

健康食品中の強壯用無承認無許可医薬品の検査結果(2016年度)

辻村 和也、本村 秀章

Survey Report of Pharmaceuticals Illegally Added to Dietary Supplements for the Enhancement of Sexual Performance (2016)

Kazunari TSUJIMURA and Hideaki MOTOMURA

Key words: Illegal Pharmaceuticals, Enhancement of Sexual Performance, Dietary Supplements, LC-QTOF/MS

キーワード: 無承認無許可医薬品、強壯効果、健康食品、LC-QTOF/MS

はじめに

近年、強壯効果を標榜している健康食品に無承認無許可医薬品が含まれている事例が相次いで報告されている。このため、これら無承認無許可医薬品による健康被害を未然に防ぐため、2003年度より県内で販売されている「いわゆる健康食品」(以下、健康食品)の医薬品成分検査を実施している。2016年度の健康食品の検査結果について報告する。

調査方法

1 検体

平成28年度は、インターネット販売されている強壯用健康食品5製品(錠剤製品2、カプセル剤製品1、カプセル/錠剤混合製品1、液剤製品1)を検体とした。

2 検査対象物質

強壯用医薬品であるシルデナフィル、ホンデナフィル、タダラフィル、バルデナフィル、ヨヒンビンの5種類をターゲット検査対象物質とした。

また、既知情報から整理した強壯系成分、報告事例及び「専ら医薬品として使用される成分本質(原材料)リスト(局長通知 薬発第476号)²⁾」のうち成分構造情報が有る医薬品成分を精密質量数によるスクリーニング検査の対象物質とした。

3 試薬

シルデナフィル、ホンデナフィル、タダラフィル、バルデナフィル、ヨヒンビン標準品は10mgをメタノールに溶解して20mLとし、標準原液とした。さらに各標準原液をアセトニトリル-メタノール(1:1)で希釈して、混合標準溶液を調製した。

前処理及び標準溶液調製及び移動相に用いたアセトニトリルはLC/MS用を用いた。その他のメタノール

は関東化学(株)製のLC/MS用、超純水及びギ酸は和光純薬工業(株)製のLC/MS用を用いた。

4 分析装置及び条件

高速液体クロマトグラフ-四重極飛行時間型質量分析装置(LC-QTOF/MS-DAD)

ウォーターズ株式会社製 Waters ACQUITY UPLC I-CLASS / Xevo G2-XS QTOF を使用した。分析カラムはウォーターズ株式会社製 Waters UPLC HSS C18 (2.1 mm i.d. × 100 mm、粒子径 1.8 μm)を用いた。カラム温度は45°Cとし、移動相には3 mM ギ酸アンモニウム溶液(pH 2.9) (A液)及び0.1%ギ酸-アセトニトリル (B液)を表1に示すグラジエント溶離条件で用いた。また、流速は0.3 mL/min、試料注入量は1 μLとした³⁾。

表1 グラジエント溶離条件

Time, min	A液, %	B液, %
0 - 2.1	80	20
6.5	60	40
9.5 - 11.0	40	60
11.3 - 12.8	5	95
13.0	80	20
15.0	80	20

また、QTOF/MS分析は、Scan範囲:m/z:50-1000、測定モードは、MS^F(Resolution)、Cone Energyを40 Vとした。また、Collision Energyは、Low (0 V)、High (Ramp:15-40 V)とした。

ターゲット検査対象物質の名称、組成式及び精密質量数を表2に示す。

表 2 ターゲット検査対象物質

物質名	組成式	精密質量数
シルденаフィル	C ₂₂ H ₃₀ N ₆ O ₄ S	474.2049
ホンデナフィル	C ₂₅ H ₃₄ N ₆ O ₃	466.2692
タダラフィル	C ₂₂ H ₁₉ N ₃ O ₄	389.1376
バルデナフィル	C ₂₃ H ₃₂ N ₆ O ₄ S	488.2206
ヨヒンビン	C ₂₁ H ₂₆ N ₂ O ₃	354.1943

5 分析方法

(1) 分析試料の前処理

錠剤は乳鉢で粉末にし、カプセル剤はミル及び乳鉢で粉砕した。液剤はそのまま検査に供した。検体 200 mg を採取し、アセトニトリル-メタノール(1:1) 10 mL を加えて 1 分間攪拌した後、10 分間超音波抽出した。これを 3000 rpm で 5 分間遠心分離した後、上清 2 mL を分取し、アセトニトリル-メタノール(1:1) で 10 mL に定容した。その溶液を 0.2 μm のフィルターバイアルでろ過して試験溶液とした。

検査結果

表 3 健康食品検査結果(2016)

検査項目	検出数/検体数	備考	
①ターゲット検査対象物質	シルденаフィル	0/5	
	ホンデナフィル	0/5	
	タダラフィル	0/5	
	バルデナフィル	0/5	
	ヨヒンビン	0/5	
②スクリーニング対象物質	①以外の既報強壮系成分及び「専ら医薬品として使用される成分本質(原材料)リスト」のうち成分構造情報が有る医薬品成分	0/5	錠剤 2 検体 カプセル剤 1 検体 カプセル剤/錠剤※ 1 検体 液剤 1 検体 ※一製品にカプセル剤及び錠剤の両方が梱包

今回調査した健康食品からは全ての検体においてターゲット検査対象物質は未検出だった(表 3)。また、ターゲット検査対象物質以外の強壮系成分(53 成分)及び報告事例及び「専ら医薬品として使用される成分本質(原材料)リスト」のうち成分構造情報が有る医薬品成分(62 成分)についても精密質量数によるスクリーニング検査で含有が疑われる検体は無かった。

参考文献

- 厚生労働省医薬食品局監視指導課・麻薬対策課 報道発表資料:平成 23 年度無承認無許可医薬品等買上調査の結果について, (2012 年 6 月 22 日)
- 薬発第 476 号 厚生省薬務局監視指導課通知「無許可医薬品の監視指導について」(1971 年 6 月 1 日)
- Waters Application Note:「UPLC/MS/MS for the Screening, Confirmation, and Quantification of Illegally Added to Herbal/Dietary Supplements for the Enhancement of Male Sexual Performance」, (2012).

食品中のアレルゲン検査結果(2016年度)

池田 由紀、辻村 和也、本村 秀章

Survey Report of Allergen in Food (2016)

Yuki IKEDA, Kazunari TSUJIMURA and Hideaki MOTOMURA

Key words: allergen, shrimp, Crab, ELISA method, PCR method

キーワード: アレルゲン(特定原材料)、えび・かに、酵素免疫測定法、ポリメラーゼ連鎖反応

はじめに

アレルゲン(特定原材料)を含有する食品は、食物アレルギーによる健康被害を防止する目的で、2001年4月に特定原材料の表示が義務づけられ、2002年4月から本格的に施行された。特定原材料の検査法については、2002年11月の厚生労働省通知により、定量検査法(ELISA法)および確認検査法(PCR法・ウエスタンブロット法)が定められた¹⁾。

当センターでは、2007年度から本格的にアレルゲンの検査を開始しており、2007~2015年度の検査結果については既に報告している。2016年度は、「えび・かに」の検査を行ったので報告する。

調査方法

1 試料

県内に流通する加工食品のうち、「えび・かに」の使用、または混入が疑われるもので、使用原材料表示に「えび・かに」が記載されていないもの20検体とした(西彼保健所・県央保健所・県南保健所・県北保健所収去分)。

2 試薬

1) 定量検査法(ELISA法)

日水製薬社製 FA テスト EIA-甲殻類Ⅱ「ニスイ」(以下、N社キット)およびマルハニチロ社製甲殻類キットⅡ「マルハニチロ」(以下、M社キット)を使用した。

2) 確認検査法(PCR法)

DNA抽出には、シリカゲル膜タイプキット法を用い、QIAGEN社製 DNeasy Plant mini kitを使用した。

植物DNA検出用プライマー対、えび検出用プライマー対、かに検出用プライマー対及び甲殻類検出用コントロールプラスミドは(株)ファスマック社製、PCR緩衝液、dNTP、MgCl₂、TaqポリメラーゼはApplied Biosystems社製を使用した。電気泳動用時に使用する50bp DNA Ladder、Loading bufferは東洋紡績(株)

製、エチジウムブロマイドはInvitrogen社製、アガロースはタカラバイオ(株)製、TE緩衝液、TAE緩衝液は(株)日本ジーン製を使用した。

3 機器

フードカッター:Retsch社製 GM200, 恒温振とう機:東京理科機器(株)製 MMS-3011, 冷却遠心機:クボタ商事(株)製 3740, マイクロプレートリーダー: BIO-RAD社製 Benchmark Plus, 分光光度計:GEヘルスケアジャパン(株)製 GeneQuant1300, サーマルサイクラー:Applied Biosystems社製 2720, 電気泳動装置:(株)アドバンス製 Mupid-2 plus, トランスイルミネーター:VILBER LOURMAT社製 ECX 15M, ゲル撮影装置:アムズシステムサイエンス製 Limited STAGE

4 検査方法

ELISA法、PCR法ともに2014年3月26日消食表第36号消費者庁次長通知「アレルギー物質を含む食品の検査法について」の一部改正について²⁾に準じて検査を行った。

規格基準

特定原材料等由来のタンパク質含量が、10 µg/g未満でなければならない。

検査結果

ELISA法による定量検査の結果、2検体で「えび・かに」の混入が疑われた(表1)。2検体についてPCR法による確認検査を行った結果、2検体ともえび由来のDNAが検出された。

今回の検査で2検体のえび表示違反(疑)製品が市場に出回っていることが明らかとなった。今後も表示違反食品の排除および表示適正化を行う目的で、県内に流通する食品中のアレルゲンの検査が必要と考えられる。

参 考 文 献

- 1) 厚生労働省通知食案基発第0513003号:アレルギー物質を含む食品の検査法について, 2002年11月6日
- 2) 消費者庁次長通知消食表第36号:「アレルギー物質を含む食品の検査法について」の一部改正について, 2014年3月26日

表1 えび・かに由来タンパク質が検出された検体の検査結果

検体	えび・かに表示	定量検査 (ELISA法)		確認検査 (PCR法)	
		N社キット	M社キット	えび	かに
天ぷら(魚肉ねり製品)	なし	陰性	17 µg/g	陽性	陰性
ちくわ(魚肉ねり製品)	なし	陰性	21 µg/g	陽性	陰性

指定薬物の検査結果(2016 年度)

辻村 和也、吉村 裕紀、本村 秀章

Survey Report of Designated Substances Controlled by the Pharmaceutical Affairs Law in Japan, for Luxury Goods and Dietary Supplements (2016)

Kazunari TSUJIMURA, Hiroki YOSHIMURA and Hideaki MOTOMURA

Key words: Designated Substances, Pharmaceutical Affairs Law in Japan, LC-QTOF/MS, GC-MS

キーワード: 指定薬物、医薬品医療機器等法、LC-QTOF/MS、GC-MS

はじめに

近年、危険ドラッグの乱用による事件事故が大きな社会問題となっている。危険ドラッグ中の成分は主に「医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律(医薬品医療機器等法)」で指定薬物として規制される成分であり、その危険性は麻薬や覚醒剤をしのぐものもある。現在 2,000 成分を超える化学物質が指定薬物とされている。国は、包括指定制度導入、認定手続きの簡素化、単純所持禁止等の対応を行い、規制の強化及び迅速化に取り組んでいる。

長崎県でも 2014 年度より危険ドラッグ及びその含有が疑われる嗜好品等を買上し、指定薬物の混入検査を開始した。本年度は、指定薬物成分の混入の可能性のある電子タバコキッド、清涼飲料水及び健康補助食品について検査を実施した。その結果について報告する。

調査方法

1 検体

指定薬物成分の混入の可能性のある物品として電子タバコキッド 5 製品を県内雑貨量販店から、清涼飲料水 4 製品及び栄養補助食品 1 製品をインターネット通販で試買し、計 10 製品を検体とした。

2 前処理

検体 25 mg をマイクロチューブに量り取り、メタノール 1 mL を加え、ボルテックス攪拌 30 秒及び 10 分間超音波照射による抽出後、遠心式フィルターユニット(メルクミリポア)でろ過した。ろ液をメタノールで 10 倍に希釈し、試験溶液とした。必要に応じ、適宜メタノールで希釈した。

3 分析装置

(1) ガスクロマトグラフィー質量分析装置 (GC-MS)

