public Health

*9:0Bacteriology, National Institute of Infectious Diseases

KPC-産生肺炎桿菌

八柳 潤

衛生微生物技術協議会第32回研究会
2011年6月、東京都

KPC (*Klebsiella pneumoniae carbapenemases*) を産生する肺炎桿菌が世界中で分離されてきている。カルバペネムは多剤耐性グラム陰性菌感染症に対する「最後の砦」であるため、KPC 産生菌の侵淫は問題視されている。本発表では、「新たな多剤耐性菌」である KPC 産生菌の概要について述べる。

1. KPC の分類と特徴

β-ラクタマーゼは、Ambler の分類によりクラス A から D に分類されている。KPC は活性中心にセリンを持つクラス A に属し、カルバペネマーゼ活性を有する。クラス A に属するカルバペネマーゼとしては、他に Sme, Imi, GES, NMC-A が知られている。KPC には KPC-2 から KPC-11 のバリエーションがあり、いずれも伝達性プラスミド (60 Kb, 75 Kb など) 上にコードされている。KPC 産生菌の殆どは *K. pneumoniae* であるが、*K. oxytoca*, *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *E. coli*, *C.*

freundii, *Salmonella*, *P. aeruginosa* にも KPC 産生菌が報告されている。カルバペネム系抗生物質は強力な緑膿菌、アシネトバクター属を含む多剤耐性菌に有効であることから、「多剤耐性菌感染症治療の最後の砦」とされている。KPC は、このカルバペネム系抗生物質を加水分解することから問題視されている。

2. KPC の疫学

KPC 産生株は 1996 年にノースカロライナで発見されて以来、2004 年には中国、スコットランド、2005 年にフランス、コロンビア、イスラエルで検出され、近年ではノルウェー、スウェーデンなどの欧州各国でも検出されるなど、世界各地に伝播しつつある。我が国では、2008 年 4 月に米国から帰国した急性骨髄性白血病患者 (35YF) から KPC-3 産生多剤耐性 *K. pneumoniae* が分離された例が初めてである。2010 年 9 月 15 日から 12 月 28 日に実施した「我が国における新たな多剤耐性菌の実態調査」では 2 株の KPC 産生 *K. pneumoniae* が確認されたが、我が国における本菌の検出は、現時点では稀である。

3. KPC の検査法

医療機関で汎用されている自動同定装置では、KPC 産生株を正しく検出できない場合があることが報告されており、問題となっている。PCR 法、リアルタイム PCR 法が報告されており、地方衛生研究所で実施可能である。

4. まとめ

昨年注目された NDM-1 と同様に、KPC は腸内細菌が産生すること、伝達性プラスミド上にコードされていることから、健康人の腸管定着を介する市中拡散が懸念される。保菌健康人を介した感染拡大は、その探知も防止も困難を極めるので、気付いたときには既に国内に広く侵淫していたという最悪の事態に至りかねない。医療機関における院内感染起因菌としても重要視すべき菌であるため、地方衛生研究所は本菌の分離同定と分子疫学解析技術を習得することに加えて、行政の院内感染対策部門、地域の医療機関との連携体制を構築する必要があると考えられる。

E. coli O104 特異的 PCR—*E. coli* O104 O antigen polymerase gene (*wzy*) のクローニングによる PCR 陽性対象専用株の作出

八柳 潤

東北食中毒研究会第 24 回全体会議及び研修会
2011 年 8 月、山形市

腸管出血性大腸菌 (EHEC) O104 は 2011 年 4 月以降、ドイツを中心とした欧州で感染者が多発し、大きな健康被害を惹起した。この EHEC O104 は腸管凝集付着性大腸菌 (EAggEC) O104 にベロ毒素ファージが感染して派生したハイブリッド型の EHEC であるとされている。国内での EHEC O104 感染者の発生は未確認であるが、国内への侵入を迅速に探知して適切な対応をすることが健康被害の拡大防止の上で重要である。しかしながら、O104 の型別血清は国内市販品が無いことが問題となっている。このため、我々は *E. coli* O104 の O-antigen polymerase gene (*wzy*) (GenBank Accession Number AF361371, 1,113 bp) を標的とした O104 特異的 PCR 法用のプライマーを設計し、また、O104 陽性対象用大腸菌株を作出した。国立感染症研究所細菌第 1 部の伊藤健一郎博士から分与された、中部国際空港検疫所で分離された EAggEC O104 2342 株の DNA 溶液から *E. coli* O104 の O-antigen polymerase gene (*wzy*) の全長 (1,113 bp) を増幅し、TA クローニングシステム (Amersham), トランスフォーメーションキット (ニッポンジーン) を使用して *E. coli* JM109 にクローニングし、O104wzyORF 1,113 bp を保有する JM109/O104-KI/AKITA20110616 を作出した。O104 特異的 PCR 用プライマーとして、O104wzy の 470 bp を増幅する O104wzy_F: ttt act tca cga ggt gtc aag, O104wzy_R: att aac att aat gca gat aaa tgg を設計し、JM109/O104-KI/AKITA20110616 から 470 bp の断片が増幅されることを確認した。なお、*E. coli* O104 O antigen gene cluster は *E. coli* K9 gene cluster と同一であることから、O104wzy PCR 陽性株については K9 抗原保有の否定が必要となる。その目的には O8wbD, O9wbD 共通プライマーである #3592: ggc atc ggt cgg tat tcc, #3594 tgc gct aat cgc gtc tac が使用できる。

JM109/O104-KI/AKITA20110616 は上記プライマー等関連情報を添付して当センターから分与可能である。

秋田県で分離された *astA* 保有大腸菌の病原因子保有状況

今野貴之，八柳 潤，齊藤志保子

第 65 回日本細菌学会東北支部総会
2011 年 8 月，山形市

astA を保有する大腸菌は、毒素原性大腸菌の耐熱性エンテロトキシンに類似の毒素 EAST1 を産生し、これまでに数例の集団下痢症事例の報告がある一方、健康者からも多数分離されるためその病原性には賛否両論がある。今回、秋田県における *astA* 保有大腸菌による健康被害の実態を把握するため、散発下痢症患者由来の大腸菌を用いて、その侵淫実態を調査した。また、*astA* 保有大腸菌の病原性について、*astA* 以外の病原因子が関わる可能性を調査するため、これまでに下痢原性大腸菌で報告されている様々な病原因子の保有状況を併せて調査した。

