

IV 発表業績

1. 学会発表

SARS-CoV-2 不検出例からの呼吸器感染症ウイルス検出状況

柴田ちひろ 佐藤由衣子 樫尾拓子
齊藤志保子 藤谷陽子 秋野和華子
斎藤博之

第 70 回東北公衆衛生学会
2021 年 7 月 秋田市（オンライン開催）

新型コロナウイルス感染症（COVID-19）が 2020 年 2 月 1 日に指定感染症に定められて以降、全国の地方衛生研究所や医療機関等で新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）の遺伝子検査が実施されている。当センターでも 2021 年 5 月末現在で 200 名の陽性者を確認しているが、検査対象の大部分は有症状であっても SARS-CoV-2 不検出であり、他の呼吸器感染症が疑われた。これら有症状者 1,142 名を対象に、他の呼吸器感染症ウイルス等の検索を行ったので報告する。

重複感染例を含め有症状者 1,142 名中 222 名から何らかの病原体が検出され、検出率は 19.4%であった。若年層で検出率が高く、80 代以上の高齢者で低い傾向がみられた。高齢者の呼吸器症状には、基礎疾患や細菌性感染症等の関与もあることから、本検討においてもこれらウイルス性感染症以外の要因が潜在していたと考えられた。病原体別では、ライノウイルス（HRV）128 例、季節性ヒトコロナウイルス（cHCoV）69 例、ヒトボカウイルス 11 例の順に多く検出された。HRV は期間を通じて検出されたが、2020 年 10 月～11 月に検出率の増加が見られ、時期に県内で流行の拡大があったと推察された。同じく cHCoV も継続的に検出されたが、冬季流行性が指摘されているように、夏季に検出率の減少が認められた。

COVID-19 が疑われた有症状者の中に、HRV や cHCoV 等の一般的な呼吸器感染症ウイルスの関与が認められたことから、COVID-19 に限らず、総合的な感染症対策の重要性が改めて確認された。

パンソルビン・トラップ法により弁当食材からノロウイルスが検出された食中毒の一例

斎藤博之 秋野和華子 野田 衛*¹ 上間 匡*¹

第 42 回日本食品微生物学会
2021 年 9 月 岡山市（オンライン開催）

【目的】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である。2020 年 1 月に発生した食中毒事例において、本法を適用したところ弁当食材から NoV が検出され、原因究明に資することができたので報告する。

【材料と方法】2020 年 1 月 25～27 日にかけて、介護老人保健施設 A で発生した食中毒事例の原因究明のため、患者便 8 検体、弁当製造業者 B の調理従事者便 3 検体、検食 12 検体、拭き取り 5 検体、及び施設厨房の委託業者 C の調理従事者便 6 検体、拭き取り 6 検体について NoV と食中毒菌の検査を行った。この内、検食の NoV 検査についてパンソルビン・トラップ法を用いた。

【結果と考察】患者便 8 検体全てと、弁当製造業者の調理従事者 1 名の便から、NoV-GII.2 が検出された。また、検体の一部からウェルシュ菌と黄色ブドウ球菌も検出されたが、腸内常在菌のため関連性は低いと判断された。拭き取り検体は食中毒菌・NoV とともに不検出であった。検食の内、胡麻豆腐、鰯フライ、チキンステーキガーリックトマトソースがけから、NoV-GII.2 が検出された。汚染量は食品 1 g 当たり、胡麻豆腐で 35 コピー、鰯フライで 48 コピーであり、チキンステーキガーリックトマトソースがけはウイルス量が少なく定量には至らなかった。検出された NoV の塩基配列を比較したところ、患者便、調理従事者便、検食由来のものが全て一致した。

発症率は 13%と低かったが、NoV は食品中では増殖せず、汚染量も 35～48 コピー/g と少ないことから、暴露量にムラがあったものと考えられる。NoV が検出された食材は全て加熱調理のプロセスを経ていることから盛り付け段階の汚染が示唆された。NoV が検出された調理従事者