アジレントテクノロジー株式会社製 7890A/5975C GC/MSD を使用した。

(2) 高速液体クロマトグラフィー四重極飛行時間型質量分析装置 (LC-QTOF/MS-DAD)

ウォーターズ株式会社製 Waters ACQUITY UPLC I-CLASS / Xevo G2-XS QTOF を使用した。

4 分析条件

指定薬物の GC/MS 分析条件は、「指定薬物の分析法について」(2007 年 5 月 21 日付け薬食監麻発第 0521002 号監視指導・麻薬対策課通知)に準じて行った。また、LC-MS 分析条件は、平成 27 年度指定薬物分析研究会議の資料を参考にした。GC-MS 条件(表 1)及び LC-QTOF/MS-DAD 条件(表 2)に示す。

5 スクリーニング検査

GC/MS スキャン分析で取得したデータを対象に、AMDIS プログラム(NIST)を用い、Deconvolution 処理を行った。処理されたピークについて、当センターで作成した「指定薬物 GC/MS ライブラリー」、国衛研「違法ドラッグ閲覧データシステム」、「SWGDRUG Mass Spectral Library」及び「Cayman Spectral Library」を用い、各検体に含まれる指定薬物及び類似体のスクリーニングを行った。

LC-QTOF/MS スキャン分析(MS^E モード)では、取得したデータを対象に当センターで作成した「指定薬物の精密質量数データベース」を用いた検索を行った。

検査結果

2016 年度指定薬物の検査において、医薬品医療機器等法第 2 条第 15 項に規定する指定薬物を含有する製品は確認されなかった。

参 考 文 献

- 1) 厚生労働省医薬食品局監視指導・麻薬対策課長通知:指定薬物の分析法について。2007年5月21日, 薬食監麻発 0521002 号(2007)
- 2) 野澤真里奈他; 違法ドラッグ試買検査の実施について(2011), 京都府保環研年報, **57**, 56~63 (2012)
- 3) 高橋市長、他; 千葉県における違法ドラッグ試験検査について(平成 21 年度), 千葉県衛生研究所年報,**58**, 51~54 (2009)
- 4) 武田章弘、他; 平成 23・24 年度の違法ドラッグ買上調査について. 大阪府立公衛研所報, 51, 23~27 (2013)
- 5) 内山菜穂子; 平成 27 年度指定薬物分析研究会議. 資料「危険ドラッグ製品の分析及び成分の同定について」(2015)

表 1 GC-MS 分析条件

<p>【条件1】</p> <p>カラム:HP-1MS(30 m×0.25 mm i.d., 膜厚 0.25 μm, Agilent 製)</p> <p>キャリアーガス:He, 0.7 mL/min</p> <p>(リテンションタイムロッキング:MDPPP:27.8 min)</p> <p>注入口温度:200°C、スプリットレス</p> <p>検出器温度:280°C</p> <p>イオン化法:EI</p> <p>カラム温度:80°C(1 min)–5°C/min–190°C(15 min)–10°C/min–310°C(10 min)</p> <p>スキャン:m/z: 40–550</p>	<p>【条件2】(合成カンナビノイド用)</p> <p>カラム:HP-1MS(30 m×0.25 mm i.d., 膜厚 0.25 μm, Agilent 製)</p> <p>キャリアーガス:He, 1.1 mL/min</p> <p>(リテンションタイムロッキング:MDPPP:4.96 min)</p> <p>注入口温度:250°C、スプリットレス</p> <p>検出器温度:280°C</p> <p>イオン化法:EI</p> <p>カラム温度:200°C(1 min)–5°C/min–310°C(7 min)</p> <p>スキャン:m/z: 40–550</p>
---	--

表 2 LC-QTOF/MS-DAD 分析条件

<p>【条件1】</p> <p>カラム:ACQUITY UPLC HSS T3 (2.1×100 mm, 1.8 μm, Waters 製)</p> <p>ガードカラム: Van Guard column (2.1 mm×5 mm, 1.8 μm, Waters 製)</p> <p>移動相 A:0.1%ギ酸</p> <p>移動相 B:0.1%ギ酸アセトニトリル</p> <p>グラジエント条件:A(%)/B(%)=95/5(0 min)–80/20(20 min)–20/80(30 min, 10 min Fold)</p> <p>流速:0.3 mL/min</p> <p>カラム温度:約 40°C</p> <p>イオン化法:ESI</p> <p>DAD スキャン範囲:210–450 nm</p> <p>MS スキャン:m/z 100–1000</p>	<p>【条件2】(合成カンナビノイド用)</p> <p>カラム:ACQUITY UPLC HSS T3 (2.1×100 mm, 1.8 μm, Waters 製)</p> <p>ガードカラム: Van Guard column (2.1 mm×5 mm, 1.8 μm, Waters 製)</p> <p>移動相 A:0.1%ギ酸</p> <p>移動相 B:0.1%ギ酸アセトニトリル</p> <p>グラジエント条件:A(%)/B(%)=65/35(4 min fold)–35/5 to 25/75 (4–16 min)–10/90(16–17 min, 6 min fold)</p> <p>流速:0.3 mL/min</p> <p>カラム温度:約 40°C</p> <p>イオン化法:ESI</p> <p>DAD スキャン範囲:210–450 nm</p> <p>MS スキャン:m/z 100–1000</p>
---	--

感染症サーベイランスにおけるウイルス感染症(2016年度)

三浦 佳奈、山下 綾香、松本 文昭、吉川 亮、田栗 利紹

Annual Surveillance Report of Viral Infectious Diseases in 2016

Kana MIURA, Ayaka YAMASHITA, Fumiaki MATSUMOTO, Akira YOSHIKAWA
and Toshitsugu TAGURI

Key word : Surveillance, SFTS, Japanese spotted fever, Japanese Encephalitis

キーワード: サーベイランス、重症熱性血小板減少症候群、日本紅斑熱、日本脳炎

はじめに

感染症サーベイランス(発生動向調査)は、1999年4月1日施行された「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律」、いわゆる「感染症法」に基づき、県内の患者発生状況、病原体の検索等感染症に関する情報をITの活用により早期かつ的確に把握し、その情報を速やかに地域に還元(情報提供・公開)することにより、医療機関における適切な初期診断を推進することを旨とする。その後、鳥インフルエンザ(H7N9)及び中東呼吸器症候群(MERS)などの新たな感染症が海外で発生しており、これらの感染症に対し万全の対策を講じることが必要とされた。また、デング熱などの昨今の感染症の発生状況、国際交流の進展、保健医療を取り巻く環境の変化等を踏まえ、感染症に対応する体制を一層強化するために、「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律の一部を改正する法律(平成26年法律第115号)」が2014年11月21日に公布された。

また、2015年9月に感染症法施行規則(省令)の改正が公布され、当センターにおいても、検体・病原体検査を行うために必要な検査室の設置、検査の精度管理の実施、「検査部門管理者」、「信頼性確保部門責任者」の設置及び、検査の実施に必要な検査標準作業書、検査の信頼性確保試験標準作業書の作成等の整備を行なった。

さらに、感染症法の一部改正法及び感染症法施行規則の一部を改正する省令の公布に伴い、「長崎県感染症発生動向調査実施要綱」¹⁾の一部改正を行なった。要綱に基づき、県内の医療機関からウイルス性の感染症が疑われた患者の検体が適宜採取、搬入さ

れている。

そこで、今年度搬入された検体について、ウイルス分離及びウイルス遺伝子の検索等を試みたので、その概要について報告する。

調査方法

1 検査材料

政令市(長崎市、佐世保市)、及び県立保健所管轄の10地域において、長崎県感染症発生動向調査事業実施要綱に基づき選定された基幹定点医療機関及び病原体定点医療機関または協力医療機関等から採取された検体(咽頭ぬぐい液、鼻腔ぬぐい液、糞便(直腸ぬぐい液)、髄液、血液、血清、尿、その他)について、医療機関の最寄りの管轄保健所を通じて搬入された検体を検査材料とした。

検査のために搬入された検査材料の内訳は、患者328名より採取された咽頭ぬぐい液104件、鼻腔ぬぐい液160件、糞便28件、髄液16件、血液35件、血清52件、尿12件、その他35件で総数460件であった(表1)。

2 検査方法

改正感染症法の施行に伴い、既報²⁻⁴⁾及び病原体検出マニュアル、各検査マニュアル等⁵⁻¹³⁾に準じて、検体の前処理、細胞培養、ウイルス分離・同定・検出、遺伝子検査等について検査標準作業書を作成し、これに基づき実施した。

表1. 疾病別の被検者数及び検体件数内訳

疾病名	検査材料(内訳)									
	被検者数 (人)	検体数(件)	咽頭拭い液	鼻腔拭い液	糞便	髄液	血液	血清	尿	その他
インフルエンザ様疾患	192	192	30	160						2
麻しん	3	9	3				3		3	
風しん	3	9	2		1		2	2	2	
デング熱	1	1						1		
ジカ熱	2	5					1	2	2	
日本脳炎	7	23	6		6	3	3	5		
SFTS・リケッチア感染症	40	81					20	37		24
無菌性髄膜炎	14	54	12		12	13	6	5	5	1
手足口病	26	26	26							
ヘルパンギーナ	9	9	9							
発疹症	13	13	13							
感染性胃腸炎	10	12	3		9					
流行性角結膜炎	8	8								8
その他		18								
計	328	460	104	160	28	16	35	52	12	35

調査結果及び考察

表1に疾病別の被検者数及び検体件数の内訳を示す。

1 インフルエンザ様疾患

2014年の感染症法改正に基づき、情報収集体制の強化がなされ、季節性インフルエンザに関しては、指定提出機関制度が創設された。人口、医療機関の分布を考慮し、病原体定点の選定、調査単位を定め、調査単位ごとに少なくとも1検体提出することとなった。

今年度検査した患者328名のうちで、最多疾病はインフルエンザ様疾患の192名であった。PCRにより陽性と判定した結果の内訳は、A/香港型(H3N2)が122件(63%)と半数以上を占め、B型が46件(24%)、A/H1pdm09型が7件(4%)と続き、残る17件(9%)からはインフルエンザウイルスの遺伝子は検出されなかった。全国的にA/H1pdm09型が流行の主流となった2015年とは異なり、2016年はA/香港型が主要な流行型であった。年度当初(2015/2016 シーズン後半)は、A/H1pdm09型とB型が混在して検出されたが、2016/2017 シーズンに入ってから、A/H3型が大勢を占めた。長崎県における今シーズンのインフルエンザの流行は、

全国的な傾向からやや遅れて、2016年第42週(10/17~23)から急激に報告数が増加し、第48週(11/28~12/4)には国の流行入りの目安となる定点あたり1.00人を超えた。これ以降も報告数は増加し続け、第5週(1/30~2/5)にはピーク(定点当たり報告数37.8人 患者報告数2,644人)を迎えた(図1)。

2 麻しん

麻しんを疑う検体が3名分9検体(咽頭ぬぐい液、血液、尿)搬入され、ウイルス遺伝子の検出を試みたが、いずれの検体からも麻しんウイルスの遺伝子は検出されなかった。

2013年4月に一部改正された「麻しんに関する特定感染症予防指針」の中で、2015年度までの麻しん排除を目標に掲げ、取り組みが進められてきたところであるが、2015年3月27日に、日本を含む3カ国が新たに麻しんの排除状態にあることが認定された。しかし、2016年は全国各地で麻疹の患者報告が相次いだ。さらに、同年8月には関西国際空港勤務者が発端と考えられる集団発生が報告され、麻しん排除が認定された後では最大の規模となった。

