Ⅳ　発表業績

1. 学会発表

各種血清群の腸管出血性大腸菌の酵素基質培地における生育性およびコロニーの特徴的形態の検討

齊藤志保子　古川一郎[*1]　磯部順子[*2]
長尾清香[*3]　小林直樹[*3]　工藤由起子[*3]

第 106 回日本食品衛生学会
2013 年 11 月，沖縄市

腸管出血性大腸菌の食品における検査法は，血清群 O26，O103，O104，O111 および O157 について個別に通知されているものの，対象食品が限定されており，統括的な検査法が必要とされている。また，上記以外の日本における重要な血清群についても食品の検査法を確立する必要がある。このことから，多血清群に有用な選択分離培地を検討するため，酵素基質培地における各種血清群の鑑別性を検討した。

腸管出血性大腸菌供試菌株は日本での重要な血清型である O157，O26，O111，O103，O121，O145，O165 の 7 種合わせて 110 株，また，他 25 種の O 血清群 44 株，計 154 株（VT 陰性株 7 株含）。酵素基質培地は 10 種類の平板培地を使用した。TSB で前培養した菌株を酵素基質培地に画線し，37℃24 時間培養後，生育コロニーの色・形態を観察した。

重要血清群のうち O165 については選択剤の入った 4 種類の酵素基質培地全てで不発育であったことからさらに適当な選択剤の検討が必要であると考えられた。O165 以外の重要な 6 血清群（O157，O26，O111，O103，O121，O145）では，それらが同一または類似の色調で生育し，選択剤によって他血清群が抑制される培地，また，各血清群でコロニーの色調にある程度の特徴が見られる培地が認められた。完全な鑑別は困難であるが，色調の傾向は今後の効率的な検査法の構築に有用な情報と考えられた。

[*1]：神奈川県衛生研究所
[*2]：富山県衛生研究所
[*3]：国立医薬品食品衛生研究所

秋田県で分離された非定型的な単相性サルモネラ 07:-:1,5 の解析

今野貴之

第 67 回日本細菌学会東北支部総会
2013 年 8 月，仙台市

平成22年に秋田県内の医療機関等から収集したサルモネラ37株のうち，4株が抗血清を用いた血清型別法によりO7:-:1,5と判定され，血清型名が不明となった。今回，このO7:-:1,5の血清型を解明するため，サルモネラのH1抗原遺伝子の検出をPCRにより行った。また，pulsed field gel electrophoresis（PFGE）を行い，菌株間の関連性を調査した。

これまでの秋田県でのサルモネラの分離状況から，O7:-:1,5になりうる血清型として，CholeraesuisもしくはParatyphi C（H1:c），Infantis（H1:r），Thompson（H1:k），Bareilly（H1:y）を想定し，これらのH1抗原の遺伝子に特異的なプライマーを設計し，PCRを行った。また，PFGEは制限酵素として*Not*I と*Xba*Iを用いて行った。

O7:-:1,5の4株はいずれもH1:kに特異的なPCRに陽性を示したことから，Thompsonの単相変異株と考えられた。4株の分離された地域は3株が秋田県北部，1株が秋田県中央部であったが，いずれのPFGEパターンも同一であった。また，同期間内に秋田県北部で分離されたThompsonもこれらの単相変異株と同一なPFGEパターンを示しており，O7:-:1,5株はこの地域に侵淫するThompsonから生じたと考えられた。従来の血清型別法で型別できない非定型的な単相性サルモネラの存在は，食中毒及び感染症の正確なサーベイランスに支障となることから，公衆衛生上の重要な問題である。PCRによる抗原遺伝子の検出は，従来の血清型別法で抗原を検出できないような場合でも有効であり，サルモネラの正確な血清型別に役立つと考えられた。

秋田県における莢膜型インフルエンザ菌の分離状況について

今野貴之

第 62 回感染症学会東日本地方会

2013 年 10 月，東京都

インフルエンザ菌（*Haemophilus influenzae*）は, 1×0.3 μm ほどの多形性のグラム陰性桿菌で，菌体の表面に莢膜と呼ばれる構造を持つ菌と持たない菌が存在し，莢膜は血清学的に a～f の 6 型に分けられる。特に b 型（Hib）は小児の細菌性髄膜炎等の侵襲性感染症の起因菌として知られている。平成 20 年 12 月からの小児向け Hib ワクチンの販売開始により，ワクチンに含まれない b 型以外による侵襲性感染症の増加が懸念されており，本菌による感染症の今後の発生動向が注目されている