は1月20日にカキを喫食していたため、これにより感染し、無症状ではあったもののウイルス排泄は続いていたものと推察される。

*1：国立医薬品食品衛生研究所

Application of allele specific primer for PCR to detect point mutation in SARS-CoV-2

斎藤博之 秋野和華子 藤谷陽子 檜尾拓子
齊藤志保子 柴田ちひろ 佐藤由衣子

第68回日本ウイルス学会

2021年11月 神戸市（オンライン開催）

【目的】目下のところ、新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）のVOC（懸念される変異株）への対応として、マーカーとなる塩基置換部位をターゲットとしたスクリーニングが実施されている。基本原理はTaqMan assayによるものが多く、特にN501Y変異とL452R変異については国立感染症研究所から通知されたプロトコルが地方衛生研究所で用いられている。一方、年明けから春にかけて主に関東以北においてE484K単独変異株（R.1系統）が流行し、またVOCの中にもE484K変異を有するものがある。E484K変異は免疫逃避の可能性が示唆されていることから、モニタリングのために簡便に導入できるallele specific primerを設計し検討したので報告する。

【方法】基本となる検査系として、2021年1月22日に国立感染症研究所から通知されたN501Y変異検出PCRを用いた（N501はFAM, 501YはVICによる蛍光で識別）。このプロトコルのforward primerについてE484K変異を検出できるように3'末端がE484Kに相当する2種類の改変primerをデザインし、さらに特異性を増強するために3'末端から3番目の塩基に意図的なミスマッチを導入した。また、応用例としてL452R変異を検出できるように3'末端がL484R変異に相当するforward primerも新

たに設計した。供試検体として、第3波と称される流行拡大局面から8月16日現在までにPCR検査で陽性となった342検体と感染研ウイルス第一部から分与された変異株のRNAを用いた。

【結果】3'末端のみを違えたprimerでは、E484K変異やL452R変異の有無に関わらず同程度の増幅が見られ識別できなかった。3'末端から3番目の塩基についてE484K変異検出用primerではTからGへ、L452R変異検出用primerではCからAへ意図的なミスマッチを導入したところ、Ct値において7～10サイクルの差が観察でき変異の有無を容易に識別できた。ミスマッチ導入による感度低下は認められなかった。

【考察】Allele specific primerは数千円のコストで手軽に導入でき、基本となるTaqMan assayの系と組み合わせることで追加の情報が得られた。N501Y変異と同時にE484K変異が検出できたことで流行株の推移を把握するのに役立った。また、現在L452R変異検出には専用のTaqMan assayが使われているが、原理の異なる手段を用意しておくことは判定に迷うケースへの備えとして有意義である。本法は、どのような変異に対しても設計できるが、ミスマッチの導入に際して検討が必要である。

新型コロナウイルス変異株検査の実際と県内での検出状況

斎藤博之 秋野和華子 藤谷陽子 檜尾拓子
齊藤志保子 柴田ちひろ 佐藤由衣子

秋田応用生命科学研究会第34回講演会

2021年12月 秋田市

【目的】2020年2月14日に本県で初めて新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）の検査が実施されてから1年9カ月が経過し、県内では2021年11月26日時点で1,925人からSARS-CoV-2が検出されている。この間、医療機関・学校・保育園・飲食店等で多くのクラスターが発生し、さらには度重なる変異株の出現によって社会不安が増大した。変異株については、「〇×型と

判明した」と簡潔に報道されるだけであることから、実際の検査がどのように行われているのか関係者以外が知る機会はほとんどない。今回の講演会では、変異株検査の実際を紹介するとともに、県内での検出状況について総括してみたい。