アジア、アフリカ、ヨーロッパ等では、現在も麻しん患者が多数発生している国が存在するため、今後も日

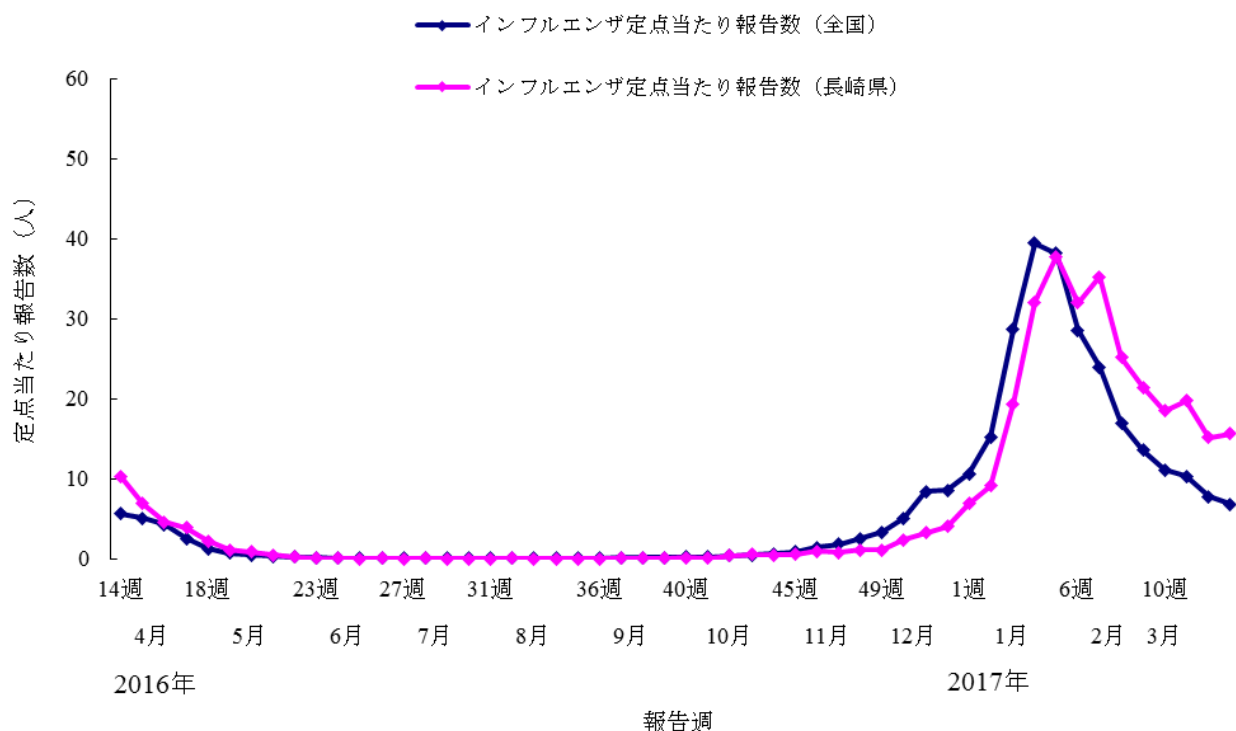


図 1. インフルエンザの定点当たり報告数の推移(2016年度)

本への輸入例は発生すると思われる。予防指針に基づき、原則として麻しん疑い全例に遺伝子検査が求められていることから、精度の高い検査体制の維持が求められている。

3 風しん

風しんを疑う検体が 3 名分 9 検体(咽頭ぬぐい液、糞便、血液、血清、尿)搬入され、風しんウイルス遺伝子の検出を試みた。いずれの検体からも風しんウイルスの遺伝子は検出されなかった。

2014 年 4 月 1 日付で「風しんに関する特定感染症予防指針」が策定され、2020 年度までに風しんを国内から排除することが目標として掲げられた。これを受け、本県においても 2015 年 2 月 16 日に新たに「長崎県麻しん風しん検査診断実施要領」が定められ、原則として麻しんまたは風しんと診断された全症例に対して遺伝子検査を実施することとしている。麻しんと同様に精度の高い検査体制の維持が求められている。

4 デング熱

デング熱を疑う検体が 1 名分 1 検体(血清)搬入され、デングウイルスの遺伝子検出を試みたが、デングウイルスの遺伝子は検出されなかった。

デング熱、デング出血熱は、有効な抗ウイルス薬は

なく対症療法が基本となる。予防のためのワクチンは未だ実用化されていないため、ウイルスを媒介するヒトスジシマカとの接触を避け、刺されないようにすることが重要である。具体的には、長袖・長ズボンの着用、昆虫忌避剤の使用などがあげられる。

2014 年のデング熱国内感染例の発生に伴い、2015 年に蚊媒介感染症に関する特定感染症予防指針が施行された。長崎県内では、長崎および佐世保市内の公園において、蚊のモニタリング調査が実施されており、当センターでは捕獲された蚊に対する遺伝子検査を行っている。現在までに長崎県内では蚊からデング熱、チクングニア熱等の蚊媒介性感染症の原因ウイルス遺伝子が検出された事例はない。

5 ジカウイルス

ジカ熱を疑う検体が 2 名分 5 検体(血液、血清、尿)搬入され、ジカウイルスの遺伝子検出を試みたが、ジカウイルスの遺伝子は検出されなかった。

ジカ熱は、有効な抗ウイルス薬はなく対症療法が基本となる。予防のためのワクチンはないため、ウイルスを媒介するヒトスジシマカとの接触を避け、刺されないようにすることが重要である。具体的には、長袖・長ズボンの着用、昆虫忌避剤の使用等があげられる。また、妊婦あるいは妊娠の可能性のある女性はジカ熱流行

地への渡航を避けることが望ましい。

6 日本脳炎

日本脳炎を疑う検体が、7 名分 23 検体(咽頭拭い液、糞便、髄液、血液、血清)搬入され、日本脳炎ウイルス(Japanese Encephalitis virus : JEV)の遺伝子検出および ELISA 法による IgM 抗体の検出を試みたところ、患者 4 名の検体で JEV-IgM 抗体価の上昇が認められ、日本脳炎の罹患が確認された。JEV 遺伝子は検出されなかった。

県内における本疾患の発生は 2013 年 9 月以来であった。患者は 80 歳代男性 1 名、70 代男性 2 名、80 歳代女性 1 名で髄膜炎、意識障害、脳炎、脳症の症状を呈していた。

来期の患者発生をみないために、感染症流行予測調査に基づく注意報発令の他にも、対馬市においては、コガタアカイエカ等の蚊の消長を把握し、早期注意喚起のための調査を実施している。

7 重症熱性血小板減少症候群(SFTS)、リケッチア感染症

SFTS、リケッチア感染症を疑われた患者 40 名分 81 検体(血液、急性期及び回復期のペア血清、その他(痂皮、生検材料等))が搬入された。SFTS については、SFTS ウイルスの遺伝子は検出されなかった。

現段階では本疾患に対する確立された治療法はなく、対症療法のみである。有効な抗ウイルス薬もないことから、野外の藪や草むらに生息するマダニ類に咬まれないよう感染予防を心がけることが重要である。具体的には長袖・長ズボンの着用や昆虫忌避剤の使用等あげられる。また、屋外活動後はシャワー等を浴びて、マダニに刺されていないか確認を行なうことも重要である¹⁴⁾。

つつが虫病(*Orientia tsutsugamushi* 以下、*O.t*)及び日本紅斑熱(*Rickettsia japonica* 以下、*R.j*)については遺伝子検査または抗体価測定或いはその両方を実施した。

急性期検体を対象とした遺伝子検査について、40 名分 66 検体の急性期検体、急性期血液または刺し口の痂皮等を用いて実施したところ、痂皮提供者 18 名中 4 名の検体から *O.t* の遺伝子を検出し、18 名中 5 名(6 検体)の検体から *R.j* の遺伝子を検出した。急性期血清、血液提供者 32 名中 2 名の検体から *O.t* の遺伝子を検出し、32 名中 1 名の検体から *R.j* の遺伝子を検出した。急性期血清、血液から *O.t* の遺伝子を検

出した患者は痂皮からも *O.t* の遺伝子が検出されていた。抗体価測定については、間接蛍光抗体法によりつつが虫病及び、日本紅斑熱に対する抗体価測定を実施した。13 名分 25 検体について検査を行った結果、3 名(4 検体)から *O.t* に対する抗体を検出した。

最終的に検査結果が陽性となった内訳は、依頼された40名のうち13名であった。

8 無菌性髄膜炎(急性脳炎等を含む)

無菌性髄膜炎や急性脳炎等と診断された患者検体が、14 名分 54 検体(咽頭ぬぐい液、糞便、髄液、血液、血清、尿、その他(血漿))搬入された。

搬入された検体に対し、CODEHOP VP1 RT- sn PCR による EVs の遺伝子検索を実施した。その結果、8 名の検体から EVs の遺伝子を検出し、解析の結果 6 名はコクサッキーウイルス B5 型、残る 2 名はエコーウイルス 9 型と同定された。コクサッキーウイルス B5 型が検出された患者のうち 1 名については、無菌性髄膜炎とは直接の原因とは考えにくい、咽頭拭い液からライノウイルスが検出された。2016 年は全国的にコクサッキーウイルス B5 型が多く検出されており、本県においても同様の傾向を示した。

9 手足口病

手足口病を疑う検体 26 名分 26 検体(咽頭ぬぐい液)が搬入された。それらに対して、CODEHOP VP1 RT-sn PCR による EVs 遺伝子検索を実施した。その結果、24 名の検体から EVs の遺伝子を検出し、それらを解析したところ 12 名がコクサッキーウイルス A16 型、10 名がコクサッキーウイルス A6 型、1 名がコクサッキーウイルス A5 型、1 名はエコーウイルス 9 型と同定された。

手足口病は、基本的に予後良好な疾患であるが、原因ウイルスには EV71 など中枢神経症状を起しやすいため、含まれるため、継続した病原体サーベイランスと必要に応じた注意喚起が重要である。

10 ヘルパンギーナ

ヘルパンギーナを疑う検体 9 名分 9 検体(咽頭ぬぐい液)が搬入され、いずれの検体についても CODEHOP VP1 RT-sn PCR を用いた EVs の遺伝子検索を実施した。その結果、5 検体から EVs の遺伝子が検出し、それらを解析したところ 4 名がコクサッキーウイルス A4 型、残る 1 名がコクサッキーウイルス A6 型と同定された。

ヘルパンギーナは、発熱と水疱性発疹を主徴とする疾患で、基本的に予後良好であるが、場合によっては髄膜炎や脳炎などの重篤な合併症を併発することがあるので、手足口病同様、流行時には適宜注意喚起を行うなどの対応が必要である。

11 発疹症

発疹症と診断された患者検体が 13 名分 13 検体搬入され、それらに対し CODEHOP VP1 RT-sn PCR を用いた EVs の遺伝子検索を実施した。その結果、9 検体から EVs の遺伝子が検出され、増幅産物の塩基配列からエコーウイルス 9 型と同定された。

12 感染性胃腸炎

感染性胃腸炎を疑う検体が、10 名分 12 検体(糞便、咽頭拭い液)搬入された。遺伝子検査を実施したところ、2 検体からウイルスの遺伝子を検出し、その内訳は、1 検体からノロウイルス、1 検体から EVs の遺伝子が検出された。得られた増幅産物を用いて各ウイルスについて遺伝子型別を行ったところ、ノロウイルスは GII.4、EVs はエコーウイルス 25 型であった。

感染性胃腸炎の病原体には、多くのウイルスが含まれるため、今後とも県内の発生動向を注視していく必要がある。

13 流行性角結膜炎

流行性角結膜炎を疑う検体 8 名分 8 検体(結膜ぬぐい液)搬入された。遺伝子検査を実施したところ、7 検体からアデノウイルスの遺伝子を検出した。遺伝子型別のため、ペントン(P)、ヘキソン(H)、ファイバー(F)の 3 つの領域の遺伝子を解析した結果、今回検出したアデノウイルスは、2015 年より国内流行の主流であるアデノウイルス 54 型と同定された。アデノウイルスは呼吸器症状から消化器症状まで多彩な臨床症状を示すため、眼疾患以外の症例からも、積極的な検索を行う必要がある。