平成 20 年～24 年の 5 年間に秋田県内の医療機関から分与されたインフルエンザ菌 666 株の莢膜の血清型を調査した。また，本菌は β-lactamase の産生やペニシリン結合タンパク質（PBP3）の変異による薬剤耐性化が問題となっていることから，莢膜型インフルエンザ菌と判定された菌については，薬剤耐性に関連する遺伝子の保有状況も調査した。

その結果，43 株の莢膜型インフルエンザ菌を確認し，秋田県では b 型と同様に e 型の分離が多い実態を明らかにした。また，今回確認した莢膜型インフルエンザ菌の多くが PBP3 に変異を有し, β-lactamase-negative ampicillin-resistant *H. influenzae* (BLNAR)に該当することが分かった。

食品検体からパンソルビン・トラップ法で抽出したノロウイルス RNA の検出系に関する検討

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 34 回日本食品微生物学会学術総会
2013 年 10 月，東京都

パンソルビン・トラップ法（パントラ法: 斎藤博之, 日本食品微生物学会雑誌, **29**, 1, 32-37, 2012）は，食品検体からノロウイルス(NoV) を検出するための実践的な手法である。本法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。ブ菌の遺伝子は，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，検出感度の向上に寄与している。その一方で，大量に存在するブ菌の遺伝子が干渉して，検出された NoV 遺伝子の解析が困難となる場合も多い。さらに，RT-PCR の反応系（酵素の種類や反応温度など）によっては著しく感度が低下することもある。本研究は，パントラ法によって抽出された NoV-RNA の検出系を最適化し，遺伝子解析も可能な手法とすることを目的としている。

ランダムプライマーを用いて逆転写反応を行った場合には，NoV 特異的な増幅が認められなかった。PCR と共通のプライマーを用いた場合は，NoV 遺伝子の増幅が認められたものの，ノイズが多く塩基配列の解析は不可能であった。逆転写反応専用プライマーを用いると，35 コピー/g の汚染レベルまで増幅バンドが認められ，塩基配列を確認したところ添加したウイルスと同一の配列であった。PCR の最適化のために 32 種類の耐熱性ポリメラーゼを比較検討したところ，パントラ法抽出物存在下では，ホットスタートが必須であること, Mg 濃度の最適化も必要であることが明らかになった。6 種類の逆転写酵素の比較検討では，37℃から 42℃での cDNA 合成は非特異反応に阻害され，十分な感度が得られなかった。55℃からは非特異反応が減少し，58℃では認められなくなった。このことから NoV-RNA に特異的な逆転写反応は 58℃で最適化された。本研究による PCR と逆転写反応の比較検討により，最適化条件を確定した。ここで得られた成績は，食品のノロウイルス検査にパントラ法を導入する際に有用と考えられた。

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

若い女性における子宮頸がん検診受診率向上を目指した取り組みに関する検討

田中貴子

第 72 回日本公衆衛生学会総会
2013 年 10 月，三重県

秋田県の子宮頸がん検診受診率向上に資する基礎資料を得ることを目的に，若い女性の意識調査を実施し解析した。

秋田県内の20歳～30歳代（平均年齢26.0歳）の女性28名（子育てママグループ7名，会社員グループ7名，大学生グループ14名）を対象に，平成24年2月にフォーカスグループインタビュー法を用いて実施した。主な討議テーマはA.子宮頸がん検診に関する受診者及び未受診者の行動。B.子宮頸がん及び子宮頸がん検診に関する情報，啓発。C.子宮頸がん検診に関する社会環境整備等であった。

子育てママグループからは，A.結婚や妊娠を契機に受診した。B.若い人達への教育・啓発が必要。C.地元で集団検診を受けたい。子育て世代の女性が受診しやすい工夫や社会環境が必要。会社員グループからは，A.未受診の理由は，忙しい，面倒だ，検診のイメージが湧かない。C.受診しやすい職場の体制や雰囲気が大切。無料クーポン券が十分に活用されていない。大学生グループからは，A.未受診の理由は，ただ何となく。B.無料クーポン券が届いて初めて二十歳になったら検診を受けるという事を知った。C.学校帰り検診，平日の夜遅くまで受診可能な体制を希望する等の知見が得られた。

今回，異なるグループから，「身近な所で集団検診を受けたい」という同様の結果が得られたことから，より強く住民の意識を反映していることが示唆された。今後の受診率向上には，1.地域，職場，学校等における集団検診及び医療機関検診の充実を図り，若い世代の女性が受診しやすい時代に合わせた検診の社会環境を整えていく。2. 無料クーポン券の継続と充実を図り，健康意識の醸成及び確実な利用を促すことが大切であると考えられた。