平成 19 年から平成 21 年までの下痢原性大腸菌疑い株から、*astA* 保有大腸菌は 35 株検出された。これら 35 株について *iha*, *lpfA*, *ldaG*, *pilS*, *pic*, *pet*, *irp2*, *daa*, *aah*, *aid*, *cdtB* 及び *hlyA* の 12 種類の病原因子について保有状況を調査したところ、24 株で何らかの付着性に関わる病原因子を検出した。また、3 株では α 溶血素産生に関わる *hlyA* が検出された。さらに、24 株でヒトの体内での増殖に必要な *irp2* が検出され、*iha*, *pilS*, *pic* 及び *hlyA* を保有する株は共通してこの因子を持ち合わせていた。特定の病原因子のセットを持つ菌株のみがヒトへの病原性を持つと推定すると、*iha*, *pilS*, *pic*, *hlyA*, *irp2* といった病原因子は *astA* 保有大腸菌の病原性に重要な役割を持つことが示唆された。

秋田県における鶏肉等のカンピロバクター汚染状況について

高橋志保，熊谷優子，和田恵理子
今野貴之，八柳 潤，千葉真知子
齊藤志保子，天野憲一^{*1}

第 4 回日本カンピロバクター研究会総会
2011 年 12 月，相模原市

厚生労働省食中毒統計によると、細菌性食中毒事例は年々減少傾向にあるものの、カンピロバクターによる事例数は横ばい状態で、平成 15 年以降、第 1 位となっている。その背景には、家庭や飲食店等における感染があると推察されることから、カンピロバクターによる食中毒事例の原因食品として最も多い鶏肉類を中心に、秋田県における汚染状況をまとめた。

平成 12～22 年に市販食肉等の汚染実態調査、平成 17～22 年に収去食品検査、平成 15～18 年に家畜の保菌状況調査を行った。汚染実態調査では、牛肉や豚肉からはカンピロバクターは検出されなかったが、鶏肉や鶏レバーからは 44.4～74.0%，鶏ミンチ肉からは 28.6～50.0%，加熱調理用牛レバーからは 0～14.3% 検出された。収去食品からは 4.0% 検出された。家畜の保菌状況調査では、牛及び豚の直腸便から 29.2%，92.0%，胆汁から 21.4%，0%，鶏盲腸便からは 90.9% と高率に検出された。

汚染実態調査から、県内に流通している鶏肉類はカンピロバクターに高度に汚染されている実態が浮き彫りとなった。また、牛胆汁からの検出は、牛レバーの汚染は表面だけではなく、実質そのものの汚染を示唆している。このように汚染された鶏肉や牛レバーが、依然としてカンピロバクターによる食中毒事例や散発下痢症を発生させる重要な原因と考えられる。汚染を低減させるためには、農場、処理場、食品関連事業者等がそれぞれの立場に応じた対策を講じていくことが重要であり、同時に消費者に対して、生食することの危険性等について一層の啓発活動を行っていくことが必要である。

^{*1}：秋田大学バイオサイエンス教育研究センター

ノロウイルス：食品からのウイルス検出法

片山和彦^{*2}，田中智之^{*3}，野田 衛^{*4}

斎藤博之

国際微生物学連合 2011 会議

2011 年 9 月 札幌市

衛生微生物技術協議会第 32 回研究会

2011 年 6 月 東京都

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。全国的に食中毒対応で用いるには次のような課題があった。プロトコルに必須の抗 NoV 血清の絶対量は少なく、全国の食中毒事例に対応するには全く足りていない。また、現在のところ NoV-GII/4 を含めて 19 遺伝子型に対する特異的抗血清が利用可能であるが、その他の遺伝子型には対応できない。一方、実際に食品検体が搬入される時点では遺伝子型は不明なため選択が困難であるという実践的な問題もある。さらに、サポウイルスなど NoV 以外の食中毒起因ウイルスへの対応も必要である。

対応策を検討したところ、1 万人単位でプールされた血漿から製造・販売されているガンマグロブリン製剤を利用することでこの問題を解決することができた。例として NoV-GII/4 型の回収率（3 回の平均）を示すと、ポテトサラダでは $24.4 \pm 3.6\%$ 、焼きそばでは $25.6 \pm 2.3\%$ であった。汚染レベルの異なるモデル食品から nested PCR による検出を試みたところ、これらの 2 食品ではいずれも食品 1 g 当り 35 コピーまで検出できた。これまでのところ、ガンマグロブリン製剤は、NoV では 11 遺伝子型（GI/3, GI/4, GI/8, GI/9, GII/2, GII/3, GII/4, GII/5, GII/6, GII/13, GII/18）、サポウイルスでは 4 種類全ての型、他に A 型肝炎ウイルスとアデノウイルス 41 型において有効であることを確認している。このように上記の課題をクリアできたため、本法を実事例で試すことが可能となり、実用化に向けて大きく前進したものと考えられる。

Development of a PANtrap method to detect norovirus from contaminated food

Noroviruses (NoVs) are a major cause of food poisoning and a dominant cause of food-related outbreaks of gastroenteritis. Foodborne gastroenteritis is being increasingly recognized as a public health problem, but identification of the etiological agents responsible has been restricted due to the difficulty to detect the agents from food samples. We developed a PANtrap method for the detection and quantification of NoVs from different food samples, that included solid, liquid, paste and oily states. We spiked NoV GII/4 stool suspension that includes 10^5 copies of NoV RNA into 10 grams of potato salad and stir fried noodle. Food samples were rinsed by a homogenizing buffer and centrifuged to obtain food emulsion. Anti NoV GII/4 serum was added into the food emulsion to make NoV-IgG complexes. PANSORBIN was added and the samples re-centrifuged to collect NoV-IgG complexes adsorbed by PANSORBIN. NoV RNA was extracted from this PANSORBIN pellet using a commercial extraction kit, and then analyzed using RT real-time PCR. The recovery rate from potato salad was $78.3 \pm 10.8\%$, in contrast to $0.33 \pm 0.08\%$ when no anti NoV GII/4 serum was added. Similar results were obtained from the stir fried noodle, $81.5 \pm 10.2\%$ (anti NoV serum mix added) and $1.15 \pm 0.25\%$ (no anti NoV serum). We also applied a commercially available human gamma globulin agent to the PANtrap method to detect other viruses. We succeeded to recover other NoV genotypes as well as sapoviruses, adenovirus type 41, and hepatitis A virus. These results show the potential of the PANtrap method for the detection of food borne viruses from contaminated food.