謝 辞

感染症発生動向調査にご協力頂いた各定点医療機関及び協力医療機関の諸先生、検体の収集及び搬入にご協力頂きました長崎市、佐世保市、県立各保健所の関係諸氏に深謝する。

参 考 文 献

- 1) 長崎県感染症発生動向調査実施要綱
- 2) 山口 顕徳 他:感染症サーベイランスにおけるウイルス分離(2010 年度)長崎県環境保健研究センター所報 56、99-104 (2010)
- 3) 山口 顕徳 他:感染症サーベイランスにおけるウイルス分離(2011 年度)長崎県環境保健研究センター所報 57、104-110 (2011)
- 4) 北川 由美香 他:感染症サーベイランスにおけるウイルス分離(2012 年度)長崎県環境保健研究センター所報 58、119-125 (2012)
- 5) 病原体検出マニュアル(国立感染症研究所)
- 6) 麻しん診断マニュアル第 3.4 版 平成 29 年 4 月(国立感染症研究所)
- 7) 風しん診断マニュアル第 3.1 版 平成 27 年 8 月(国立感染症研究所)
- 8) SFTSウイルス検出マニュアル 平成25年3月13日(厚生労働科学研究 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業「現在、国内で分離・同定できないウイルス性出血熱等の診断等の対応方法に関する研究」班)
- 9) Nix WA, Oberste MP, Pallansch MA. Sensitive, seminested PCR amplification of VP1 sequences for direct identification of all enterovirus serotypes from original clinical specimens. *J Clin Microbiol* 2006; 44:2698-704.
- 10) CDC Enterovirus Laboratories Procedure EV010-10, VP1RT-snPCR for Clinical Specimens 2005 (CDC, USA)
- 11) デングウイルス感染症診断マニュアル(国立感染症研究所)
- 12) 咽頭結膜熱・流行性角結膜炎検査, 診断マニュアル(国立感染症研究所)
- 13) ロタウイルスの検出法(国立感染症研究所)
- 14) 厚生労働省 重症熱性血小板減少症候群(SFTS)に関する Q&A

長崎県における日本脳炎の疫学調査(2016年度)

— 豚の日本脳炎ウイルスに対する抗体保有状況調査 —

吉川 亮、山下 綾香、三浦 佳奈、田栗 利紹

Epidemiological Study of Japanese Encephalitis in Nagasaki Prefecture (2016)

— Surveillance of swine infected by Japanese Encephalitis Virus —

Akira YOSHIKAWA, Ayaka Yamashita, Kana MIURA and Toshitsugu TAGURI

Key words : Japanese Encephalitis, Arbovirus, Swine Infection, HI Antibody Positive Rate

キーワード : 日本脳炎、アルボウイルス、豚感染、HI抗体陽性率

はじめに

日本脳炎ウイルス(以下、JEV)は、Flavivirus 属に属し、コガタアカイエカが媒介するアルボウイルスである。その生態環は、「蚊→豚(時にトリ)→蚊」の感染サイクルを形成しており、ヒトは JEV 感染の終末宿主である。従って、ウイルス増幅動物としての豚の感染状況が、ヒトへの感染を大きく左右するものと考えられる。

現在、日本脳炎の流行地は、東アジア、東南アジア、南アジアからオーストラリアにまで拡大し、年間数百万人の日本脳炎患者が発生している。発症すると典型的な脳炎を呈し、1~2 日で 40°C 以上の高熱となる。頭痛、嘔吐、頸部硬直などの髄膜刺激症状が現れ、次いで意識障害、筋硬直、けいれん等の脳炎症状が出現する。

近年、本邦での日本脳炎確認患者は、1965 年以前と比べ激減しているが、その患者発生の強力な抑制因子としては、ヒトに対するワクチン接種による免疫賦与、コガタアカイエカの減少、豚飼育環境の変化の 3 点がその大きな役割を担っていると考えられる。¹⁾

本県では、厚生労働省の定めた感染症流行予測調査実施要領に基づいて、豚の感染源調査を実施するとともに、日本脳炎の発生予防とまん延防止を図ることを目的とした「感染症流行予測調査事業(日本脳炎感染源調査)における注意喚起等実施要領(別紙)」に基づき、豚血清からの JEV 遺伝子の検出ならびに豚血清中の抗 JEV-IgM 抗体の測定を行っている。本年度の概要について報告する。

また、2013 年以來 3 年ぶりに県内での患者発生報告があり、当センターにおいて確認検査を行ったので、

併せて報告する。

調査方法

1 感染源調査

(1) 調査時期及び回数

7 月初旬~9 月中旬に計 8 回実施した。

(2) 調査対象及び検体

調査対象は、諫早市内で飼育された生後約 6 ヶ月の肥育豚から佐世保市と畜場において放血液を採取した 80 頭とし、検体は調査対象の血清とした。

(3) 調査事項

感染症流行予測調査事業検査術式に従い、JEV 赤血球凝集抑制(HI)抗体の測定及び 2-ME (2-Mercaptoethanol) 感受性抗体の測定を行った。

2 JEV 遺伝子検索

採血後の豚血清より QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) を用いて RNA 抽出し、E 領域(JEV-JaGAR 01;978~2,477)に設定したプライマーセット及び SuperScript III One Step RT-PCR システム(Invitrogen)を用いて 1 次増幅反応を行った後、その産物の一部を用いて 2 次増幅反応を行った。遺伝子増幅反応(PCR)条件及びプライマーを図 1 に示す。増幅産物は、アガロースゲル電気泳動を行って確認し、1 次増幅産物は 381 bp (JEV-JaGAR 01; 2,097~2,477)、2 次増幅産物は 326 bp (JEV-JaGAR 01; 2,124~2,449)の位置にバンドが確認されたものを陽性とした。

3 JEV の分離

ウイルス遺伝子の存在が確認された血清について、Vero 9013 細胞に接種して JEV の分離を行った。すなわち、24 ウェルマルチプレートに単層を形成させた Vero 9013 細胞を滅菌リン酸緩衝食塩水 (PBS) で 2 回洗浄した後、各ウェルに維持培養液 (2% 非動化牛胎児血清加 Eagle MEM) 900 μ L を加え、被検血清 100 μ L ずつ 2 ウェルにそれぞれ接種してウイルス分離を行った。炭酸ガス培養機 (37°C、5% CO₂、95% Air) 内で 7 日間培養して細胞変性効果 (CPE) の有無を判定し、明瞭な CPE が観察されなかった場合は、感染細胞の遠心上清を再度 Vero 9013 細胞に接種して盲継代を 1~2 回行った。

4 JEV の確認

明瞭な CPE が観察された場合は、感染細胞の培養上清から抽出した RNA を鋳型にして NS3 領域に

設定されたプライマーセット²⁾を用いた PCR により JEV 遺伝子を確認した。PCR 反応条件を図 2 に示す。

増幅産物は、アガロースゲル電気泳動を行って確認し、162 bp (JEV-JaGAr 01; 5,739~5,900) の位置にバンドが確認されたものを陽性とした。

5 抗 JEV-IgM 抗体測定

HI 抗体測定を行った同一客体の血清を用いて抗 JEV-IgM capture ELISA により豚血清中の抗 JEV-IgM 抗体を測定した。ELISA の条件等は表 2 に示す。

抗 JEV-IgM 抗体陽性は、P/N ratio \geq 2.00 (陰性対照血清の吸光度測定値に対して豚血清の吸光度測定値が 2 倍以上) とした。

① 1 次増幅反応 (One step RT-PCR)						
< primer set >		JE8K-S : 5' ATGGAACCCCCCTTC 3' (JEV-JaGAr 01; 2,097-2,111)				
		JEER : 5' AGCAGGCACATTGGTTCGCTA 3' (JEV-JaGAr 01; 2,458-2,477)				
< 組成 >			< 反応条件 >			
	volume	final conc.	temp.	time	cycles	
2 \times Reaction Mix	12.5 μ L		53°C	15 min.	1	
primer (JE8K-S: 25 μ M)	0.2 μ L	0.2 μ M	94°C	2 min.	1	
primer (JEER: 25 μ M)	0.2 μ L	0.2 μ M	94°C	15 sec.		
SSIII/Platinum Taq Mix	0.5 μ L		53°C	30 sec.	40	
DW (DNase/RNase free)	10.1 μ L		68°C	1 min.		
extract RNA	1.5 μ L		68°C	5 min.	1	
total	25 μ L		4°C	∞	1	
② 2 次増幅反応 (2nd PCR)						
< primer set >		JE8K inner-S : 5' ATCGTGGTTGGGAGGGGAGA 3' (JEV-JaGAr 01; 2,124-2,143)				
		JEER inner-C : 5' AGCACACCTCCTGTGGCTAA 3' (JEV-JaGAr 01; 2,430-2,449)				
< 組成 >			< 反応条件 >			
	volume	final conc.	temp.	time	cycles	
10 \times EX Taq Buffer	2.5 μ L		94°C	5 min.	1	
dNTP mixture (25 mM each)	2.0 μ L	0.2 mM each	94°C	15 sec.		
primer (JE8K inner-S: 25 μ M)	0.2 μ L	0.2 μ M	53°C	30 sec.	25	
primer (JEER inner-C: 25 μ M)	0.2 μ L	0.2 μ M	72°C	1 min.		
TaKaRa EX Taq HS	0.125 μ L	0.025 U/ μ L	72°C	5 min.	1	
DW (DNase/RNase free)	18.475 μ L		4°C	∞	1	
1 st PCR products	1.5 μ L					
total	25 μ L					

図 1 JEV 遺伝子の検索

< primer set > JE-NS3-1S : 5' AGAGCGGGGAAAAAGGTTCAT 3' (JEV-JaGAr 01;5,739-5,758) JE-NS3-4R : 5' TTTCACGCTCTTTCTACAGT 3' (JEV-JaGAr 01;5,891-5,900)					
< 組成 >			< 反応条件 >		
	volume	final conc.	temp.	time	cycles
2× Reaction Mix	12.5 μL		50°C	30 min.	1
primer (NS3-1S : 25 μM)	0.2 μL	0.2 μM	94°C	2 min.	1
primer (NS3-4R: 25 μM)	0.2 μL	0.2 μM	94°C	15 sec.	40
SSIII/Platinum Taq Mix	0.5 μL		53°C	30 sec.	
DW (DNase/RNase free)	10.1 μL		68°C	1 min.	
extract RNA	5 μL		68°C	5 min.	1
total	25 μL		4°C	∞	1

図2 JEV の PCR による確認

6 日本脳炎患者確認試験

(1) 患者情報

患者 1: 対馬市在住 80 代男性、近医を受診後、別の市内医療機関を紹介され入院。2016 年 8 月 31 日に発症、症状は発熱、麻痺および髄膜炎、既往症として前立腺癌、海外渡航歴なし

患者 2: 対馬市在住 70 代男性、2016 年 8 月 20 日に発症、症状は発熱、脳炎、髄膜炎および意識障害(後遺症あり)、既往症として胃癌および胸腺腫、海外渡航歴なし

患者 3: 対馬市在住 80 代女性、2016 年 8 月 31 日に発症、症状: 発熱、麻痺、髄膜炎、意識障害および中枢神経系症状、既往歴なし、海外渡航歴なし

患者 4: 対馬市在住 70 代男性、2016 年 9 月 15 日に発症、症状は発熱、麻痺、髄膜炎および意識障害、既往症として器質化肺炎および心房細動、海外渡航歴なし

いずれの患者も脳炎疑いで種々の検査を実施するも原因が特定されなかったため、9 月 21 日に日本脳炎の検査依頼が行われた。

(2) 検体

患者 1: 2016 年 9 月 21 日に採取された患者血清

患者 2: 2016 年 8 月 20 日、8 月 27 日および 9 月 9 日に採取された髄液および 2016 年 9 月 21 日に採取された患者血清

患者 3: 2016 年 9 月 1 日および 9 月 13 日に採取された髄液および 2016 年 9 月 21 日に採取された患者血清

患者 4: 2016 年 9 月 21 日に採取された患者血清

(3) 検査項目

JEV 遺伝子検索および抗 JEV-IgM 抗体価測定を行った。

JEV 遺伝子検索は豚の JEV 遺伝子検索と同様の方法および図 4 で示した方法³⁾で併せて行った。図 3 で示した方法の増幅産物は、アガロースゲル電気泳動を行って確認し、1 次増幅産物は 292 bp (JEV-JaGAr 01; 1,015~1,306)、2 次増幅産物は 194 bp (JEV-JaGAr 01; 1,076~1,269) の位置にバンドが確認されたものを陽性とした。

抗 JEV-IgM 抗体は IgM capture ELISA for JE (Focus 変法 NIID) を用いて測定し、P/N ratio ≥ 2.00 (陰性対照血清の吸光度測定値に対して患者血清の吸光度測定値が 2 倍以上) を抗 JEV-IgM 抗体陽性とした。