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

平成 25 年度地方衛生研究所全国協議会
北海道・東北・新潟支部総会
2013 年 7 月，仙台市

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。今回「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するとともに現在の保健師活動について考察した。

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，近年はがん予防をテーマに行政ニーズを踏まえた生活習慣病予防の調査研究に取り組んできた。また結核登録者情報調査では，結核月報・年報報告を実施し，集計解析結果を会議や研修会資料として提供，保健所との連携による感染拡大防止の監視，出前講座・ホームページへの掲載による一般への普及啓発を図ってきた。その他の公衆衛生情報業務として，死亡統計を用いた秋田県の疾病状況の解析，報告書の作成配布等により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，保健師は主体的かつチームの一員としてその能力を十分に発揮できる可能性があると思われる。

パンソルビン・トラップ法によって得られたノロウイルス RNA の効率的な検出に関する検討

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 61 回日本ウイルス学会学術集会
2013 年 11 月，神戸市

パンソルビン・トラップ法（パントラ法: 斎藤博之，日本食品微生物学会雑誌，**29**，1，32-37，2012）は，食品検体からノロウイルス(NoV) を検出するための実践的な手法である。本法はウ

イルス粒子の回収に黄色ブドウ球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。黄色ブドウ球菌の遺伝子は，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，検出感度の向上に寄与する一方，RT-PCRの反応系（酵素の種類や反応温度など）によっては妨害物質ともなり得る。本研究では，パントラ法によって抽出されたNoV-RNA検出系の最適化を試みた。

NoV-GII.4型のcDNAのみを段階希釈したものについて，32種類の耐熱性ポリメラーゼは，ほぼ同様の検出感度を示した。しかし，パントラ法由来共雑核酸を加えた検討では，耐熱性ポリメラーゼ製品により検出感度に大きな隔たりがあった。パントラ法抽出物存在下では，ホットスタートが必須であること，Mg濃度の最適化も必要であることが明らかになった。6種類の逆転写酵素の比較検討では，37℃から42℃でのcDNA合成は非特異反応に阻害され，十分な感度が得られなかった。55℃からは非特異反応が減少し，58℃では認められなくなった。このことからNoV-RNAに特異的な逆転写反応は58℃で最適化された。本研究によるPCRと逆転写反応の比較検討により，最適化条件の決定に成功した。ここで得られた成績は，食品のノロウイルス検査にパントラ法を導入する際に有用と考えられた。

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

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

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106回日本食品衛生学会学術講演会
2013年11月，宜野湾市

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。パントラ法にはウイルス粒子の回収に黄色ブドウ球菌が用いられていることから，得られたRNAサンプルは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，検出されたNoV遺伝子の解析が困難であったり，RT-PCRの反応系（酵素の種類や反応温度など）によって，検出感度に大幅な差異が生じたりするなど，実際の食中毒事例に適用するためには解決すべき問題点が残っている。本研究は，パントラ法によって抽出されたNoV-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。

ランダムプライマーを用いて逆転写反応を行った場合には，NoV特異的な増幅が認められなかった。PCRと共通のプライマーを用いた場合は，NoV遺伝子の増幅が認められたものの，ゲルから切り出したバンドをシークエンスすると，ノイズが多くて判読不能か，黄色ブドウ球菌の配列が検出された。逆転写反応専用プライマーを用いると，35コピー/gの汚染レベルまで増幅バンドが認められ，塩基配列を確認したところ添加したウイルスと同一の配列であった。PCRの最適化のために32種類の耐熱性ポリメラーゼを比較検討したところ，パントラ法抽出物存在下では，ホットスタートが必須であること，マグネシウム濃度の最適化も必要であることが明らかになった。6種類の逆転写酵素の比較検討では，37℃から42℃でのcDNA合成は非特異反応に阻害され，十分な感度が得られなかった。55℃からは非特異反応が減少し，58℃では認められなくなった。このことからNoV-RNAに特異的な逆転写反応は58℃で最適化された。本研究によるPCRと逆転写反応の比較検討により，パントラ法で得られたRNAサンプルに対するRT-PCRの最適化条件を確定することができた。ここで得られた成績は，食品検体のノロウイルス検査にパントラ法を導入する際に有用と考えられた。

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

タイ王国における食品の安全キャンペーン

と、食品中のウイルス検査法としてのパンソルビン・トラップ法の導入

斎藤博之　　Ratigorn Guntapong[*1]
武田直和[*2]