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

斎藤博之，東方美保^{*1}，岡 智一郎^{*2}

食品中のノロウイルス検出のためのパンソルビン・トラップ法の開発

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

第 102 回日本食品衛生学会学術講演会
2011 年 9 月 秋田市

ウイルス性食中毒の大部分を占めるのがノロウイルス (NoV) であることがわかっているにもかかわらず、原因として疑われる食品からウイルスを検出できた例はカキを除けば極めて稀少である。その理由として、ウイルスを含む食品乳剤を PCR で用いる量まで減量濃縮するには多大な労力と時間とコストを要し、多検体を取り扱うのは事実上不可能であるという実状がある。こうした困難な状況を打開するために、固形、液状、練り物、油物等の一般的な食品から NoV を検出する手法の開発を行った。

蒸留水で希釈した糞便で各種食品を汚染させて食中毒モデル食品とした。モデル食品を洗滌液に懸濁させた後、3,000 rpm 30 分遠心することで固形物を除去した。食品の遠心上清（濁質を含む）に抗体（抗 NoV ウサギ単味血清または市販ガンマグロブリン製剤）及びパンソルビン（IgG 結合性プロテイン A を持つ黄色ブドウ球菌の菌体）を加えて NoV-IgG-菌体の複合体を形成させた後、遠心分離により NoV を回収した。NoV が吸着した菌体を少量の緩衝液で再懸濁したものを TRIzol-LS (invitrogen) でフェノール抽出し、水層から QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) を用いて RNA を抽出した。以上の基本プロトコールにおいて、洗滌液の組成、食品乳剤作成方法、抗体の種類と添加量、抗原抗体反応とパンソルビン吸着反応の時間、及び抽出した RNA に対する逆転写反応の条件等について、Real-time PCR の数値を基に最適化を図った。また、本法の有用性を検証するために、現在多用されているポリエチレングリコール沈澱法（PEG 沈澱法）による回収結果と比較した。

食品洗滌液の組成を検討したところ、0.1 M Tris・HCl-0.5M NaCl-0.1% Tween20 (pH8.4) が最適であり、さらに α -アミラーゼ粉末を 2.5 mg/mL になるように添加することで、反応妨害

物質である炭水化物を分解除去できた。抗体とパンソルビンは別々に反応させる必要はなく、同時添加 15 分の処理で十分な回収結果が得られた。逆転写反応の際にランダムプライマーよりも、NoV 特異的プライマーを用いた方が、特に低濃度汚染検体において効果的であった。回収率は NoV の血清型や食品種別によって異なるが、焼きソバにウサギ単味抗血清を用いた例で $81.5 \pm 10.2\%$ であった。PEG 沈澱法を用いた場合の回収率と比べると 2~1,000 倍の数値であり、マカロニサラダ等の練り物において特に有効であった。実事例における汎用化のために、市販ガンマグロブリン製剤を用いたところ NoV では 12 遺伝子型、サポウイルスでは 4 種類全ての型、他に A 型肝炎ウイルスとアデノウイルス 41 型において 10~50% の回収率であった。本法はどのような食品であっても共通の工程で検査が行えるため、今後は実際の運用面における利便性を追究していく予定である。

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

食品中のノロウイルス検出の汎用化を目指したパンソルビン・トラップ法の開発

斎藤博之

第 32 回日本食品微生物学会学術総会
2011 年 10 月 東京都

平成 9 年に食品衛生法の中に初めてウイルスが登場し、ウイルス性食中毒という概念が確立したのは、歴史の一つの節目と言える。その後、糞便検体に対する検査技術は長足の進歩を遂げたものの、食品検体からのウイルス検出は困難を極め、「糞便は検査できるが、食品の検査は難しい」といった状態のまま 10 年が経過した。ウイルスが食品衛生法上の食中毒原因物質として規定されている以上、このような片肺飛行を続けることは社会的に大きなトラブルを招来する結果に繋がるため、食品からのウイルス検出技術の開発は焦眉の急とされていた。そこで平成 19 年から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)による研究の一環として、食品中の NoV を検出するための実践的手法の開発に関する研究がスタートした。その結果、パンソルビン・トラップ法(パントラ法)を開発し、固形、液状、練り物、油物などの多種・多様な食品から NoV を検出することが可能となった。

開発した実験室内プロトコルは、これまで無かったものを作り出す“プロダクト・イノベーション”に相当したが、それを実用に供するためには、もう一段の“プロセス・イノベーション”を必要とした。最大の問題は、プロトコルに必須である抗 NoV 血清の安定供給であった。多くの検討を重ねた末に、1 万人単位でプールされた血漿から製造・販売されているガンマグロブリン製剤を利用することでこの問題を解決することができた。例として NoV-GII/4 型の回収率(3 回の平均)を示すと、ポテトサラダでは $24.4 \pm 3.6\%$ 、焼きそばでは $25.6 \pm 2.3\%$ であった。汚染レベルの異なるモデル食品から nested PCR による検出を試みたところ、これらの 2 食品ではいずれも食品 1g 当り 35 コピーまで検出できた。これまでのところ、ガンマグロブリン製剤は、NoV では 12 遺伝子型(GI/3, GI/4, GI/8, GI/9, GII/2, GII/3, GII/4, GII/5, GII/6, GII/12, GII/13, GII/18)、サポウイルスではヒトに感染する 4 種類全ての型、他に A 型肝炎ウイルスとアデノウイルス 41 型において有効であることを確認している。このように上記の課題をクリアできたため、本法を実事例で試すことが可能となり、実用化に向けて大きく前進したものと考えられる。