(4) 国立感染症研究所による確認検査

当該事例は公衆衛生上非常に大きい問題であることから国立感染症研究所に確認検査を依頼した。

< anti JEV-IgM capture ELISA >

- 1) Dilute positive control sera, negative control sera and samples to 1:100 in PBS-T (PBS with tween 20) with 10% Block Ace (DS Pharma Biomedical).
- 2) Dilute anti Pig-IgM (BETHYL) to 1:100 in Carbonate-Bicarbonate Buffer (SIGMA).
- 3) Add 100 μL of diluted anti Pig-IgM to each well.
- 4) Incubate overnight at 4°C.
- 5) Wash wells 3 times with PBS-T.
- 6) Add 100 μL of Block Ace to each well.
- 7) Incubate at 37°C for 1 hr.
- 8) Wash wells 3 times with PBS-T.
- 9) Add 100 μL of diluted positive control sera, negative control sera and samples to each well.
- 10) Incubate at 37°C for 1 hr.
- 11) Wash wells 3 times with PBS-T.
- 12) Add 100 μL of JEV (JaGAr 01 strain) inactivated antigen to each well.
- 13) Incubate at 37°C for 1 hr.
- 14) Wash wells 3 times with PBS-T.
- 15) Add 100 μL of 6B6C-1 MAAb (HRPO-conjugated anti-flavivirus IgG) to each well.
- 16) Incubate at 37°C for 1 hr.
- 17) Wash wells 3 times with PBS-T.
- 18) Add 100 μL of OPD (SIGMA) in Phosphate-Citrate Buffer (SIGMA)
- 19) Incubate at RT (room temperature) for 20 min under dark condition.
- 20) Add 100 μL of stop solution (1N H₂SO₄) to each well
- 21) Read OD 425 nm and calculate Positive/Negative (P/N) Ratio.

$$P/N \text{ Ratio} = (\text{OD}_{425} \text{ of sample serum}) / (\text{OD}_{425} \text{ of negative control sera})$$

$$P/N \text{ Ratio} \geq 2.00 \text{ is determined to positive}$$

図3 抗 JEV-IgM 抗体測定条件

① 1次増幅反応 (One step RT-PCR)

< primer set > JEen37s-first : 5' AAGGAGCCAGTGGAGCCACTT 3' (JEV-JaGAr 01;1,015-1,035)
 JEen329c-first : 5' TTCCCGAAAAGTCCACATCC 3' (JEV-JaGAr 01;1,287-1,306)

< 組成 >

	volume	final conc.
2× Reaction Mix	12.5 μL	
primer (JEen37s-1st: 25 μM)	0.2 μL	0.2 μM
primer (JEen329c-1st: 25 μM)	0.2 μL	0.2 μM
SSIII/Platinum Taq Mix	0.5 μL	
DW (DNase/RNase free)	10.1 μL	
extract RNA	1.5 μL	
total	25 μL	

< 反応条件 >

temp.	time	cycles
53°C	15 min.	1
94°C	2 min.	1
94°C	15 sec.	40
53°C	30 sec.	
68°C	1 min.	
68°C	5 min.	1
4°C	∞	1

図4 患者材料からの JEV 遺伝子の検出

② 2次増幅反応 (2nd PCR)

< primer set > JEen98s-second : 5' CATGGCAAACGACAAACCAAC 3' (JEV-JaGAR 01; 1,076-1,096)
 JEen301c-second:: 5' CAGTRAAGCCTTGTTTGCACAC 3' (JEV-JaGAR 01; 1,248-1,269)

< 組成 >

	volume	final conc.	< 反応条件 >		
10× EX Taq Buffer	2.5 μL		temp.	time	cycles
dNTP mixture (25 mM each)	2.0 μL	0.2 mM each	94°C	5 min.	1
primer (JEen98s-2nd: 25μM)	0.2 μL	0.2 μM	94°C	15 sec.	25
primer (JEen301c-2nd: 25μM)	0.2 μL	0.2 μM	53°C	30 sec.	
TaKaRa EX Taq HS	0.125 μL	0.025 U/μL	72°C	1 min.	
DW (DNase/RNase free)	18.475 μL		72°C	5 min.	1
1 st PCR products	1.5 μL		4°C	∞	1
total	25 μL				

図 4 患者材料からの JEV 遺伝子の検出(つづき)

表 1 2016 年度豚 HI 抗体陽性率及び 2-ME 感受性抗体陽性率体調査結果

採血 月日	採血 頭数	HI 抗体価 (倍)								HI抗体 陽性率 (%)	2-ME 抗体 陽性率 (%)
		<10	10	20	40	80	160	320	≥ 640		
7/5	10		6	4						100	-
7/12	10		2	7	1					100	0
7/26	10		8	2						100	-
8/5	10		2	8						100	-
8/16	10			10						100	-
8/23	10		1	9						100	-
9/6	10		10							100	-
9/13	10		2	1	1				6	100	2

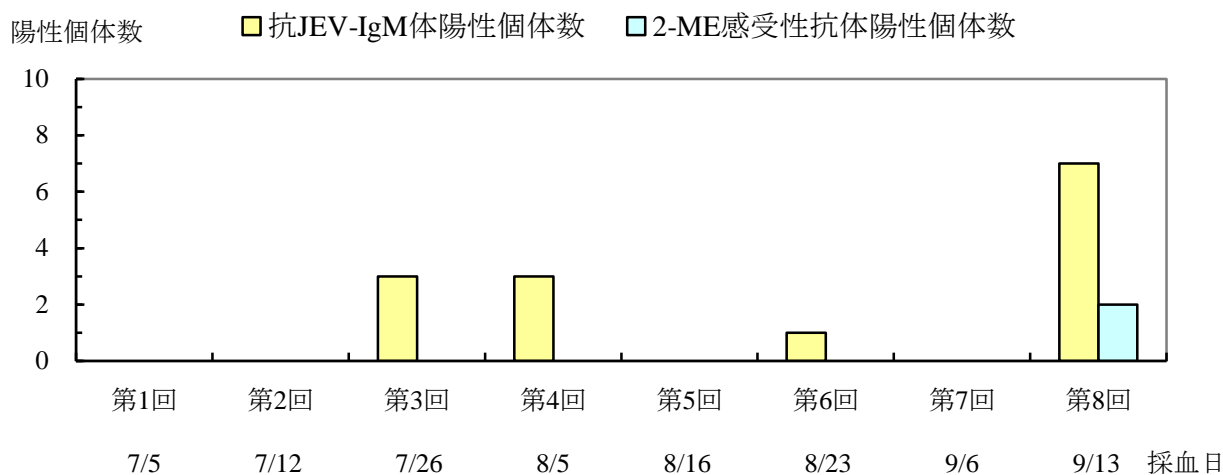


図 4 豚の抗 JEV-IgM 抗体及び 2-ME 感受性抗体陽性個体数の推移

調査結果及び考察

1 感染源調査結果

2016年度豚HI抗体陽性率及び2-ME感受性抗体陽性率調査結果を表1に示す。

2016年度は、7月5日に採血した豚10頭すべてがHI抗体陽性となった(陽性率100%)。9月13日に採血した豚10頭において、HI抗体価40倍以上となった7頭のうち2頭(陽性率28.6%)から初感染の指標となる2-ME感受性抗体が検出された以後もすべての個体においてJEVの感染が確認された。

保毒蚊が生後4~6ヶ月の免疫のない豚を吸血することで豚はJEVに感染し、2~3日の潜伏期を経て約3日間持続するウイルス血症を起こす。このウイルス血症時に吸血した蚊がウイルスに感染し、10~13日の潜伏期を経てウイルスを媒介するようになる⁴⁾ことから、2016年度の本県ではJEVを保有した蚊が6月には活動を既に開始し、9月以降も豚を吸血してウイルスを媒介しながら感染を拡大していた可能性が推察される。

2 JEV 遺伝子検索及び分離結果

豚血清中のJEV遺伝子検索を行ったところ、2016年9月6日に採血した2頭の血清からJEV遺伝子が確認された。さらに、この血清を用いてウイルス分離を実施したところ、血清を接種したVero9013細胞にCPEが出現し、培養上清のPCRでもJEVの標準株JaGAr 01株と同様にNS3領域162bpの産物が増幅されたことから、分離されたウイルスはJEVであることが確認された。

3 抗JEV-IgM抗体測定結果

豚の抗JEV-IgM抗体及び2-ME感受性抗体陽性個体数の推移を図4に示す。2016年7月26日に採血した3頭から初感染の指標である抗JEV-IgM抗体陽性の個体を確認した。また、この2016年7月26日に採血された同一検体を用いて行ったHI検査では、2-ME感受性抗体陽性個体は検出されなかったことから、その地域における初感染を把握するうえでは、既存のHI検査よりもIgM capture ELISAによるIgM抗体検出がより有用である。

4 日本脳炎患者確認試験結果

確認検査をIgM capture ELISA for JE (Focus 変法NIID)による抗JEV-IgM抗体測定および遺伝子検査により実施した。

4名の患者血清および髄液からJEV遺伝子は検出されなかったものの抗JEV-IgM抗体がいずれの検体から検出され、被験患者はJEVに感染している

ことが確認された。

まとめ

- 2016年度は7月7日に採血した10頭からHI抗体が、9月13日に採血した2頭から初感染の指標となる2-ME感受性抗体が最初に確認された。
- 9月6日に採血した2頭の血清からJEVが分離された。
- 2016年度は7月26日に採血した豚血清から抗JEV-IgM抗体陽性個体が3頭確認されたため、別紙の要領に基づき医療政策課から県民に向けた注意喚起が行われた。
- 県内の患者発生報告は2010年に1名、2011年に2名、2013年の1名(死亡例)に続き3年ぶりとなった。ただし、対馬市での患者発生は1960年代以来であり、4名の患者が続発したことは近年非常に珍しく、感染経路、感染源等の原因究明が求められた。
- 確認試験をIgM capture ELISA for JE (Focus 変法NIID)およびRT-PCRにより行った。患者4名の血清および髄液から抗JEV-IgM抗体を検出した。当該結果は国立感染症研究所にて実施された結果と同様であった。
- 日本脳炎確認患者は、1965年以前と比べ激減しているものの、2010年度1名、2011年度2名の患者報告に続き、2013度は1名の患者発生(死亡例)が確認された。さらに豚では依然JEVに対する抗体保有が確認されたことから、現在も生活環境中にJEVは確実に維持されており、新たな患者発生を防止するためにも県民に対する日本脳炎の注意喚起は今後も必要である。

謝辞

感染症(日本脳炎)流行予測調査事業にご協力いただいた長崎県央農業協同組合、佐世保食肉センター株式会社及び佐世保市食肉衛生検査所の関係各位に感謝する。

参考文献

- 厚生労働省健康局結核感染症課, 感染症流行予測調査事業検査術式, 2004
- Tanaka M: Rapid identification of flavivirus using the polymerase chain reaction. J Virol Methods, 41(3), 311-322 (1993)
- Kuwayama M, et al: Japanese Encephalitis Virus in

Meningitis Patients, Japan. Emerging Infectious Disease, 11(3), 471-473 (2005)

4) 厚生省保健医療局結核感染症課,改定・感染症マニユアル,1999

(別紙) 感染症流行予測調査事業(日本脳炎感染源調査)における注意喚起等実施要領

第1 目的

国が実施する感染症流行予測調査において、長崎県が受託して実施している日本脳炎感染源調査(ブタ感受性調査)の結果を適切に公表し、県民へ周知することで、日本脳炎の発生予防とまん延防止を図る。

第2 注意喚起の実施

注意喚起は、日本脳炎感染源調査において次に掲げる項目のいずれかを満たした場合、速やかに実施する。

- 1) 調査客体(ブタ)のHI 抗体保有率が50%を超え、かつ2-ME感受性抗体を検出
- 2) PCR によるブタ血清からの日本脳炎ウイルス遺伝子の確認
- 3) IgM 捕捉ELISA による陽性個体(ブタ)の確認

第3 実施方法

1. 環境保健研究センターは検査結果が判明し次第、医療政策課へ検査結果及び基準を満たした旨を報告する。
2. 報告を受けた医療政策課は、保健所、一般社団法人長崎県医師会及び報道機関等に対して情報提供を行う。
3. 環境保健研究センターは感染症発生動向調査速報において、関係機関等への注意喚起に努める。
4. 情報提供を受けた保健所は、必要に応じて地域住民、関係機関等へ周知する。

附則 この要領は平成25年7月30日から施行する。

食中毒における病因物質の概要 (2016 年度)

高木 由美香、山下 綾香、蔡 国喜、三浦 佳奈、川野 みどり、田栗 利紹

Prevalence and Etiological Agents of Food Poisoning in Nagasaki (2016)

