

IV 発表業績

1. 学会発表

1,4-ジオキサン分解能が低下した活性汚泥の処理能力向上の検討

菅原 剛, 小林貴司, 小川千春, 八柳 潤

第23回環境化学討論会
2014年5月, 京都府

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

秋田県におけるインフルエンザ菌の薬剤耐性関連遺伝子の検出状況

今野貴之

第88回日本感染症学会学術講演会
2014年6月, 福岡市

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

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

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

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

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

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

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

つつが虫病リスクコミュニケーションの在り方

佐藤寛子

衛生微生物技術協議会第35回研究会
2014年6月, 東京都

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

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

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

喚起を行うなど、「夏季のつつが虫病」対策が講じられるようになった。

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

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

Noroviruses RNA detection in contaminated foods by a PANtrap method

Hiroyuki Saito, Tomoyuki Tanaka^{*1}

Miho Toho^{*2}, Mamoru Noda^{*3}

Tomoichiro Oka^{*4}, Kazuhiko Katayama^{*4}

The 2nd. AFSA Conference on Food Safety and Security

2014年8月, Bien Hoa City, Vietnam

Noroviruses (NoVs) are one of a major cause of gastroenteritis mostly related not only to food poisoning but a dominant cause of food-related outbreaks. Foodborne gastroenteritis is being increasingly recognized as a public health problem, however, identification of the etiological agents responsible has been restricted due to the difficulty to detect the agents in food samples. A PANtrap ((PANSORBIN[®](Staphylococcus aureus fixed with formalin) trap) method we developed for the detection and quantification of NoVs from different food samples included solid, liquid, paste and oily states. We spiked NoV GII.4 stool suspension that includes 10⁵ 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, then PANSORBIN[®] was added into the samples and re-centrifuged to collect NoV-IgG complexes adsorbed on the surface of PANSORBIN[®]. NoV RNA was extracted from the pellet using a commercial extraction kit, then RT real-time PCR process was performed. The recovery rate from potato salad was 78.3±10.8% in contrast to 0.33±0.08% when no anti NoV GII.4 serum was added. Similar results were obtained from the stir fried noodle, 81.5±10.2% vs 1.15±0.25%.

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

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

^{*1}: 堺市衛生研究所

^{*2}: 福井県衛生環境研究センター

^{*3}: 国立医薬品食品衛生研究所

^{*4}: 国立感染症研究所

秋田県のつつが虫病対策における課題と展望

佐藤寛子, 柴田ちひろ, 秋野和華子
佐藤由衣子, 斎藤博之, 安部真理子
須藤恒久^{*1}

第60回日本寄生虫学会

日本衛生動物学会北日本支部合同大会

2014年10月, 盛岡市

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

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

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

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

*1：秋田大学医学部名誉教授

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

斎藤博之，秋野和華子，田中智之^{*1}
野田 衛^{*2}

第35回日本食品微生物学会学術総会
2014年10月，堺市

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

ロブリン製剤を導入することで，本法を汎用的に用いることが可能である。これまで，ガンマグロブリン製剤として，医療用のものを用いていたが，検査法の普及に当たっては，試験研究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5種類のNoVについて食品洗滌液からの回収を試みたところ，食中毒の原因ウイルスとして最多のNoV-GII.4に対して工業用ガンマグロブリンを用いた場合の回収率は52.0%で，医療用ガンマグロブリン製剤を用いた場合は46.8%であった。以下，NoV-GII.2に対しては38.6%/38.2%（工業用/医療用），NoV-GII.6に対しては15.5%/13.3%，NoV-GI.4に対しては35.7%/37.6%，NoV-GI.6に対しては12.1%/6.1%であり，比較した全てにおいて両者は同等であった。また，実際の汚染食品をモデルとした比較試験においても，工業用ガンマグロブリンを用いた系はポテトサラダで40.6%，焼きそばで33.5%と，医療用のそれ（ポテトサラダで34.7%，焼きそばで32.4%）と同等以上の回収率を示した。これらのことから，使用において特段の制約の無い工業用ガンマグロブリンを試薬としてパントラ法に導入することは大変合理的であり，汎用性を担保する意味でも積極的な活用と流通ルートの整備が望まれるものと考えられる。

*1：堺市衛生研究所

*2：国立医薬品食品衛生研究所

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

秋野和華子，斎藤博之，田中智之^{*1}
野田 衛^{*2}

第35回日本食品微生物学会学術総会

2014年10月, 堺市

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

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

*1: 堺市衛生研究所

*2: 国立医薬品食品衛生研究所

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

第12回秋田県公衆衛生学会学術大会
2014年11月, 秋田市

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

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

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

夏季のつつが虫病発生状況とアカツツガムシ生息調査

秋田県における死因の概要—都道府県別年齢調整死亡率に基づく検討—

田中貴子

第12回秋田県公衆衛生学会学術大会

2014年11月，秋田市

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

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

を見すえつつ引き続き対策を強化していく必要があると思われる。

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

斎藤博之，秋野和華子，田中智之^{*1}

野田 衛^{*2}

第62回日本ウイルス学会学術集会

2014年11月，横浜市

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

NoV-GII.4を含む50 mLの食品洗滌液への工業用ガンマグロブリン添加量の検討では、5%溶液を150 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ポテトサラダで40.6%、焼きそばで33.5%と、医療用のそれ（ポテトサラダで34.7%、焼きそばで32.4%）と同等以上の回収率を示した。これらのことから、工業用ガンマグロブリンを試薬としてパントラ法に導入することは大変合理的であり、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る。