病原ウイルスによる食品汚染を検出するパンソルビン・トラップ法の開発

斎藤博之、東方美保^{*1}、岡 智一郎^{*2}
片山和彦^{*2}、田中智之^{*3}、野田 衛^{*4}

第 19 回秋田応用生命科学研究会
2011 年 11 月 秋田市

黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) は、化膿性疾患などの原因となることから有害微生物として認識されている。一方で細胞壁中に含

まれる Protein A は IgG と強固に結合する性質を持つため、ホルマリン固定された菌体はパンソルビンという試薬として市販されている。平成 9 年に食品衛生法が改正され、史上初めて「ウイルス性食中毒」という概念が確立したが、食品中のウイルスを検出する方法については手探り状態のまま現在に至っている。我々は、上記のパンソルビンを利用することで、固形・液状・練り物・油物など多種・多様な食品からノロウイルス (NoV) に代表される食中毒起因ウイルスを検出する技術(パンソルビン・トラップ法: 以下パントラ法と略)を開発したので紹介する。

パントラ法の基本原理は、食品乳剤中にウイルスに対する抗体を添加することにより、抗原抗体複合体を形成させ、それを黄色ブドウ球菌表面のプロテイン A に吸着させることで、菌体とともにウイルス粒子を沈殿・回収することである。回収した菌体を少量の緩衝液で再懸濁してから市販のキットを用いて RNA 抽出を行えば、50 mL の食品乳剤から 50 μ L の PCR スケールの RNA 溶液まで、効率良く減量濃縮できることになる。添加する抗体として、開発時には GII/4 型の NoV ウイルス様粒子 (VLPs) を免疫して作製した特異的ウサギ抗血清が用いられた。その後、実践使用のための安定的な抗体供給源として、市販ガンマグロブリン製剤を用いる汎用プロトコルが考案された。

ポテトサラダと焼きそばを、NoV-GII/4 型で汚染させたモデル食品に作製し、投入したウイルス量と回収できたウイルス量を Real-time PCR で比較したところ、特異的ウサギ抗血清を用いた場合は約 80%、ガンマグロブリン製剤を用いた場合は約 25% の回収率であった。また、nested PCR (二重 PCR) による検出限界を検討したところ、特異的ウサギ抗血清を使用した場合は、食品 1 g 当たり 10 コピー、ガンマグロブリン製剤を使用した場合は 35 コピーの汚染レベルまで検出できた。ガンマグロブリン製剤は特異的ウサギ抗血清と比べると 1/3 程度の数字 (PCR では 2 サイクル以内の差) であるが、NoV の他の型やサポウイルス、A 型肝炎ウイルスなどにも幅広く対応できる対応できる利点があり、汎用プロトコルとして実事例へ用いることが可能となった。

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

秋田県の雄物川流域におけるアカツツガムシ生息状況について－2011年の調査から－

佐藤寛子，柴田ちひろ，佐藤了悦
秋野和華子，斎藤博之，安部真理子
斎藤志保子，門馬直太*¹，高橋 守*²
藤田博己*³，角坂照貴*⁴，高田伸弘*⁵
川端寛樹*⁶

第56回日本寄生虫学会・日本衛生
動物学会北日本支部合同大会
2011年10月，山形市

近年，アカツツガムシは絶滅したかのように思われていたが，2008年と2010年，秋田県においてアカツツガムシ媒介性のつつが虫病患者が再び発生した。2009年以降の調査において，アカツツガムシの生息が感染推定地を含む同県大仙市の観光スポットでも確認されたため，我々は調査域を雄物川上流～支流まで広げ，アカツツガムシ・ハザードマップ作成を試みているので，その経過等について報告する。

調査は1964年の患者発生記録を参考に，雄物川上流部の湯沢市から中流部の大仙市にいたる約70 kmの河川敷を対象地域に，黒布見取り法によって行った。調査地域の最上流部にあたる湯沢市郊外では，記録上は患者発生地とされていたが，アカツツガムシの生息は確認されなかった。しかし，隣市を流れる支流との合流点に近づくにつれ，アカツツガムシが確認されるようになり，観光スポット周辺にいたっては高密度に生息していることが推定された。ちなみに，アカツツガムシは水際の砂地に，特に中州での生息数が多い傾向にあったが，河川沿いの公園や釣り場等でも確認された。今後は，これらツツガムシの病原体保有状況の検査も含めた調査継続の必要性が示唆された。

*¹：福島県衛生研究所，*²：埼玉医科大学，
*³：大原総合病院附属大原研究所（現：馬原アカ

リ医学研究所），*⁴：愛知医科大学，*⁵：福井医科大学，*⁶：国立感染症研究所

秋田県における Shimokoshi 型つつが虫病の5症例

佐藤寛子，柴田ちひろ，佐藤了悦
秋野和華子，斎藤博之，安部真理子
斎藤志保子，高橋守*¹，藤田博己*²
角坂照貴*³，高田伸弘*⁴，川端寛樹*⁵
須藤恒久*⁶

第56回日本寄生虫学会・日本衛生
動物学会北日本支部合同大会
2011年10月，山形市

国内における *Orientia tsutsugamushi* (Ot) の代表的な血清型のうち，Shimokoshi 型はベクターが未だ不明である上，感染症例の報告も少ない。今回，秋田県において抗体検査により確認し得た5つの症例について報告する。

症例1：59才男性，発病年月日1995/10/12，発熱（38.0℃）と発疹，肛門部に刺し口，感染要因 森林作業。

症例2：51才男性，発病年月日1997/10/18，発熱（38.0℃）と発疹，上腕に刺し口，感染要因 水田作業。

症例3：92才女性，発病年月日2009/5/8，発熱（38.0℃）と発疹，上腕に刺し口，感染要因 畑作業。

症例4：75才女性，発病年月日2009/5/17，発熱（38.3℃）と発疹，上腕に刺し口，感染要因 山菜採り。

症例5：57才男性，発病年月日2011/5/17，発熱（37.5℃）と発疹，背部に刺し口，感染要因 畑作業。

以上の症例の発生地点は県北部が1例と県南部が4例で，発生時期は春季3例と秋季2例であった。Shimokoshi 型 Ot は概して人に対する病原性が弱いとされてきたが，これら5症例は全てつつが虫病の3徴候を認め，典型的な症状を呈していた。今後，人に対する病原性の再評価とともに，ベクター解明に向けた調査の進展が望まれる。