Yumika TAKAKI, Ayaka YAMASHITA, Guoxi CAI, Kana MIURA, Midori KAWANO and Toshitugu TAGURI

key words: Food poisoning, *Campylobacter jejuni*, Norovirus, *Kudoa septempunctata*

キーワード: 食中毒, カンピロバクター・ジェジュニ, ノロウイルス, クドア・セプテンブククタータ

はじめに

1997 年 5 月 30 日の食品衛生法施行規則の改正でノロウイルス (2003 年 8 月 29 日同規則改正で小型球形ウイルスから名称変更) 及びその他のウイルスと腸管出血性大腸菌 (VT 産生) が、1999 年 12 月 28 日には同規則改正によりコレラ菌、赤痢菌、チフス菌、パラチフス A 菌が、2012 年 12 月 28 日にはクドア、ザルコシスティス、アニサキス及びその他の寄生虫が食中毒事件票に病因物質として追加された。これらの施行規則の改正により、ウイルス性食中毒が位置づけられるとともに、コレラ菌等の 4 菌種についても飲食に起因する健康被害発生時は、他の食中毒病因物質と同じ措置がとられるようになった。

本報告では、2016 年度に発生した本県食中毒事例で検出された病因物質について報告する。

調査方法

長崎県生活衛生課が取りまとめた 2016 年の食中毒発生状況一覧表 (長崎市及び佐世保市の発生届出分含む) をもとに、主要病因物質 (細菌、ウイルス、寄生虫、自然毒及び化学物質等) ごとに事件数及び患者数を集計した。

各々の食中毒事例について、患者からの聞き取り情報、喫食状況及び細菌検査情報を県内の所轄保健所から収集した。

結果及び考察

長崎県内では 17 事例の食中毒の発生があった。発生事例の内訳を病因物質区分ごとに示した (表 1)。

(1) 細菌性食中毒

細菌性食中毒は、カンピロバクター属によるものが 4 事例、黄色ブドウ球菌によるものが 1 事例およびサルモネラ

属菌によるものが 1 事例発生した。

カンピロバクター属菌による食中毒は長崎市および佐世保市保健所管内でそれぞれ 1 事例発生し、主な検査は各市で実施された。県立保健所管内で発生した 2 事例については、本センターで検査を実施した。1 事例 (有症者 2 名) において、有症者 2 名の分離株、無症状喫食者 2 名および従事者 3 名の糞便検体が搬入され、有症者を含む喫食者 3 名の検体からカンピロバクター・ジェジュニが検出された。もう 1 事例 (有症者 9 名) では、有症者を含む 11 名の糞便検体が搬入され、有症者 9 名のうち 2 名の検体からカンピロバクター・ジェジュニが検出され、従事者 2 名のうち 1 名の検体からカンピロバクター・コリが検出された。両事例では、原因食材の同定には至らなかったが、飲食店での食事が原因と断定された。

黄色ブドウ球菌による事例において、検査は県立保健所で実施され、有症者および原因と疑われた弁当から当該菌が検出された。

サルモネラ属菌が検出された事例 (有症者 18 名) については、県立保健所の検査において有症者 5 名の検体からサルモネラ属菌が分離された。5 株について、当センターで血清学的検査を実施したところ、すべて *Salmonella* Thompson (血清型 O7:k:1,5) であった。

(2) ウイルス性食中毒

ノロウイルスによる食中毒は、6 事例、総計 124 名の患者が発生した。2 事例は県立保健所管内で発生し、各事例で有症者および従事者の糞便検体が搬入され、いずれからもノロウイルス GII.2 が検出された。1 事例は、佐世保市保健所管内で発生した。残る 3 事例は長崎市保健所管内で発生し、うち 1 事例において、当センターでノロウイルス

ス遺伝子陽性 10 検体のシーケンス解析を実施した。そのうち 9 検体は GII.4、残る 1 検体は GII.6 であった。

(3) 寄生虫性食中毒

今年度はグドア・セプトエンテリタによる食中毒が 2 事例、20 名の患者が発生した。県立保健所管内で発生した 1 事例(有症者 7 名)においては、有症者を含む喫食者 3 名から採取した 4 検体のうち 2 検体がグドア遺伝子陽性であった。ヒラメ検食 2 検体はいずれもグドア陰性であった。もう 1 事例は、長崎市保健所管内で発生し、長崎市で実施されたヒラメ検食の検査では、2 検体中 1 検体がグドア陽性であった。有症者便の検査は当センターで実施し、9 検体中 7 検体がグドア遺伝子陽性であった。

(4) 自然毒食中毒

自然毒による食中毒は、フグを原因食品とするテトロドトキシン中毒が 3 事例発生した。1 事例は、飲食店で提供されたフグ(種類不明)の喫食が原因で、調査等は佐世保市保健所で実施された。2 事例は家庭調理のフグを喫食したことが原因で、検査は、当センター生活化学科において実施された。12 月の事例では、フグ残品(肝臓)および患者血液、尿から、2 月の事例では、フグ残品(筋肉、卵巣)および患者血液から、テトロドトキシンが検出された。

謝 辞

本調査を遂行するにあたり、種々の情報を提供していただいた長崎県生活衛生課、長崎市保健環境試験所、長崎市、佐世保市及び長崎県立各保健所および当センター生活化学科の関係各位に深謝する。

表1 長崎県内の食中毒発生状況および病因物質 (Apr.2016~Mar.2017)

事例 No.	発生年月日	発生場所	摂食者数	患者数	原因施設	原因食品	検出病因物質	検出 / 検体数	検体(由来)	備考
1	2016/6/5	長崎市	17	9	飲食店	鶏レバーの湯引き(推定)	カンピロバクター・ジェジュニ	1/1	(有症者糞便)	検査は長崎市保健環境試験所 県立保健所管内の患者1名のみ 当センターで実施
2	2016/8/19	平戸市	17	7	飲食店	ヒラメの薄造り(推定)	クドア・セブテン ブクタータ	1/3 1/1 0/2	(有症者糞便) (無症者糞便) (ヒラメ)	
3	2016/8/23	川棚町	79	19	飲食店	弁当	黄色ブドウ球菌			検査は県央保健所で実施
4	2016/10/16	雲仙市	30	18	飲食店	弁当	サルモネラ・トンプソン			県央保健所で分離同定後、 当センターで血清学的検査を実施
5	2016/10/19	佐世保市	11	2	飲食店	鶏レバーの湯引き(推定)	カンピロバクター・ジェジュニ			検査は佐世保市保健所
6	2016/10/19	佐世保市	7	1	飲食店	フグ(種類不明)	テトロドトキシン			
7	2016/10/23	長崎市	39	13	飲食店	ヒラメ刺身	クドア・セブテン ブクタータ	7/9 1/2	(有症者糞便) (ヒラメ)	ヒラメの検査は長崎市で実施 有症者糞便は当センターで検査
8	2016/10/23	長崎市	51	23	飲食店	不明	ノロウイルス GII.4 GII.6	9/10 1/10		検査は長崎市保健環境試験所 シークエンス解析を当センターで実施
9	2016/11/16	諫早市	11	2	飲食店	不明	カンピロバクター・ジェジュニ	2/2 1/2 0/3	(有症者糞便 培養培地) (無症者糞便) (従事者糞便)	培養培地は、民間検査所より搬入
10	2016/11/23	佐々町	47	14	飲食店	不明	カンピロバクター・ジェジュニ、コリ	2/9 1/2	(有症者糞便) (従事者糞便)	カンピロバクター・コリは従事者より検出
11	2016/12/11	波佐見町	3	1	家庭	コモンフグ	テトロドトキシン			検査は当センター生活化学科
12	2016/12/18	長崎市	21	19	飲食店	不明	ノロウイルス GII			長崎市保健環境試験所
13	2016/12/23	長崎市	57	22	飲食店	不明	ノロウイルス GII			長崎市保健環境試験所
14	2017/1/16	佐世保市	12	10	飲食店	不明	ノロウイルス GII			検査は佐世保市保健所
15	2017/1/22	時津町	53	23	学生寮食堂(飲食店)	不明	ノロウイルス GII.2	14/16 2/7	(有症者糞便) (従事者糞便)	
16	2017/2/4	西海市	42	27	飲食店	不明	ノロウイルス GII.2	7/8 9/11	(有症者糞便) (従事者糞便)	
17	2017/2/27	五島市	1	1	家庭	フグ(種類不明)	テトロドトキシン			検査は当センター生活化学科

※ 本表は、県民生活部生活衛生課の食中毒発生状況一覧表(長崎市、佐世保市発生分含む)から作成した。

※※ 病因物質の検出数は、環境保健研究センター保健科対応事例のみとした。

公衆浴場等施設の衛生管理におけるレジオネラ症対策に関する研究 (長崎県の調査)

川野 みどり、田栗 利紹

Sanitary Control against Legionnaires' disease on Recreational Water Facilities in Nagasaki

Midori URAYAMA-KAWANO, Toshitsugu TAGURI

Key words: *Legionella* spp., EMA-qPCR, PALSAR

キーワード: レジオネラ属菌, EMA-qPCR 法, PALSAR 法

はじめに

レジオネラ属菌の検査は一般的に平板培養法が用いられているが、結果が判明するまでに 7~10 日を要するため、レジオネラ属菌の遺伝子を検出する迅速検査法の開発が進められている。

今回、厚生労働科学研究「公衆浴場等施設の衛生管理におけるレジオネラ症対策に関する研究」への協力の中でレジオネラ属菌の迅速検査法を検討するにあたり、長崎県内の調査事例をまとめたので報告する。

調査方法

1 調査対象

2016 年度に 5 つの入浴施設から 45 検体の試料を採取し、検査法の検討に用いた。検体の泉質は、酸性泉 22 検体、塩化物泉 11 検体、井水 4 検体、および水道水 8 検体であった。そのうち 28 検体は浴槽水、16 検体は湯口水、および 1 検体はシャワー水であった。浴槽水のうち 14 検体は循環濾過式、14 検体はいわゆる掛流し式を標榜する浴槽からの採水であった。

2 検査・解析方法

遊離残留塩素濃度は、現地での採水時に残留塩素測定器を用いて *N,N*-ジエチル-*p*-フェニレンジアミン (DPD) 吸光度法で測定した。検体は採水後 24 時間以内に検査に供した。500 mL 検水を、直径 47 mm、孔径 0.4 μ m のポリカーボネートタイプメンブレンフィルター (ミリポア) で吸引ろ過した後、フィルターを滅菌蒸留水 5 mL で洗い出し、1 分間攪拌した懸濁液を検水原液 (100 倍濃縮液) とした。

平板培養法の前処理は、熱処理 (50°C、20 分間) をした後、酸処理 (0.2M HCL・KCL buffer, pH2.2 を等量添加、室温 5 分間) を実施した。平板培養法は研究班の精度管理ワーキンググループ推奨法¹⁾ に準じて行った。培地はシステイン添加 GVP α 培地 (シスメックスバイオメリュー) および BCYE α 培地 (シスメックスバイオメリュー) を使用し、1 検体あたり 0.1 mL 検水原液を各培地 2 枚に塗抹後 37°C で 3~7 日間培養し、システイン要求性の湿潤集落をレジオネラ属菌として計数した。

浴槽水のバイオマスの指標として ATP を測定した。ルシパックワイド (キッコーマン) の専用綿棒を検水原液に浸して携帯用簡易測定器 PD-10 により測定したものを検水 10 mL あたりの RLU (Relative lights unit) 値とした。

EMA qPCR 法は、DNA 抽出の前に、Viable *Legionella* Selection Kit for PCR Ver.2.0 (タカラバイオ) を用いて EMA 処理を実施した。続いて、Lysis Buffer for *Legionella* (タカラバイオ) と Cycleave PCR *Legionella* (16S rRNA) Detection Kit (タカラバイオ) を用い、添付の取扱説明書に従い実施した。リアルタイム PCR の結果は、添付の取扱説明書に記載された方法で、コピー数から CFU (colony forming units) に換算した。

PALSAR 法は、100 倍濃縮検体 4 mL を遠心後、上清を除去し、添付の取扱説明書に従い実施した。当日測定しない場合は、RNA 抽出後の検体を -20°C で保存した。

結果

1 検体の塩素濃度

各検体の塩素濃度は、酸性泉が 0.09 ± 0.08 mg/L、塩化物泉が 0.40 ± 0.69 mg/L、井水が 1.45 ± 0.71 mg/L、水道水が 1.08 ± 0.99 mg/L であった。