【方法】2021年11月26日までに新型コロナウイルス感染症（COVID-19）疑いで当センターに搬入された検体は咽頭拭い液、鼻腔拭い液、唾液、喀痰などを合わせて9,978検体であり、この内661検体からSARS-CoV-2が検出されている。変異株検査については2021年1月22日にN501Y変異（アルファ株のマーカ―）、2021年5月21日にL452R変異（デルタ株のマーカ―）を検出するreal-time PCRのプロトコール（2波長 TaqMan assay）が国立感染症研究所から通知され、全国の地方衛生研究所で利用されることになった。一方、2021年3月頃から関東以北においてR.1系統が流行したことを受けて、マーカ―となるE484K変異を検出するプロトコール（allele specific primer assay）を当センターで工夫した。いわゆる“第3波”と呼ばれる2020年11月以降に搬入され、SARS-CoV-2が検出された567検体について上記の方法を用いて変異の有無を判定した。

【結果と考察】当センターで工夫したE484K変異検出プロトコールは、N501Y変異検出プロトコールと組み合わせることが可能で、両者の同時判定が可能になった。

供試した567検体の内、N501Y変異が73検体、E484K変異が91検体、L452R変異が287検体から見つかった。本県では、E484K変異を有するR.1系統が2021年3～5月に流行し、そのため感染力の強いアルファ株の流行時期が遅くなり、結果としてワクチン接種体制整備のための貴重な時間稼ぎができたものと考えられる。2021年8月中旬以降はデルタ株による大きな流行が見られたが、ワクチン接種が進むにつれて感染者は減少に転じた。

大潟村干拓地から八郎湖への流入負荷量解析について

玉田将文 鈴木大志 鎗目隼平
生魚利治 梶谷明弘 野村 修
和田佳久 渡邊 寿

第48回 環境保全・公害防止研究発表会
2021年11月 秋田市（オンライン開催）

秋田県では、湖沼水質保全計画に基づく各種対策を実施してきたが、環境基準点における化学的酸素要求量（COD）、全窒素（T-N）及び全りん（T-P）の年平均濃度等は、依然として環境基準を超過している。今後の水質改善対策の立案及び効果検証には、八郎湖への流入負荷の定量的把握が重要である。そこで、流域農地の中でも特に排出負荷割合が高い大潟村干拓地からの流入負荷を、南部排水機場（SDS）及び北部排水機場（NDS）における、各分析項目の濃度（mg/L）と採水日の日排水量（千 m³/日）を用いたLQ式により解析した。

2006～2020年度の非灌漑期及び灌漑期毎のSDS及びNDSでのLQ式において、CODは決定係数が0.8超であった。懸濁物質（SS）は非灌漑期よりも灌漑期の決定係数が低い結果となり、日排水量が約1,500千m³超時におけるSSのばらつきが影響しており、灌漑期の調査日時点における代掻き面積の違いが考えられた。T-Nは非灌漑期よりも灌漑期の決定係数が低く、また単位排水量当たりの流入負荷量も小さいケースがあり、水田湛水下の還元層の脱窒作用による無機態窒素の減少が考えられた。T-PはSDSにおける決定係数が低く、干拓地南部の高濃度リン湧出水等による日流入負荷量への影響が考えられた。

SDS及びNDSにおけるCOD、SS、T-N及びT-Pの年間流入負荷量は、ほぼ横ばいで推移していた。年間流入負荷量における灌漑期割合は、CODが66.2～77.2%、SSが78.7～87.8%、T-Nが59.7～72.1%、T-Pが60.7～70.8%であり、灌漑期における水田排水の影響が示唆された。

2. 他紙掲載論文等

山本章治*⁶ 朝倉 宏*⁷

2.1 筆頭著者論文

Distribution of the O-genotypes of *Escherichia albertii* isolated from humans and environmental water in Akita Prefecture, JapanTakayuki Konno, Shiho Takahashi, Sumie Suzuki,
Hiroko Kashio, Yuho Ito, Yuko KumagaiJapanese Journal of Infectious Diseases, **74**, 2021,
381–384.