^{*1}：福井県衛生環境研究センター

^{*2}：国立感染症研究所

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

樫尾拓子, 熊谷優子, 今野貴之
高橋志保, 和田恵理子, 八柳 潤

第 38 回秋田県医学検査学会
2014 年 11 月, 秋田市

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

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

福島原発事故による秋田県内の食品への放射能影響について

小川千春, 菅原 剛^{*1}, 高橋知子
大井佐知子^{*2}, 小林貴司, 岩谷金仁^{*3}

第 38 回秋田県医学検査学会
2014 年 11 月, 秋田市

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

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

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

^{*1}: 平鹿地域振興局福祉環境部

^{*2}: 元健康環境センター

^{*3}: 北秋田地域振興局大館福祉環境部

農作物における残留農薬一斉分析法の妥当性評価

野田 衛^{*2}珍田尚俊, 松淵亜希子, 天明さおり^{*1}

第108回日本食品衛生学会学術講演会
2014年12月, 金沢市

第51回全国衛生化学技術協議会年会
2014年11月, 別府市

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

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

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

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

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

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

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

^{*1}：山本地域振興局福祉環境部

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

齋藤博之, 秋野和華子, 田中智之^{*1},

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

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

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

*1: 福井県衛生環境研究センター

*2: 国立感染症研究所

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

佐藤寛子, 川森文彦^{*1}, 藤田博己^{*2}

安藤匡子^{*3}, 門馬直太^{*4}

第24回秋田応用生命科学研究会

2014年12月, 秋田市

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

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

様に行った。

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

^{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

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

佐藤寛子, 村井博宣^{*1}, 柴田ちひろ
秋野和華子, 齊藤志保子, 藤田博己^{*2}

安藤匡子^{*3}第21回リケッチア研究会合同研究発表会
2014年12月、東京都

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

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

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

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

*1：泉皮膚科クリニック

*2：馬原アカリ医学研究所

*3：鹿児島大学共同獣医学部

八郎湖および周辺地下水流域におけるリン濃度の変遷

玉田将文，佐藤清隆，大淵志伸

第62回日本生態学会

2015年3月、鹿児島市

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

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

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

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

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

測されるため、それらの要因を考慮した継続的な調査が必要であると考えられた。また観測井戸水中 T-P 濃度は、3.7～26.9 mg/L を示した。この調査井戸では、年間を通じて継続的な T-P 濃度のモニタリングがなされており、現在でも 30 mg/L 前後の濃度が検出されていることから、ほぼ同レベルの濃度であることが示された。さらに、その他観測井戸 6 箇所においても、T-P に対する PO_4^{3-} 濃度割合が約 70%以上であり、既往と同様の結果が得られ、現在でも高濃度 T-P 地下水の湧出による影響が農業用排水路表層水に及んでいることが示唆された。

2. 他誌掲載

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

田村高志^{*1}, 玉田将文, 菅原 剛
高橋英之^{*2}, 高嶋 司, 高橋 浩^{*2}

全国環境研会誌, **39**, 2, 2014, 10-15.

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

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

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

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

^{*1}: 由利地域振興局福祉環境部

^{*2}: 元健康環境センター

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

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

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

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

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

*1: Mie Prefecture Health and Environment Research Institute, Yokkaichi, Japan.

*2: Kumamoto Prefectural Institute of Public Health and Environmental Science, Udo, Japan.

*3: Shizuoka Institute of Environment and Hygiene, Shizuoka, Japan.

*4: Hirosaki University, Hirosaki, Japan.

*5: Department of Fisheries, School of Marine Science and Technology, Tokai University, Shizuoka, Japan.

*6: BML Food Science Solutions, Tokyo, Japan.

*7: Japan Food Research Laboratories, Tokyo, Japan.

*8: The University of Tokyo, Tokyo, Japan.

*9: Division of Microbiology, National Institute of Health Sciences, Tokyo, Japan.

「つつが虫病」

佐藤寛子

呼吸, 33, 12, 2014, 1249-1255.

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

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

秋田県におけるShimokoshi型つつが虫の遡及的疫学調査

佐藤寛子, 柴田ちひろ, 斎藤博之, 須藤恒久*1

衛生動物, 65, 4, 2014, 183-188.

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

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

*1 : 秋田大学医学部名誉教授

食品・臨床材料・ふき取りの前処理法

斎藤博之, 野田 衛^{*1}

食品衛生検査指針 2015 (微生物編), 2015, 607-617.

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

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

*1 : 国立医薬品食品衛生研究所

一本鎖高次構造多形 (SSCP) 解析法

斎藤博之

食品衛生検査指針 2015 (微生物編), 2015, 648-656.

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

秋田県健康環境センター年報
第 10 号 2014

発行日 平成 27 年 12 月

発行所 秋田県健康環境センター

〒010-0874 秋田市千秋久保田町 6 番 6 号

TEL: 018-832-5005

FAX: 018-832-5938