2 平板培養法による結果

45 検体について検査した結果、4 検体からレジオネラ属菌が検出され、菌数は $10 \sim 40$ CFU/100 mL であった。検出されたレジオネラ属菌は全て *Legionella pneumophila* であり、血清型別に見ると、血清群 (SG) 6 が 1 検体、SG1 と SG6 の混合汚染が 1 検体、SG4 と SG8 の混合汚染が 1 検体であり、型別不能が 1 検体であった (表 1)。これらの検体は全て浴槽水であり、泉質ごとに見ると、酸性泉 1 検体、塩化物泉 2 検体、および井水 1 検体であった (表 1)。

3 ATP 量と泉質の関係

表 2 に濃縮検体の ATP 量と泉質の関係を示した。平板培養法でレジオネラ属菌が検出された検体のうち、酸性泉と塩化物泉の 3 検体は 10 mL あたり 1000 RLU を超えていたが井水は 10 RLU 未満に過ぎなかった。

4 EMA-qPCR 法と平板培養法との比較

平板培養法による 10 CFU/100 mL 以上の検体を検出するカットオフ値として 1 CFU/100 mL 相当を用いて解析を行った²⁾。EMA-qPCR 法を使用した 45 検体について、平板培養法の結果と比較した (表 3)。平板培養法では 4 検体が陽性であったのに対し EMA-qPCR 法では 28 検体からレジオネラ属菌遺伝子が検出された。EMA-qPCR 法の平板培養法に対する感度は 75% (3/4 検体)、特異度は 39% (16/41 検体) であった。平板培養法で陽性を示した 4 検体は、EMA-qPCR 法では 1~9 CFU/100 mL 相当が 2 検体、10~99 CFU/100 mL 相当が 1 検体であり、1 検体は検出限界以下であった (表 4)。EMA-qPCR 法と平板培養法との菌数 (定量値) の相関は見られなかった ($R^2 = 0.0142$)。

平板培養法で陽性となり、EMA-qPCR 法で陰性となった検体は 1 検体あり、泉質は井水であった (表 3、4)。

EMA-qPCR 法の結果が平板培養法に対して偽陽性となった検体は 25 検体あった (表 3)。それらの泉質は酸性泉 20 検体、塩化物泉 4 検体、井水 1 検体であり、EMA-qPCR 法の 100 mL あたりの定量値は、1~9 CFU 相当が 6 検体、10~99 CFU 相当が 6 検体、100~999 CFU 相当は 12 検体で、1000 CFU 相当以上は

1 検体であった (表 4)。

5 PALSAR 法と平板培養法との比較

PALSAR 法を実施した 45 検体について、平板培養法の結果と比較した (表 5)。平板培養法陽性の 4 検体に対して PALSAR 法では 3 検体が陽性を示した。PALSAR 法の平板培養法に対する感度は 75% (3/4 検体)、特異度は 34% (14/41 検体) であった。

考 察

今回、平板培養法と 2 種類の迅速検査法を用いて比較検討したが、PALSAR 法の平板培養法に対する定性検査結果は EMA-qPCR 法とほぼ同等であったため、定量的解析の観点から、ここでは平板培養法と EMA-qPCR 法との比較および評価を中心に考察する。

EMA-qPCR 法と平板培養法の比較では菌数 (定量値) の相関は認められず、EMA-qPCR 法の偽陽性検体は、ほとんど酸性泉で認められた (20/25)。井上ら³⁾によれば、pH3.8 未満の酸性泉からはレジオネラ属菌はほとんど検出されないが、有機炭素量やバイオマス量 (全細菌数、ATP) が有意に高く酸性を好む細菌が増殖しやすい環境にあるとされる。今回、酸性泉における各種測定値の相関を調べたところ、全体的に EMA-qPCR は ATP との相関が認められ、湯口水に ATP と pH 間の相関が認められた (図 1)。今回調査した酸性泉利用施設は同じ自噴泉を利用しているが、泉源の位置は施設で異なりいくつかの場所に分かれている。当該泉には酸性泉に適応した *Acidiphilium* 属菌等温泉固有の細菌の存在が知られており^{4,5)}、ATP はこれら細菌由来の可能性が高い。これらのことから、今回の ATP と pH の関係は湯口水に特有のものと考えられたが、希釈等の影響も否定できない。加えて、EMA-qPCR の定量値と ATP 量との相関が温泉固有の細菌によるものか、非培養性のレジオネラ属菌によるものかは不明で、今後の調査が待たれる。なお、レジオネラ属菌が検出された酸性泉の pH は 3.3 であったが、ATP が 1000 RLU/10mL を超えており、バイオフィルムの関与が示唆された (表 2、図 1)。

平板培養法により、井水から検出された 1 検体の ATP 量は非常に低く、残留塩素は 1.3 mg/L 検出されており、平板培養法や分離菌株の型別試験で得られた結果も複数培地による結果であり、定量値としては 10 CFU/100 mL を下回っていた (データ未掲載)。EMAqPCR と PALSAR 法の値も共に検出限界以下で

あったことから本事例は非常にまれなケースであると
考えられた。

謝 辞

本研究は、厚生労働科学研究費補助金「公衆浴場
等施設の衛生管理におけるレジオネラ症対策に関する
研究」(H28-健危-一般-006)により実施された。

参 考 文 献

- 1) 森本 洋 他、レジオネラ属菌検査法の安定化に
向けた取り組み-:厚生労働科学研究費補助金(健
康安全・危機管理対策総合研究事業)「公衆浴場
等におけるレジオネラ属菌対策を含めた総合的衛
生管理手法に関する研究」、平成 24 年度総括・分
担研究報告書 93-130、2012.
- 2) 磯部順子 他、レジオネラ生菌迅速検査法の評価

-:厚生労働科学研究費補助金(健康安全・危機管
理対策総合研究事業)「レジオネラ検査の標準化
及び消毒等にかかる公衆浴場等における衛生管
理手法に関する研究」、平成 28 年度 総括・分担
研究報告書、51-61、2016.

- 3) 井上博雄 他、温泉における微生物汚染ポテンシ
ヤルの評価-:厚生労働科学研究費補助金地域健
康・危機管理研究事業 「掛流し温泉における適切
な衛生管理方法の開発等に関する研究」、平成 18
年度 総括・分担研究報告書、31-43、2006.
- 4) 谷本保栄ら、好熱性好酸性細菌の検索、単離及び
諸性質の検討、岡山大学農学部学術報告、85、
15-21、1996.
- 5) 長島秀行、温泉微生物と社会、温泉科学、60、
278-286、2010.

表1 供試検体の泉質と平板培養法のレジオネラ属菌検出状況

	レジオネラ属菌 陰性	レジオネラ属菌陽性 <i>Legionella pneumophila</i> Sero Group			
		SG6	SG1, 6	SG4, 8	Untypable
		酸性泉 <pH3.8	9	1	
>=pH3.8	12				
塩化物泉	9		1	1	
井水	3			1	
水道水	8				
Total	41		4		

表2 ATP量と泉質の関係

	レジオネラ属菌 陰性	ATP量(RLU ¹⁾ /10 mL)				Total	
		<1	≥1, <10	≥10, <100	≥100, <1000		≥1000
酸性泉 <pH3.8	9		5	2	1(1)²⁾	8	
>=pH3.8	12	1	4	6	3	14	
塩化物泉	9	1	2	3	1	4(2)	11
井水	3	3(1)	1			4	
水道水	8	7		1		8	

¹⁾Relative Lights Unit、²⁾太字は平板法の陽性検体を含む検体で、カッコ内は陽性検体数

表3 平板培養法とEMA-qPCR法との比較 (n =45)

	EMA-qPCR (CFU-equivalent/100mL)	平板培養法(CFU/100 mL)		
		≥1	≥10	<10
≥1	3	25	28	
<1	1	16	17	
	4	41		

感度：75%、特異度：39%

表4 EMA定量PCRによる遺伝子量と泉質の関係

		Gene quantity on EMA-qPCR (CFU-equivalent/100mL)					Total
		<1	≥1, <10	≥10, <100	≥100, <1000	≥1000	
酸性泉	<pH3.8		2	4(1)¹⁾	3	1	10
	≥pH3.8	1		2	9		12
塩化物泉		5	5(2)	1			11
井水		3(1)	1				4
水道水		8					8

¹⁾太字は平板法の陽性検体を含む検体で、カッコ内は陽性検体数

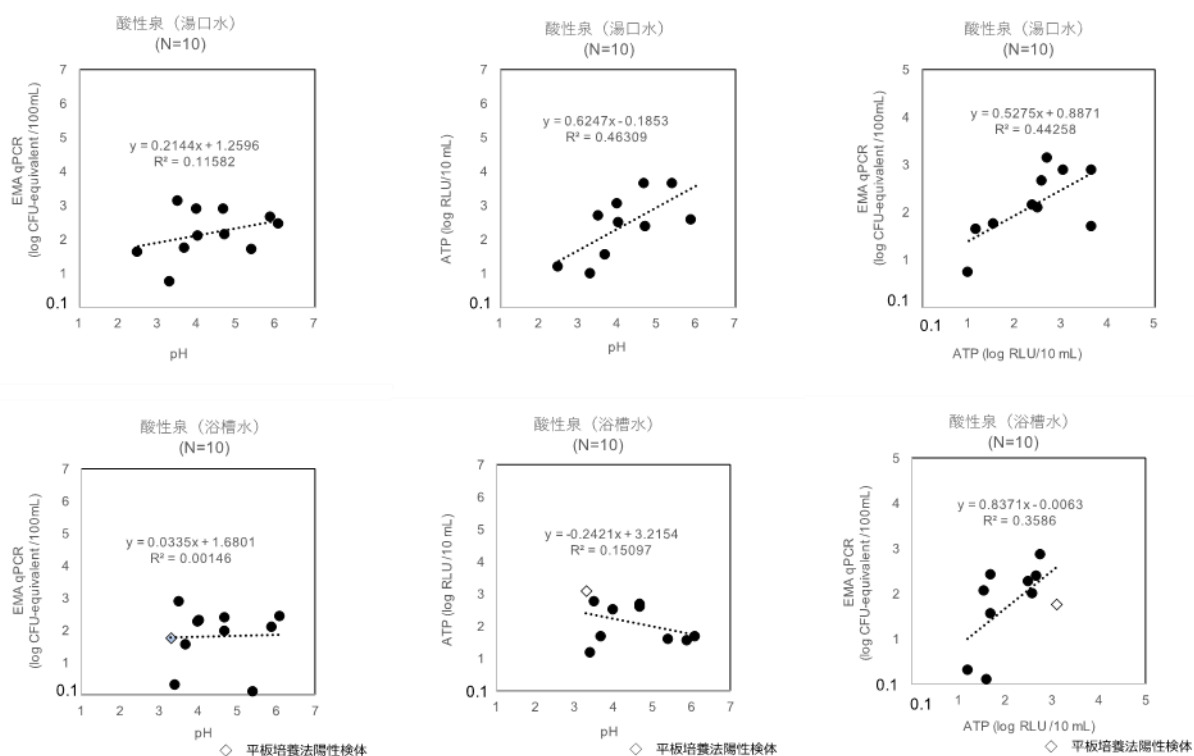


図1 酸性泉における各種測定値の相関

表5 平板培養法とパルサー法との比較 (n =45)

		平板培養法(CFU/100 mL)		
		≥10	<10	
PALSAR	陽性	3	27	30
	陰性	1	14	15
		4	41	

感度：75%，特異度：34%

長崎県における狂犬病の検査方法の検討

山下 綾香、吉川 亮、三浦 佳奈、松本 文昭、田栗 利紹

Laboratory Diagnosis of Rabies virus in Nagasaki Prefecture

Ayaka YAMASHITA, Akira YOSHIKAWA, Kana MIURA, Fumiaki MATSUMOTO and Toshitsugu TAGURI

Key words : Rabies, Rabies virus, Zoonosis, RT-PCR, Direct Immunofluorescence Assay

キーワード : 狂犬病、狂犬病ウイルス、人獣共通感染症、RT-PCR、直接蛍光抗体法(DFA法)

はじめに

狂犬病は、発症後の死亡率が極めて高い人獣共通感染症(動物由来感染症)である。ヒトへの感染源の99%がペットの犬といわれるが、ネコや野生動物(コウモリなど)からの感染も報告されており、感染動物に咬まれたり、引っ掻かれたりしてできた傷口からの侵入によって発症する¹⁾。