*¹: 埼玉医科大学, *²: 大原総合病院附属大原研究所 (現:馬原アカリ医学研究所), *³: 愛知医科大学, *⁴: 福井大学, *⁵: 国立感染症研究所, *⁶: 秋田大学

秋田県におけるアカツツガムシ生息域 (2011年)

佐藤寛子 柴田ちひろ 佐藤了悦
秋野和華子 斎藤博之 安部真理子
斎藤志保子 門馬直太*¹ 高橋守*²
藤田博己*³ 角坂照貴*⁴ 高田伸弘*⁵
川端寛樹*⁶

第19回ダニと疾患のインターフェースに
関するセミナー
2011年11月, 広島県

秋田県の雄物川流域は古くからアカツツガムシの生息地として知られ, アカツツガムシ媒介性つつが虫病患者の多発地でもあった。近年になって, 秋田県を含むこれまでの生息地におけるアカツツガムシは絶滅したかのように思われていたが, 2008年, 秋田県において15年ぶりにアカツツガムシ媒介性のつつが虫病患者が発生し, 大仙市角間川地区の雄物川河川敷が感染推定地とされた。2009年の調査でアカツツガムシの生息が感染推定地の他, 角間川より7 km下流の全国花火大会会場でも確認されたが, 翌2010年, 角間川から20 km上流でも患者が発生した。このことを受け, 我々は調査域を雄物川支流を含む上流域の約70 kmにまで広げ, アカツツガムシ・ハザードマップ作成を試みたので, その経過等について報告する。

調査地域の最上流部にあたる湯沢市郊外では, 記録上は患者発生地とされていたが, アカツツガムシの生息は確認されず, そこから約3 km下流に至ってから確認された。さらに下流の横手市を流れる支流との合流点に近づくにつれ, 多くのアカツツガムシが確認されるようになった。一方で調査範囲の最下流部に位置する大仙市郊外北部の記録上の患者発生地でもアカツツガムシの生息確認が出来なかったが, そこから18 km

の上流地点以南では確認されるようになり, 雄物川流域における最も高密度な生息域は花火大会会場周辺にあることが推察された。また, アカツツガムシの生息環境は広い河川敷の中でも水際の砂地に, 特に中州での生息数が多い傾向にあったが, 河川沿いの公園や釣り場といった増水時に水没する箇所にも確認された。今後は, 未調査の支流での調査に加え, ツツガムシの病原体保有状況の検査も実施し, 得られた情報の地元自治体や保健所への提供などを通して, つつが虫病対策に活用することが必要と考えられた。

*¹: 福島県衛生研究所, *²: 埼玉医科大学,
*³: 大原総合病院附属大原研究所 (現:馬原アカリ医学研究所), *⁴: 愛知医科大学, *⁵: 福井医科大学, *⁶: 国立感染症研究所

もみ殻を原料としたリン回収材の開発とそれを活用した八郎湖高濃度リン対策への展開

成田修司, 鈴木忠之, 石垣 修

平成23年度廃棄物資源循環学会年会
併設研究発表会
2012年11月 東京都

米どころ秋田では, 大量発生するもみ殻の焼却が長年の懸案となっている。近年, 焼却に伴う健康被害の報告もあることから, もみ殻の適正処理が求められている。当センターでは, このニーズに対応するため, 適正処理の過程において, リンを吸着する水質浄化材へ転換する技術開発に取り組んだ。著者らは, その浄化材を本県において富栄養化が問題となっている八郎湖対策への適用を目指し研究を進めた。

上記リン回収材の開発では, リンと親和性が高く環境中に豊富に存在するカルシウム (Ca) との複合化を試みた。合成したリン回収材を用いて, リン酸イオンの吸着試験 (初濃度 $[\text{PO}_4^{3-}] = 50 \text{ mg/L}$) を行った結果, 24時間後のリン酸イオン回収量は, 35 mg/g-sample となった。同様に合成したリン回収材を用いて, 種々の共存アニオン (PO_4^{3-} , NO_3^- , SO_4^{2-} , Cl^- , 濃度: 50 mg/l) を含む

溶液から、 PO_4^{3-} の選択的回収試験を行った結果を以下に記述する。 Cl^- が約 5 mg/l 増加していたが、 NO_3^- 、 SO_4^{2-} については回収前後の濃度変化がほとんど見られなかった。一方、 PO_4^{3-} については、回収時間 24 時間で、初期濃度の約 85 % を回収していたことから、 PO_4^{3-} のみを選択的に回収可能であることが明らかとなった。

上記回収材を用いて、フィールドにおける小規模の実証試験を行った結果、湧出水中の 3/4 程度のリン負荷低減を確認した。また、この技術が長崎県の諫早湾対策で活用されることについても報告した。

玉川源泉から湧出する鉄及びアルミニウムのイオン成分が関与する源泉下流域及び田沢湖のpH低下機構

成田修司，高橋英之，佐々木純恵
布田 潔^{*1}，宮田直幸^{*2}

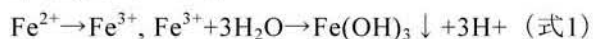
第 46 回 日本水環境学会
2012 年 3 月 東京都

秋田県仙北市にある玉川源泉の大噴は、pH 約 1.2 の強酸性水を湧出している。その強酸性水は、長い間下流域の土壌や河川に多大な影響を与え、その酸性水が導入された田沢湖では pH が 4 台にまで低下した。この酸性水対策として、平成元年には石灰中和処理施設が運転を開始し、源泉の大部分を pH 約 3.5 まで処理した後、河川に放流することにより田沢湖の pH 改善が進んできた。しかし、平成 14 年ごろから同源泉の総酸度（PP 酸度）が急激に上昇し、下流の田沢湖において pH 低下が観測されるようになった。本研究では、同源泉の総酸度を構成している強酸成分と鉄の 2 価（ Fe^{2+} ）及びアルミニウムイオン（ Al^{3+} ）等の弱酸成分（以降、潜在的酸性成分と記述）が関与する pH 低下の反応機構とその反応が生じていると考えられる流域を明らかにすることを目的に調査を行った。