In Japan, isolation of *Escherichia albertii*, newly recognized enteric pathogen and closely related to *E. coli*, in human gastroenteritis outbreaks were increasingly reported. However, the epidemiology of *E. albertii* is yet fully unknown. To determine the distribution of O-genotypes of *E. albertii* strains derived from humans and environmental water in Akita Prefecture, a total of 44 *E. albertii* strains, including 29 strains of human origin and 15 strains of environmental water origin, were subjected to PCR for EAO-genotyping. The results showed that 38 of the *E. albertii* strains were shared by 19 other O-genotypes and six strains were untypable. Among these, 24 strains were agglutinated with the antiserum of *E. coli* O-antigen. The most dominant EAOg in human strains was EAOg18. Five O-genotypes, including EAOg6, EAOg12, EAOg18, EAOg25, and EAOg32, were detected in both human and environmental strains. Future studies focused on the prevalence of O-genotype in *E. albertii* might be useful for understanding the pathogenic potential and epidemiology of *E. albertii*.

国内の *Campylobacter jejuni* 血清型別に対応した改良 Penner PCR 型別法今野貴之 山田和弘*¹ 赤瀬 悟*² 坂田淳子*³
尾羽根紀子*⁴ 森 美聡*⁵ 横山敬子*²日本食品微生物学会雑誌, **38**, 3, 2021, 23–128.

カンピロバクター属菌を原因とする事件数は細菌性食中毒として最も多くなっている。また、下痢症患者から検出されるカンピロバクター属菌の大部分は *Campylobacter jejuni* が占めており、*C. jejuni* は食中毒の原因菌として特に重要な菌種である。*C. jejuni* は主に莢膜多糖の抗原性を基に Penner 型として 47 種類に分類でき、これらは疫学マーカーとして有用である。そこで、これまで国内で行われてきた血清型別法に即した簡易な改良 Penner PCR 型別法を検討した。市販血清を用いた血清型別法で型別された 228 株のうち、改良 Penner PCR 型別法で血清型別法と同様の血清群の Penner 遺伝子型に分類できたのは 220 株 (96.5%) であった。また、血清型別不能であった 178 株のうち、166 株 (93.3%) がいずれかの Penner 遺伝子型に型別できた。改良 Penner PCR 型別法は、国内で疫学解析に利用されてきた主要な血清型を網羅しており、効率的に型別することが可能である。今後、本法を用いて *C. jejuni* の Penner 遺伝子型を把握することによって、*C. jejuni* の疫学解析や食中毒調査における感染源および感染経路の究明に役立つことが期待される。

*¹：愛知県衛生研究所*²：東京都健康安全研究センター*³：大阪健康安全基盤研究所*⁴：山口県環境保健センター*⁵：熊本県保健環境科学研究所*⁶：国立感染症研究所*⁷：国立医薬品食品衛生研究所秋田県内で市販されている食肉および野菜類からの *Escherichia albertii* の検出と分離株の性状今野貴之 鈴木純恵 高橋志保 樫尾拓子
伊藤佑歩 熊谷優子日本食品微生物学会雑誌, **38**, 4, 2021, 144–152.

Escherichia albertii は、2003 年に発表された比較的新しい菌種で、国内で健康被害が散見されている。しかしながら、過去の集団食中毒事例において原因食品が特定された事例は少なく、食中毒の原因となりうる食品やその汚染経路に関する調査は不十分である。そこで、食品における *E. albertii* の汚染実態を明らかにするため、秋田県内で流通していた食肉および野菜類からの *E. albertii* の検出を行った。その結果、食肉および野菜類 12 検体から *E. albertii* が分離され、*E. albertii* による食品の汚染実態が明らかとなった。特に、ブタ由来の検体からの *E. albertii* の検出頻度が最も高く、ブタはトリと同様にヒトへの感染源として重要と考えられた。食品由来の *E. albertii* はヒト由来株などに見られる主要な性状と病原因子を保有し、特に野菜由来の菌株で環境水由来株やヒト由来株と分子疫学解析における類似性が確認され、野菜類の *E. albertii* の感染源としての重要性も示唆された。

保育施設を起点とした腸管出血性大腸菌感染症の集団発生

今野貴之

健康被害危機管理事例データベース, No.21001.