第 23 回秋田応用生命科学研究会
2013 年 11 月，秋田市

我が国の感染症対策の一環として，海外からの持ち込みを防止する一方で，流行地においてより積極的な病原体封じ込めを目指す試みが続けられている。文部科学省は，2005～2009 年にかけて新興・再興感染症研究拠点形成プログラムを実施し，8 途上国に 13 研究拠点を開設した。2010 年より，感染症研究国際ネットワーク推進プログラム（J-GRID）がスタートし，各研究拠点が運用されている。タイにはそれらの拠点の一つである日本タイ感染症共同研究センターが置かれている。2012 年にタイ政府主導で食品の安全キャンペーンが開始され，その事業の一つには食品中のウイルスを検出する方法の導入が含まれている。タイ NIH より現地拠点センターを通して依頼があったことから，秋田県健康環境センターで開発されたパンソルビン・トラップ法について技術指導を行った。今回の講演会ではその導入事例について紹介する。

パンソルビン・トラップ法の技術指導の題材として，グリーンカレー・チャーハン・アイスクリーム・カキをノロウイルスで汚染させたものを用いた。題材に供したウイルス汚染食品からは，いずれもノロウイルスが検出できた。ここで用いた食品は濁質が多く，パンソルビン・トラップ法が最も効果を発揮するケースであると考えられた。また，逆転写反応専用プライマーは，技術指導直前に設計・検証されたものであったが，問題なく用いることができた。タイにおいては，ノロウイルスよりも危険度の高い A 型肝炎ウイルスによる食品汚染対策に重点が置かれているが，ガンマグロブリン製剤を用いた汎用パンソルビン・トラップ法が有効であることから，今後も貢献できるものと考えている。

[*1]：タイ王国 NIH
[*2]：大阪大学・日本タイ感染症共同研究センター

秋田県雄物川流域におけるアカツツガムシ生息域調査

佐藤寛子　　柴田ちひろ　　齊藤志保子
門馬直太[*1]　　東海林章[*2]　　高橋　守[*3]
藤田博己[*4]　　角坂照貴[*5]　　高田伸弘[*6]
高野　愛[*7]　　川端寛樹[*7]　　安藤秀二[*7]

第 22 回秋田応用生命科学研究会
2013 年 5 月，秋田市

2008 年，秋田県において 15 年ぶりにアカツツガムシ媒介性の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。つつが虫病予防の啓発のため，今後もアカツツガムシ生息状況のモニタリングや病原体保有の有無等の調査を継続し，地元自治体および保健所への情報提供が必要と考えられる。

[*1]：福島県衛生研究所
[*2]：青森県保健環境センター
[*3]：松山女子校・埼玉医大

*4：大原綜合病院附属大原研究所・馬原アカリ研究所
*5：愛知医科大学
*6：福井大学
*7：国立感染症研究所

IP 法に使用する抗原の最適化に向けた検討，確実な診断へ向けて

佐藤寛子　　柴田ちひろ　　斎藤博之
須藤恒久*1

第 21 回ダニと疾患のインターフェース
2013 年 6 月，稚内市

つつが虫病の抗体検査診断において，秋田県健康環境センターでは，これまで標準 3 株を抗原として使用してきた。しかし，このうち患者の感染型が Gilliam 型あるいは Karp 型である場合，抗体価上昇あるいは感染型の確認ができるまで 10 病日以上を要することがあった。本県では Karp 型感染例が圧倒的に多いことから，早期の感染型究明のため，標準 3 株および国内分離株 4 種を抗原とした IP 法を実施し，その抗体価について比較検討した。

検討した 20 例中，抗体上昇が認められたのは 6 例であった。これらの標準株を抗原とした抗体検査では，IgM 抗体価においては 1 例が Karp 型感染と判明したが，5 例は Gilliam 株あるいは Kato 株に対する抗体価との有意差がなく，感染型が不明であった。同じく IgG 抗体価では 6 例中 3 例が Karp 型と判定されたが 3 例は不明であった。一方，国内分離株を抗原とした抗体検査では，IgM 抗体価においては 6 例中 6 例全てが JP-1 型あるいは JP-2 型感染と判明したが，両者の抗体価に有意差はなかった。この現象は IgG 抗体価でも同様で，6 例全例が JP-1 型あるいは JP-2 型感染と判定された。