調査地点は、平成 20 年から継続的に調査を実施している源泉（大噴）、玉川温泉の排水が混入する中和処理施設周辺の湯川末端部及び同施

設放流口である。各地点で試料水を採取し、pH 及び Fe^{2+} 、鉄の 3 価（ Fe^{3+} ）、 Al^{3+} の金属イオン濃度について分析を行った。

上記の調査地点で観測された pH 及び Fe^{2+} 、 Al^{3+} 濃度より、湯川及び同施設から流出する酸性成分の割合を算出した（表 1）。全体の約 4 割は同施設を経由しない湯川の強酸成分が占め、同施設周辺の河川 pH 約 4 を pH 2 台にまで低下させた。また約 5 割が湯川及び中和放流水中の Al^{3+} と Fe^{2+} からなる潜在的酸性成分であった。 Fe^{2+} は流下に伴い鉄酸化細菌の存在下で Fe^{2+} が Fe^{3+} に酸化され、式 1 が進行する。その結果、源泉の下流 5 km 付近には河床に $\text{Fe}(\text{OH})_3$ の赤褐色沈殿がみられるようになった。



また、一部の Al^{3+} は pH 約 4.8 の玉川ダムでは沈殿せずに流下し、田沢湖（pH 約 5.2）付近で加水分解（式 2）が進行すると考えられ、理論的に田沢湖の pH を低下もしくは上昇させない方向に反応が進む可能性が高いことが明らかとなった。



表 1 湯川及び中和処理施設から流出する酸性成分の割合

	強酸成分(%)	Al^{3+} (%)	Fe^{2+} (%)
中和放流水	15	30	7
湯 川	39	8	1

^{*1}：秋田大学大学院工学資源学研究科，^{*2}：秋田県立大生物資源学部

玉川酸性水中和対策がもたらす副次効果

佐々木純恵，成田修司，高橋英之
布田 潔^{*1}，宮田直幸^{*2}

第 46 回 日本水環境学会
2012 年 3 月，東京都

秋田県仙北市にある玉川源泉から湧出する強酸性水（pH 約 1.2）は、大部分が玉川中和処理施設で pH 約 3.5 まで石灰中和された後、玉川支流の渋黒川に放流されている。当センターでは、

この中和処理過程において、シュベルトマナイト (Sch) 様化合物が形成され、同処理施設放流口に堆積していることを明らかにした。この Sch は、一般的に、ヒ素 (As) 等の重金属を取り込む性質をもつことが知られている。そこで、本研究では Sch 様化合物中が、源泉中の重金属を取り込む挙動を明らかにし、水質への副次効果について検討を行った。

本調査では、大噴の源泉、中和処理施設の中和処理水と同処理施設放流口の堆積物である Sch 様化合物を採取し、As、鉛 (Pb)、クロム (Cr) について定量分析を行った。

源泉、中和処理水、Sch 様化合物の重金属濃度を表 1 に示す。これらの結果から、pH 約 1.2 の源泉が中和処理により、pH 約 3.5 まで酸性を弱められる過程において、上記重金属を取り込みながら、Sch 様化合物が形成されたと考えられる。その一部が同処理施設放流口に堆積したことにより、さらに Sch 様化合物に重金属が高濃度に蓄積されたと推察される。このような重金属の挙動は同処理施設において酸性を弱めるために行っている処理の副次的な効果であり、下流域の重金属の濃度低下に大きく貢献していると考えられる。

表 1 源泉、中和処理水、Sch 様化合物中の As, Pb, Cr 濃度

	源泉 (mg・L ⁻¹)	中和処理水 (mg・L ⁻¹)	Sch様化合物 (mg・kg ⁻¹)
As	4.2	<0.001	14.0 × 10 ³
Pb	1.2	0.49	0.61 × 10 ³
Cr	0.10	0.014	0.19 × 10 ³

*¹: 秋田大学大学院工学資源学研究科, *²: 秋田県立大生物資源学部

マツ林に生育するキノコへの農薬の影響

小林貴司, 松渕亜希子, 松田恵理子
菅原冬樹*¹, 阿部 実*¹

第 102 回日本食品衛生学会学術講演会
2011 年 9 月, 秋田市

松くい虫による松枯れ病を防止するために、

日本海沿岸の松林ではネオニコチノイド系農薬のアセタミプリド、チアクロプリドが散布されている。これらの農薬は、自然環境中で徐々に減少するが、松林に発生するキノコに及ぼす影響に関しての知見は少ない。そこで、松林で採取したキノコについて農薬含有量を調査し、安全性についての評価を行った。また、より直接的にキノコへの農薬影響を評価するために、高濃度農薬含有培地でキノコを生育し、吸収試験を行った。

収穫最盛期の秋に採取したキノコを測定した結果、アセタミプリドが散布された地点のキノコは、すべて一律基準 (0.01 µg/g) 以下の濃度であった。一方、チアクロプリドが散布された地点では、分解物であるアミド体においてわずかに基準を超える 1 検体 (0.02 µg/g) があつたが、チアクロプリド自体はすべて一律基準以下であった。

農薬吸収試験の結果、採取したすべてのキノコから農薬は検出されなかった。生育の過程でキノコが農薬を吸収しないことから、マツ林のキノコに農薬が検出される要因は、散布時に直接付着したときや、マツ葉などの農薬含有堆積物にキノコが接触したときなど、直接または間接的な接触によるものと考えられた。

*¹: 秋田県農林水産技術センター森林技術センター

LC-MS/MS を用いた畜水産物中の動物用医薬品の一斉分析法における精製法の検討

松渕亜希子, 松田恵理子

第102回日本食品衛生学会学術講演会
2011年9月, 秋田市

畜水産物中の動物用医薬品の分析を精度よく行うためには、試料中の脂質の除去が重要である。今回、脂質の中からリン脂質に焦点をあて、その精製法の検討を行った。リン脂質は両親媒性で目的物質との分離が困難であり、LC-MS/MS 分析の際、イオン化抑制等の原因となる。そこで、一律基準レベルに対応した分析をするために、数種のタイプの異なる固相カラム (脂質等