腸管出血性大腸菌はベロ毒素を産生し、強い感染力を有する。特徴として、出血性大腸炎や溶血性尿毒症症候群などの重篤な合併症を引き起こす場合がある。国内では、腸管出血性大腸菌感染症の集団発生の早期探知やその原因究明を目的として、厚生労働省通知に基づき菌株の分子疫学解析が進められている。秋田県における腸管出血性大腸菌感染症の報告数は例年 40 件前後であり、規模の大きな集団発生はまれである。しかしながら、2020 年 10 月に保育園児を含む家族内感染の探知をきっかけに、保育施設での腸管出血性大腸菌の集団感染が発覚した。発症者数 56 名で、被検者 294 名の内、O26:H11 が家族内二次感染を含め 49 名で確認された。腸管出血性大腸菌感染症は、原因となる菌株によって軟便程度の軽症者や無症状病原体保有者が多い場合があるが、感染力は強いため、

それらの患者から接触感染等によって感染が拡大する可能性があり、注意が必要である。菌陽性者の内、2 名の感染者は保育施設との関連はなかったが、分子疫学解析により集団発生事例由来の菌株と遺伝子型が一致した。その後、集団発生事例の患者の家族と接点があったことが管轄保健所の疫学調査で判明しており、集団発生に含める患者範囲の特定に分子疫学解析の結果が役立った。

SARS-CoV-2 の N501Y 変異と E484K 変異の同時スクリーニングのための工夫

斎藤博之 秋野和華子 藤谷陽子
檜尾拓子 柴田ちひろ 佐藤由衣子
齊藤志保子

Infectious Agents Surveillance Report. 42, 7, 2021, 18-19.

目下のところ、新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) の VOC (懸念される変異株) への対応として、2021 年 1 月 22 日に国立感染症研究所 (感染研) から送付された TaqMan assay を基本原理とする PCR 検査プロトコールが用いられ、N501Y 変異をターゲットとしたスクリーニングが実施されている。N501Y 変異は英国型変異株の特徴であるが、さらに E484K 変異を併せ持つ南アフリカ型とブラジル型変異株もスクリーニングで検出される。一方で、現時点での報告対象とはなっていないが、N501Y 変異がなく E484K 変異のみを有するウイルス (R.1 系統) が関東から東北にかけて広がりつつある。R.1 系統は、現行のスクリーニングでは検出できず、感染研のゲノム解析で判明することが多い。今回、我々は現行プロトコールに最小限度の改変を加えることで E484K 変異の検出能を付加する工夫を行ったので報告する。

いわゆる第 3 波とされる流行拡大局面から 5 月 31 日現在に至るまでに N2 セットによる PCR 検査で陽性となった 226 検体について、スクリーニングを実施した。1 月に初めて R.1 系統を確認したが、首都圏からの持ち込み例 (家族 2 名) で、他の陽性例とは独立していた。3 月以降に

検出されたウイルスは28例のN501Y変異株(13例と6例はそれぞれ同一の感染源由来)以外は全てR.1系統に置き換わっていた。N501Y変異とE484K変異を併せ持つウイルスはこれまで確認されていない。7例は判定不能であったが、いずれもN2セットによるPCR検査でのCt値は36以上であった。

2.2 共著論文

Arai S, Ohtsuka K, Konishi N, Ohya K, Konno T, Tokoi Y, Nagaoka H, Asano Y, Maruyama H, Uchiyama H, Takara T, Hara-Kudo Y: Evaluating Methods for Detecting *Escherichia albertii* in Chicken Meat, J Food Prot, 84, No.4, 2021, 553-562.

秋 田 県 健 康 環 境 セ ン タ ー 年 報

第17号 令和3年度

発行日 令和4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