また，これら Karp 型感染 6 例の JG に対する IgM および IgG 抗体価は，Giliiam のそれよりも有意に低く，最大で 64 倍の差が認められた。JP-1 および JP-2 に対する IgM および IgG 抗体価は，Karp のそれよりも有意に高く，最大で 16 倍の差が認められた。Gilliam，Karp 株の抗原性は，国内の患者由来である JG 型株，JP-1 型株および JP-2 型株と異なることが指摘されていたが，実際に複数の患者血清による抗体価の比較で差異が確認された。国内の患者由来株を利用した抗体検査は，より早期の抗体検出が期待できるため，今後のルーチン検査においては，国内の株を使用する事が望ましいと思われる。

*1：秋田大学

患者およびマウスの血中 *Orientia tsutsugamushi* コピー数の定量

佐藤寛子　　川森文彦*1　　藤田博己*2
安藤匡子*3　　門馬直太*4

第 6 回日本リケッチア臨床研究会・
第 20 回リケッチア研究会合同研究発表会
2014 年 1 月，大津市

毒性の異なる 2 種の *Orientia tsutsugamushi*（Ot）株について濃度を変え ICR マウスおよび ICR-Nude マウス 8 匹に各々接種し，致死毒性の確認と共に血中 Ot コピー数を経時的に定量した。さらに，秋田県で 2011 年～2013 年に発生したつつが虫病患者のうち，急性期の血液が全血で凍結保存されていて Ot が検出された 26 例（DIC 併発/治療前 8 例と DIC 併発/治療後 4 例ならびに DIC 非併発/治療前 14 例）についても定量し同様の比較を行った。

強毒性の kato 型 Kakuma-2 株の接種系における ICR-マウスの Ot 検出開始は，接種後 1 日目～2 日目で，その後コピー数は増加し，9 日目～10 日目にマウスが衰弱不動となり殺処分とした。この時点での血中 Ot コピー数（/ml）は 1.0～1.1 E5 であった。

一方，弱毒性の Shimokoshi 型 Matsui 株の接種系での Ot 検出開始は，接種後 2 日目～5 日目であったが，その後コピー数に顕著な増加がなく，7.1 E3/ml を最高値とし 11 日目以降は不検出となり，マウスは 1 ヶ月間生存した。ICR-Nude マウスも同様に Kakuma-2 株と Matsui 株を接種したところ，両群共に死亡したが，死亡時の Ot コピー数は，ICR マウスに比較して Kakuma-2 株が約 10 倍，Matsui 株が 100～1000 倍であった。強毒性の Kakuma-2 株は，弱毒性の Matsui 株よりも ICR 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）では，それぞれ，2.5 E3～3.1 E4/ml，2.0 E3～2.4 E4/ml であり，共に平均値は 1.1 E4/ml であった。一方，DIC 併発/治療前例（同 4.0 日）は 3.2 E4～5.6 E5/ml，平均値 2.3 E5/ml と DIC 併発/治療後および非併発/治療前例の約 20 倍であった。血清抗体価から 26 例は全て Karp 型感染例と判断されたが，このうち DIC 併発/治療前の 5/8 例，DIC 非併発の 3/14 例が JP-1 型感染であり，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：鹿児島大学共同獣医学部
*4：福島県衛生研究所

ウシ早期初乳のウイルス不活化効果に関する検討

柴田ちひろ　　加藤真姫子*1　　伊藤　隆*2

第 23 回秋田応用生命科学研究会
2013 年 11 月，秋田市

ウシの分娩直後の初乳には，様々な病原体に対する抗体や不活化成分が含まれているとの報告がある。そこで，間接接触感染により感染が拡がるインフルエンザウイルスおよびエンテロウイルスに対するウシ早期初乳の不活化効果について検討した。

インフルエンザウイルスに対する HI 試験の結果，AH3 型についてはワクチン株由来抗血清に匹敵するような値を示す検体もあるほど良好な結果が得られた一方で，AH1pdm09 型と B 型については一部の検体で HI 価が確認されたものの，AH3 型と比較して劣る結果であった。検討条件としてウイルスの血球凝集能を揃えていたが，株により凝集能には差があることから，実際に含まれていたウイルス量は各型で異なっていた可能性がある。よって HI 価の差がそのまま有効性の差であるとはいえず，手指汚染で想定される少ないウイルス量に対しては十分に不活化効果が期待できるものと考えた。エンテロウイルスに対する中和試験では，マウスを用いた動物試験，HEAJ 細胞による細胞培養試験のいずれにおいても，それぞれ死亡率，細胞変性出現率の低下が確認され，エンテロウイルスに対する不活化効果が確認された。早期初乳を添加剤とすることで手指用衛生用品にウイルス不活化効果を付加できれば，簡便な感染症予防対策として活用できるだけではなく，膨大な資源の有効活用にも繋がる。今後も他のウイルスに対する効果など検討を重ねたい。