の高分子夾雑物除去のための4種、リン脂質除去のため6種の計10種）を選択し、精製効果等について比較した。

測定対象成分は、抗生物質、ホルモン剤、駆虫薬等の計98成分とし、対象食品は、鶏肉、豚肉、牛肉、サケ、エビ、鶏レバー、牛乳、鶏卵、ウナギ蒲焼きとした。

厚生労働省通知、HPLCによる動物用医薬品等の一斉試験法Ⅲを改良した方法により試験溶液を調製し、LC-MS/MSを用いて測定した。カラムの精製効果の評価は、添加回収試験で行い、試料あたり10 ppbとなるように添加した。

脂質等の高分子夾雑物除去のためのカラムについては、Oasis HLBで最も多くの成分を回収で

きた。さらにリン脂質を除去するために、Oasis HLBの追加精製として、リン脂質に選択性が高いカラムについて検討した。その結果、MonoSpin TiOを用い、1%ギ酸アンモニウム/メタノールで溶出する条件で、最も多くの成分の回収が可能であった。

Oasis HLBおよびMonoSpin TiOの2つのカラムを併用し、9種類の食品について、添加回収試験を実施した。鶏レバー、ウナギ蒲焼きを除いて、約8割の成分で回収率50～120%、併行精度（RSD%）20%以下と概ね良好な結果が得られた。レバー、ウナギ蒲焼きでは、マトリックス添加検量線を用いることで、結果が改善された。

2. 他紙掲載論文

Virulence gene profiling of enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1-harboring *E. coli* (EAST1EC) derived from sporadic diarrheal patients

Takayuki Konno, Jun Yatsuyanagi, Shioko Saito

FEMS Immunology and Medical Microbiology,
64, 3, 2012, 314-320.

Between 2007 and 2009, a total of 2168 *Escherichia coli* strains derived from diarrheal patients, defined as putative diarrheagenic *E. coli* (DEC), were collected from medical institutions in Akita prefecture, Japan. Thirty five of the strains lacked typical pathogenic determinants of DEC other than *astA*, which encodes enteroaggregative *E. coli* (EAggEC) heat-stable enterotoxin 1 (EAST1). These *E. coli* strains are referred to as EAST1EC. Several studies have suggested a role of EAST1 in diarrhea; however, the correlation between diarrhea and the presence of *astA* remains inconclusive. To investigate whether EAST1EC strains derived from diarrheal patients shared pathogenic factors other than EAST1, virulence gene profiling of 12 virulence genes - *iha*, *lpfA*, *ldaG*, *pilS*, *pic*, *pet*, *irp2*, *daa*, *aah*, *aid*, *cdtB* and *hlyA* - was carried out. PCR analysis revealed that four of the 35 EAST1EC strains harbored only *astA*, 24 harbored genes associated with adhesins and intestinal colonization, three strains harbored the gene for α -hemolysin, and 24 strains harbored the gene for a siderophore. These results indicated that some EAST1EC strains harbor various virulence genes associated with distinct *E. coli* pathotypes, primarily enterohemorrhagic *E. coli* and EAggEC, which may represent additional pathogenic determinants of EAST1EC.

1年にわたる気管支炎・肺炎の流行と検出ウイルスの推移

斎藤博之, 佐藤寛子, 秋野和華子, 藤谷陽子
安部真理子

病原微生物検出情報

32, 8, 2011, 18-19

ヘルパンギーナやインフルエンザといった特定の疾患に含まれない、いわゆる“かぜ症候群”の検体として、これまでは咽頭炎や上気道炎などの診断名のものが多数を占めていた。しかし、最近1年間（2010年5月～2011年6月）の病原体サーベイランス定点の小児科から持ち込まれた検体を俯瞰すると、咽頭炎・上気道炎由来のものが54検体であったのに対し、気管支炎、または肺炎と診断されたものが224検体と4倍以上にのぼり呼吸器感染症の様相が変化しつつあるように思われる。また、これらの下気道疾患の中で喘息の併記があるものが68検体と3割近くに及び、咳が遷延する傾向が推察される。本稿では、上記の気管支炎・肺炎由来の検体から検出されたウイルスの推移について報告する。

検体からは、ヒトメタニューモウイルス、パラインフルエンザウイルス、RSウイルスなどが検出されたが、2010年10月をピークとしたライノウイルスの流行が目立っている。この時期には診断名に喘息が併記された検体が多く、2010年9月（6検体）、10月（20検体）、11月（7検体）であった。ライノウイルスは基礎疾患を持たない子供に感染しても軽症で経過するのに対し、アレルギー等の喘息体質を持つ子供が感染すると気道狭窄を引き起こして重症化するなど、異なった病態を示すことが知られている。図2は検体添付の調査票に喘息の記載があったものと無かったもので検出ウイルスの差異を比較したものであり、ライノウイルスが喘息発症の重要な因子であることが見て取れる。今回の調査で“不検出”となった検体については、エンテロウイルス、アデノウイルス、インフルエンザウイルス（A型、B型）、及びマイコプラズマ・ニューモニエの検出も試みたが陰性であった。他の病原体の可能性も当然残るが、春から初夏にかけての検体で不検出のことが多いこと

から、花粉アレルギーで受診した患者のものが含まれていることも考慮すべきである。気管支炎・肺炎の多発傾向が一過性のもので終わるか、今後も定着するかについては継続的な調査で明らかになっていくものと思われる。