*1：畜産試験場
*2：中央家畜保健衛生所

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

小林貴司　　岡野邦宏*1　　菅原　剛
宮田直幸*1

第 48 回水環境学会
2014 年 3 月，仙台市

難分解性である 1,4-ジオキサンは一般的な処理工程では処理が難しいとされていたが，県内の廃水処理施設において特異的に効率よく分解処理されていることがわかってきた。分解処理は生物処理工程の活性汚泥によるものであり，水温や流入水の変化による影響を受けやすい。そのため，活性汚泥の状態を把握し施設運用の指標とするために，活性汚泥が有する 1,4-ジオキサン分解能を評価する手法を検討した。評価は，活性汚泥試料 500 ml に対し，1,4-ジオキサン 1 mg 相当を添加し，好気条件下で撹拌，定期的に 1,4-ジオキサン濃度を測定し，減少速度から活性汚泥が持つ 1,4-ジオキサン分解能を評価した。試験条件としては，温度や 1,4-ジオキサン添加量が減少速度に大きく寄与していた。

*1：秋田県立大学

GC-MS/MS を用いた農作物中の残留農薬一斉分析法の検討

天明さおり　　珍田尚俊　　小林貴司

第 36 回農薬残留分析研究会
2013 年 10 月，秋田市

秋田県では，県内流通食品の安全・安心を確保するために，農作物を中心とした食品中の残留農薬検査を行っている。

平成 18 年 5 月のポジティブリスト制度施行以降，当センターでは検査項目を拡充し，GC/MS から GC-MS/MS に切り替え，農薬約 300 成分の一斉分析法を実施してきた。

今回，さらに効率的で高精度な一斉分析法にするため，簡易迅速法である QuEChERS 法の採用を検討した。

QuEChERS 法は 1 回の抽出操作とバッチ精製により迅速化を図っている。しかし，農薬や食品の種類によっては，抽出及び精製不足が懸念された。そこで，抽出を 2 回繰り返し，複数の固相カラム（C18，SAX/PSA，GC/PSA）を用いて精製する方法に改良した。

改良した方法について，なす，ほうれんそう，きゅうり，トマト，玄米，りんごの添加回収試験を実施した（添加濃度：50 ng / g，各 n = 3）。その結果，各食品において，8 割以上の成分で回収率 70～120%以内，併行精度 20%以下となり，概ね良好な結果が得られた。

QuEChERS 法の改良と GC-MS/MS 導入により，1 検体あたりの分析時間を従来の約 6 割程度まで短縮し，より高精度な分析が可能となった。

発色剤無添加食肉製品から検出された亜硝酸根について

小川千春　　大友久利

平成 25 年度地方衛生研究所全国協議会
北海道・東北・新潟支部衛生化学研究部会総会
2013 年 10 月，札幌市

平成 24 年度の食品収去検査において，発色剤の原材料表示がない加熱食肉製品から亜硝酸根が 0.004 g/kg（使用基準：0.070 g/kg 以下）検出される事例があった。保健所では使用した食品添加物の表示義務違反を疑い，製造所へ立入検査を行ったが，発色剤の使用は確認できなかった。そこで，発色剤を添加していない加熱食肉製品から亜硝酸根が検出された原因を究明するための検討を行った。

まず，亜硝酸根がどの製造工程で混入したかを確認するため，製造工程ごとに食肉の亜硝酸根濃度の測定を行った。その結果，亜硝酸根は原材料及び漬け込み液に漬け込んだ後の食肉からは検出されず，出来上がった製品からのみ検出された。このため，亜硝酸根の混入は，漬け込み後の乾燥・燻製の工程で生じていると考えられた。

次に，食肉製品中の亜硝酸根濃度の分布を確認するため，製品の内側と外側の部位別に測定を行った。通常，発色剤は調味液などと混合して食肉の内部に注入するため，製品の内側のほうが外側よりも亜硝酸根濃度が高くなる。しかし，亜硝酸根は，製品の内側からは検出されず，外表面からのみ検出されたため，外部から食肉表面に付着したものであることがわかった。

以上から，本事例で検出された亜硝酸根は発色剤として添加したものではなく，乾燥・燻製の工程で，燃料及び空気中の窒素の酸化により発生した窒素酸化物が食肉表面に吸着・溶解して亜硝酸根となったものと考えられた。

玉川酸性水に対する実証的中和の効果

成田修司　　生魚利治　　佐藤　健
大渕志伸　　布田　潔[*1]　　宮田直幸[*2]

第 48 回日本水環境学会
2014 年 3 月，仙台市

秋田県仙北市に位置する玉川源泉の大噴は世界的にも珍しい硫酸-塩酸，鉄（Fe）（Ⅱ）を主成分とし，pH 約 1.2 の強酸性水 9,000 L/min を湧出している（図）。平成 3 年から現在の玉川中和処理施設が運転を開始することにより，源泉下流域及び田沢湖の pH が改善されてきたが，平成 14 年頃からの玉川源泉の酸度上昇に伴い，

pH が低下してきた。当センターではこの pH 低下が源泉由来の湯川を流下する未処理の強酸成分と源泉に含まれる鉄成分等の加水分解に伴う H^+の発生（式）によることを報告してきた 1,2)。この pH 低下を改善するためには，上記二つの未処理酸性成分の処理が必要と考えられる。そこで以下の中和実証試験を行い，下流域にもたらされた中和効果について報告する。

$$Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+},\ Fe^{3+} + 3H_2O \rightarrow Fe(OH)_3\downarrow + 3H^+ \quad (式)$$

中和実証試験は，平成 25 年 10 月に実施した。湯川から流入する源泉由来の未処理強酸成分（pH 約 2，流量 20,000 L/min）を中和するために，地点①（図 1）において酸化カルシウム（CaO）を用い pH（7±1）にコントロールし，その pH 変化を図に示す。

湯川から流入する源泉由来の未処理強酸成分を中和処理することによって，すべての地点で pH が改善していた（図）。また，同試験における流域の総酸度は（表），すべての地点で減少が観測された。特に，地点②では試験前 355 mg/L であった総酸度が試験中は 256 mg/L に減少し，地点③における試験前の濃度（262 mg/L）と近い値を示した。これらの結果は，源泉由来の鉄等の加水分解反応（式）を通常よりも上流側で促進させ，同反応域を上流にシフトさせることによって，玉川源泉下流域の pH 改善と総酸度の低下が促進されたことを意味する。

*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学部

参考文献

1）成田ら（2011），第 45 回日本水環境学会年会講演集，20.
2）成田ら（2012），第 46 回日本水環境学会年会講演集，531.

表　中和実証試験における総酸度の減少挙動

	総　酸　度 (mg/L)				
地点	①	②	③	④	⑤
試験前	210	355	262	155	74.9
試験後	3.0	256	231	134	67.0

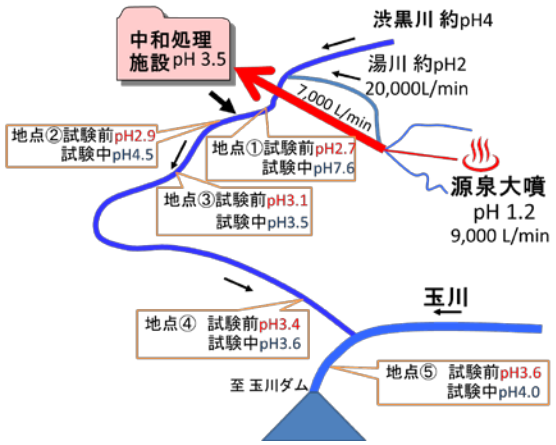

図　玉川水系の概要と中和試験による pH 改善

2. 他誌掲載論文

秋田県における莢膜型 *Haemophilus influenzae* の分離状況

今野貴之　　髙橋志保　　熊谷優子
樫尾拓子　　和田恵理子
八柳　潤　　齊藤志保子

Infectious Agents Surveillance Report, **34**,7, 2013, 192-193.

平成20年～24年の5年間に秋田県内の医療機関から当センターに送付された *H. influenza* 666株の莢膜型を調査した。

capsular export gene *bexA*（＋）により莢膜型と判定されたのは計43株であり，内訳はｂ型19株，ｅ型16株，ｆ型7株，型別不能1株であった。型別不能であった1株は，*bexA* の相同性解析によりｂ型と考えられた。

次に，PCRによりβ-lactamase（*bla*）遺伝子ならびにpenicillin binding protein 3（PBP3）をコードする遺伝子（*ftsI*）の変異を解析し，β-lactamase遺伝子型別（*bla*TEM，*bla*ROB）及びβ-lactamase-non-producing ampicillin-resistance（BLNAR）group Ⅰ，II，III に対応する *ftsI* の型別を実施した。健康環境センターへは薬剤耐性菌を疑う菌株が送付されてくることが多いため，結果は必ずしも莢膜型 *H. influenzae* の耐性化率を示すものではないが，確認された多くの莢膜型 *H. influenzae* がBLNARであり，また小児科領域の眼脂由来のｂ型1株からは *bla*TEMも検出された。

稀な血清型Agbeniが同定された３件のサルモネラ感染事例の解析

今野貴之　　髙橋志保　　熊谷優子
樫尾拓子　　和田恵理子
八柳　潤　　齊藤志保子

Infectious Agents Surveillance Report, **35**, 3, 2014, 80-81.