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

斎藤博之^{*}、東方美保^{*1}、岡 智一郎^{*2}、
片山和彦^{*2}、田中智之^{*3}、野田 衛^{*4}

病原微生物検出情報

32, 12, 2011, 4-6

平成9年に食品衛生法の中に初めてウイルスが登場し、ウイルス性食中毒という概念が確立したのは、歴史の一つの節目と言える。しかし一方で、カキ以外の一般的な食品からウイルスを検出する方法として、一応の標準としてポリエチレングリコール（PEG）沈澱法が存在していたものの手探りの状態が続いてきた。そこで平成19年から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）による研究の一環として、食品中のウイルスを検出するための実践的手法の開発に関する研究がスタートした。その結果、固形、液状、練り物、油物などの多種・多様な食品からノロウイルス（NoV）に代表される食中毒起因ウイルスを検出することができるパンソルビン・トラップ法（パントラ法）を開発し、ルーチンの食品検査として実施可能な段階に達してきたため、本稿にてその概要を紹介する。

パントラ法の基本原理は、食品乳剤中にウイルスに対する抗体を添加することにより、抗原抗体複合体を形成させ、それを黄色ブドウ球菌表面のプロテインAに吸着させることで、菌体とともにウイルス粒子を沈殿・回収することである。添加する抗体として、開発時にはGII/4型のNoVウイルス様粒子（VLPs）を免疫して作製したウサギ抗血清が用いられた。その後、実践使用のための安定的な抗体供給源として、市販ガンマグロブリン製剤を用いる汎用プロトコールが考案された。回収率はウサギで作製し

た特異的抗血清の1/3程度となるが（PCRでは2サイクル以内の差）、NoVの他の型や、サポウイルス（SaV）、A型肝炎ウイルス（HAV）などへも幅広く対応できるという利点がある。これまでのところ、ガンマグロブリン製剤は、NoVでは12遺伝子型（GI/3, GI/4, GI/8, GI/9, GII/2, GII/3, GII/4, GII/5, GII/6, GII/12, GII/13, GII/18）、サポウイルスではヒトに感染する4種類全ての型、他にA型肝炎ウイルスとアデノウイルス41型において有効であることを確認している。また、流通食品が疑われる大規模・広域事例では、最初に感染して回復した人の血清を用いることも可能である。当事者の協力が得られることが大前提となるが、不幸にして社会問題に発展した場合には原因究明のための選択肢の一つとなるであろう。

以上のとおり、パントラ法は食品検体から調製された乳剤を濃縮・精製してRNA抽出液を得る段階までを担保するものであり、それ以降の逆転写反応やPCRについては既報に従うことになる。多くのケースでは逆転写反応前にDNase I処理を行っているが、 α -Amylaseも同時に添加することで検出効率が向上する。また、ランダムプライマーよりも、特異的プライマーを用いて逆転写反応を行った方が、検出効率は高い。ポテトサラダと焼きそばを、NoV-GII/4で汚染したモデル食品に作製（様々な汚染レベルのもの）し、ガンマグロブリン製剤を用いたパントラ法で抽出したRNAからnested PCR（1st.PCR: COG2F/G2-SKR, 2nd.PCR: COG2F/COG2RによるReal-time PCR）による検出を試みたところ、いずれも食品1g当り35コピーの汚染レベルのものまで検出できた。2nd.PCRの段階でReal-time PCRを用いると結果は定性扱いとなるが、ゲル電気泳動をハイブリダイゼーションで確認したのと同義であることから、タイムプレッシャーの中で高感度を求められる局面においては効果的と考えられる。

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

食品中のノロウイルス検出の汎用化を目指したパンソルビン・トラップ法の開発

斎藤博之

日本食品微生物学会雑誌

29, 1, 2012, 32-37

平成9年に食品衛生法の中に初めてウイルスが登場して以来、糞便検体に対する検査技術は長足の進歩を遂げ、簡易検査キットによるベッドサイド診断も可能となっている。一方、食品検体からのウイルス検出は困難を極め、「糞便は検査できるが、食品の検査は難しい」といった状態のまま10年が経過した。そこで平成19年から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）による研究の一環として、食品中のNoVを検出するための実践的手法の開発に関する研究がスタートした。その結果、パンソルビン・トラップ法（パントラ法）を開発し、固形、液状、練り物、油物などの多種・多様な食品からNoVを検出することが可能となった。

開発段階では様々な反応条件を最適化するために系を単純化する必要があり、NoV-GII/4型で汚染させた市販食品をモデル食品とした。添加する抗体としてGII/4型のNoVウイルス様粒子（VLPs）を免疫して作製したウサギ抗血清（国立感染研ウイルス第2部第1室において作製）を用いて検討した。しかし、このようにして作製された抗血清は理論上の裏付けはあるものの絶対量が少なく、全国の食中毒事例に対応するには全く足りないという問題に直面した。多くの検討を重ねた末に、1万人単位でプールされた血漿から製造・販売されているガンマグロブリン製剤を利用することでこの問題を解決することができた。これまでのところ、ガンマグロブリン製剤は、NoVでは13遺伝子型（GI/3, GI/4, GI/8, GI/9, GI/14, GII/2, GII/3, GII/4, GII/5, GII/6, GII/12, GII/13, GII/18）、サポウイルスではヒトに感染する4種類全ての型、他にA型肝炎ウイルスとアデノウイルス41型において有効であることを確認している。

食品からのウイルス検出法は、10年以上にわたって世界中で検討が重ねられてきているテーマであり、原理の異なる様々な手法が考案され

ている。本稿で紹介したパントラ法は、最初から日常業務に取り入れることを前提として設計されたものであり、ある意味一つの完成形と言える。高速冷却遠心機等の大型機器を使わないことや、必要な全ての試薬を市販品として入手できることは導入が容易であることを意味している。運用面においては、パントラ法は言わば“骨格プロトコール”であって、抗体等の添加試薬はそれぞれの事情に応じて入れ替えられるように柔軟性を持たせてある。今後は実事例を積み重ねながら、随時改良を加えていくことになるが、そのためにもできるだけ多くの機関で使われることを期待している。

地方都市における Oral sex 経験者の N. gonorrhoeae および C. trachomatis の検出状況

佐藤寛子, 柴田ちひろ,

能登 彩^{*1}, 能登 舞^{*2}, 能登宏光^{*3}

日本性感染症学会誌, 12, 1, 2011, 99-107

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

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

秋田県健康環境センター年報
第 7 号 2011

発行日 平成 24 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