稀なサルモネラ血清型Agbeniの感染事例を3件確認した

分離された3株は市販の抗血清を用いた血清型別でO13群，H1抗原がg,m，H2抗原は検出されなかった。血清型を特定するため，O13群の副抗原（O22，O23）の検出と，PCR法によるサルモネラ属菌及び亜種Ⅰの確認と各抗原遺伝子の確認を行い，血清型Agbeni (1, 13, 23: g, m, [t]: -)と同定した。

また，Kirby-Bauer法による感受性試験を行ったところ，3株はいずれも供試したアンピシリン，ホスホマイシン，ノルフロキサシン，ゲンタマイシン，テトラサイクリン，クロラムフェニコールの6剤にはすべて感受性であった。

PFGEにより菌のDNAパターンを比較したところ，*Not*Iではいずれも同一，*Xba*Iでは1株がバンド1本異なるのみで，事例間の関連性が疑われた。医療機関からの情報によると，初発の患者は直近にミドリガメを飼育し始めたとのことであり，感染源としてはこのミドリガメが強く疑われた。

血清型の同定は感染症の発生動向を知る上で非常に重要である。しかしながら，サルモネラの血清型は複雑で，複数回の培養が必要なため時間を要する。今回PCR法による型別を行ったところ，従来の血清型別法と一致した結果が得られた。PCR法は，複数の抗原遺伝子を同時に検出できるため，迅速に血清型を推定することが可能と思われる。また，今回の事例のように稀な血清型が同定された場合は，従来の血清型別法と組み合わせることでより正確な血清型の同定に役立つと考えられた。

Determination of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Serotype O165:HNM Infection in A Hemolytic Uremic Syndrome Patient with Adenovirus Serotype 41

Takayuki Konno, Jun Yatsuyanagi, Shiho Takahashi, Yuko Kumagai, Eriko Wada, Machiko Chiba, Shioko Saito

Jpn. J. Infect. Dis., **66**, 5, 2013, 394-397.

A 4-year-old girl who was positive for adenovirus according to a rapid immunochromatographic test conducted at a hospital, progressed to hemorrhagic diarrhea and hemolytic uremic syndrome (HUS). The presence of adenovirus serotype 41 (AdV-41) was confirmed by TaqMan real-time PCR and sequence analysis. However, most enteric viral infections cause mild to moderate diarrhea. In the present case, enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) O165:HNM was isolated concomitantly with AdV-41. In addition, O165 antibody was specifically detected in patient sera. The EHEC isolate was positive for the virulence genes *stx1*, *stx2a*, *eae* type ε, *ehxA*, and *norV*. Therefore, we concluded that EHEC O165:HNM was the precise pathogen leading to HUS in this patient.

玉川酸性水中和処理におけるシュベルトマナイト様化合物の形成によるヒ素及びクロムの取り込み

佐々木純恵　　成田修司　　菊池由紀恵[*1]
布田　潔[*1]

水環境学会誌, **36**, 5, 2013, 137-141.

玉川中和処理施設を含む玉川上流域の詳細な調査を行い，茶褐色の堆積物を本処理施設放流口で発見した。その堆積物が関与する源泉中のヒ素（As）及びクロム（Cr）の濃度低下の現象について検討した。この堆積物は，粉末 X 線回折（XRD），赤外線吸収スペクトル（FT-IR）分析によりシュベルトマナイト（Sch）様化合物であることが明らかとなった。源泉に含まれる鉄（Fe）150 mg･L^{-1}，As 2.8 mg･L^{-1}，Cr 0.093 mg･L^{-1} の濃度は，中和処理放流水で Fe 55 mg･L^{-1}，As 0.75 mg･L^{-1}，Cr 0.025mg･L^{-1} に減少した。また，本処理施設放流口の堆積物中には Fe 39 wt.%，As 1.7 wt.%，Cr 0.020 wt.%が含有していた。以上の結果から，中和処理過程において Sch 様化合物の形成に伴い源泉中の As 及び Cr が取り込まれ，同化合物中に蓄積していることが強く示唆された。

[*1]：秋田大学大学院工学資源学研究科

秋田県健康環境センター年報
第9号 2013

発行日　平成26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