日本での狂犬病は1957年以降発生していないが²⁾、近年、中国、インド、インドネシア、フィリピン、ベトナム等で狂犬病の発生が拡大していること³⁾から、狂犬病の脅威はなくなることはなく、依然として公衆衛生において重要な感染症の一つである。以上のことから、国内で狂犬病の発生がない状況下であっても、狂犬病検査体制を整備することは必須であり、今回、狂犬病の検査(遺伝子検査と抗体検査)を検討したので、その概要を報告する。

調査方法

1. 遺伝子検査

①材料

国立感染症研究所から衛生微生物技術協議会リファレンスセンターを通じて配布された Positive control RNA を使用して RT-PCR を行った。また、Positive control RNA の10倍段階希釈により、 $10 \sim 10^7$ copies/mL を作製し、検出感度を調査した。

②方法

国立感染症研究所 HP 病原体検出マニュアル・狂犬病⁴⁾に準拠し、N 遺伝子上のプライマー

セット N7(mix)/JW6(mix)を用いて増幅反応を行った。遺伝子増幅反応(PCR)条件およびプライマーを図1に示した。その後アガロースゲル電気泳動を行って 606 bp の増幅産物を確認した。増幅産物は、シークエンスを行い、塩基配列決定後、BLAST 検索により狂犬病ウイルス遺伝子であることを確認した。また、当所で他の四類感染症のウイルス検査で常用している SuperScript III RT/Platinum Taq Mix (Invitrogen)を用いた方法でも増幅反応を行い、2種類の方法の比較をした。

2. 抗体検査

①材料

2016年リファレンスセンターを通じて配布された抗体及び陽性スライドを被検材料とした。また、2014年に配布された抗体も共に検査を行い、比較をすることで保管精度を検証した。配布された抗体は5 mLのDWに溶解し(原液とする)、遮光チューブに小分けして入れ、 -30°C で2年間保管した。凍結融解後は 4°C で保管した。配布された陽性スライドは、塗抹抗原にHEP株感染マウス脳を使用したものであった。

②方法

国立感染症研究所 HP 病原体検出マニュアル・狂犬病⁴⁾に準拠した。当センターの検査手順を図2に示した。

③判定

蛍光顕微鏡下でB励起波長(励起波長450~490 nm)を使用して、200~400倍で観察した。被検組織内にFITCの黄緑色蛍光粒子を確認し、

陽性とした。

調査結果および考察

1. 遺伝子検査結果

Positive control RNA で 606 bp の増幅産物が確認でき、動作確認が出来た。泳動結果を図 3 に示した。次に QIAGEN では 10^{-6} copies/mL まで 606 bp の増幅産物が確認でき、Invitrogen では 10^{-4} copies/mL まで 606 bp の増幅産物が確認できた。泳動結果を図 4 に示した。また、増幅産物は狂犬病ウイルス遺伝子であることが確認できた。QIAGEN の検出感度がよかったため、今回の結果をふまえ、QIAGEN での検査を実施することとした。また、検査に使用する Positive control RNA は 10^{-4} copies/mL に調製後小分けし -80°C で保存をすることが最適であると考えられた。今後は、イヌの脳幹部(視床、橋、延髄)、小脳、海馬)を使用し、前処理の手順を確認したい。

2. 抗体検査結果

直接蛍光抗体法を行った結果を図 5 に示した。マウス脳に感染させた HEP 株が FITC 染色により発色して陽性であることを確認できた。また、2014 年に調製した抗体と、今回調製した抗体では蛍光発色に大きな差はなかったことから、原液を調製してから 2 年間は抗体の使用が可能であることがわかった。今後は、犬の解剖をする際の手順を確認するとともに、抗体の長期保存についても検討を継続していく。

謝辞

研修でご指導いただいた国立感染症研究所獣医科学部第二室の井上智室長、堀田明豊先生、大分大学山田健太郎先生および宮崎大学の皆様に深謝する。

参考文献

- 1) World Health Organization, Rabies Fact Sheet, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs099/en/>, 2017
- 2) 国立感染症研究所 狂犬病 2006 年現在 IASR28(3)1-23,2007.<http://idsc.nih.gov.jp/iasr/28/325/inx325-j.html>
- 3) 井上 智, 島山 薫, 水越 文徳, 野口 章.: 国境を超える感染症 狂犬病 Dokkyo Journal of Medical Sciences 42 (3) 215-223.(2015)
- 4) 国立感染症研究所 狂犬病マニュアル(平成 24 年)

Rabies 遺伝子の増幅反応

< primer set > N7(mix) : [5'- ATG TAA CAC C(T/C)C TAC AAT GG - 3']

N7(mix) は ()で示した T と C の塩基がそれぞれ 10 pmol/μL となるように調製

JW6(mix) :

JW6(DPL) [5'- CAA TTC GCA CAC ATT TTG TG - 3']

JW6(E) [5'- CAG TTG GCA CAC ATC TTG TG - 3']

JW6(M) [5'- CAG TTA GCG CAC ATC TTA TG - 3']

JW6(DPL), JW6(E), JW6(M)がそれぞれ 10 pmol/μL となるように調製

< 組成 >

	volume	final conc.
5×QIAGEN OneStep RT-PCR Buffer	5.0 μL	(1×)
dNTP Mix (10 mM)	1.0 μL	(0.4 mM)
forward primer (N7 (mix) ; 10 μM)	1.5 μL	(0.6 μM)
reverse primer (JW6 (mix) ; 10 μM)	1.5 μL	(0.6 μM)
RNase free H ₂ O	10.0 μL	
QIAGEN OneStep RT-PCR Enzyme Mix (5 U / μL)	1.0 μL	(0.2 U / μL)
extract RNA	5.0 μL	
total	25.0 μL	

< 反応条件 >

temperature(°C)	time	cycles
50	30 min	1
95	15 min	1
94	60 sec	
56	60 sec	40
72	90 sec	
72	10 min	1
4	∞	1
4	∞	1

	volume	final conc.	temperature(°C)	time	cycles
2×Reaction Mix	12.5 μL	(1×)	50	30 min	1
forward primer (N7 (mix) ; 10 μM)	0.5 μL	(0.2 μM)	94	2 min	1
reverse primer (JW6 (mix) ; 10 μM)	0.5 μL	(0.2 μM)	94	60 sec	
RNase free H ₂ O	6.0 μL		56	60 sec	40
SuperScript III RT/Platinum Taq Mix (1 U / μL)	0.5 μL		68	90 sec	
extract RNA	5.0 μL		68	10 min	1
total	25.0 μL		4	∞	1

図 1 Rabies virus 遺伝子の検索(上:QIAGEN 下:Invitrogen)

< DFA (直接蛍光抗体)法 >

- 1) FITC Anti-Rabies Monoclonal Globulin, Fujirebio Diagnostics, Inc. 201 Great Valley Parkway Malvern, PA 19355 USA の凍結乾燥品を所定量(5 mL)の DW で溶解する(原液とする)。必要量を PBS (-)で 25 倍に希釈し、1%エバンスブルー溶液を 2 μL / mL (500 倍希釈)の割合に加える。
- 2) 塗沫標本を冷凍庫(-30°C)から必要分取り出し、安全キャビネット内で十分に風乾する。
- 3) 標識抗体(約 50 μL / well)を塗沫面に滴下して、室温・暗所で 30 分反応させる。
※抗体が塗沫面全域に行き渡らない場合はチップなどを利用して広げる。
- 4) 反応後、捨て缶にスライドガラス上の抗体液を廃棄して、塗沫面を洗浄ビン(PBS (-))で吹きかけて洗い流し、十分量の PBS (-)に 10 分間浸漬する。
- 5) 浸漬後、スライドを取り出して、塗沫面を洗浄ビン(PBS(-))で吹きかけて洗い流し、再度、十分量の PBS (-)に 10 分間浸漬する。
- 6) 浸漬後、スライドを取り出して、蒸留水に 2-3 秒浸して塩の除去を行って、風乾する。
※スライドガラスの塗沫面をこすり取らないように余分な水滴をキムワイブ等で除く。
- 7) カバーガラスと 10%グリセリン-PBS (pH8.4)で塗沫面を封入する。
- 8) 暗室にて蛍光顕微鏡でスライドを鏡検する。

図 2 DFA 法による狂犬病の検査手順

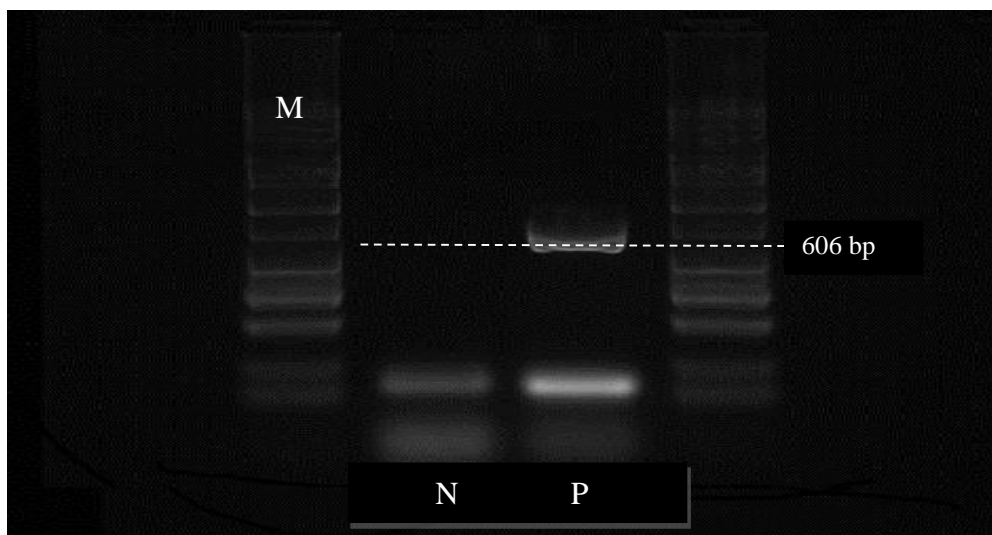


図3 陽性コントロールの遺伝子検査結果
P: Positive control (606 bp)、M: Size marker、N: Negative control

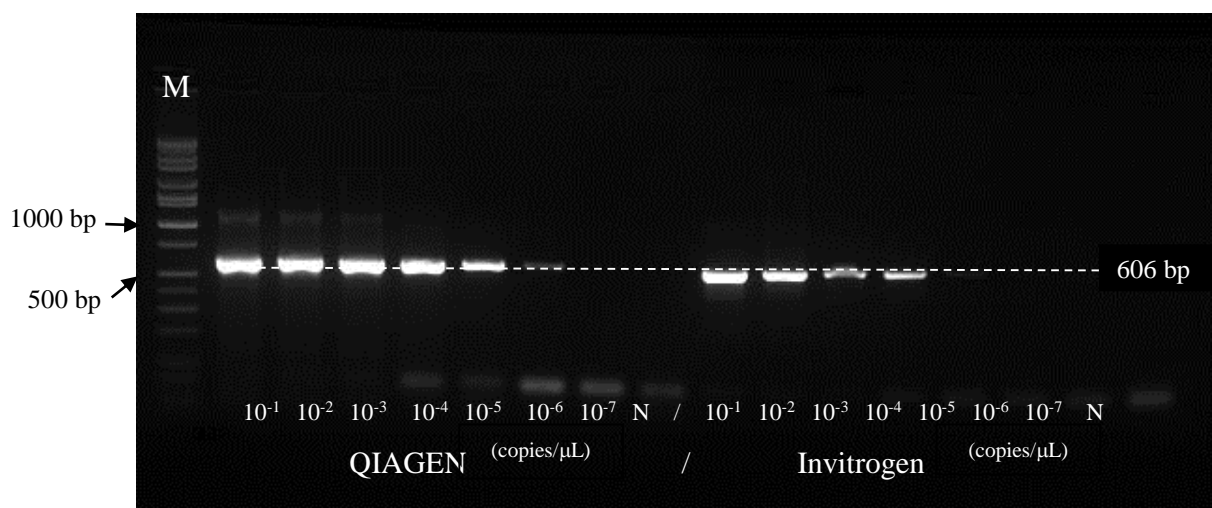


図4 異なるDNAポリメラーゼキットによる遺伝子検査結果の比較
Break line: Target DNA (606 bp)、M: Size marker、N: Negative control

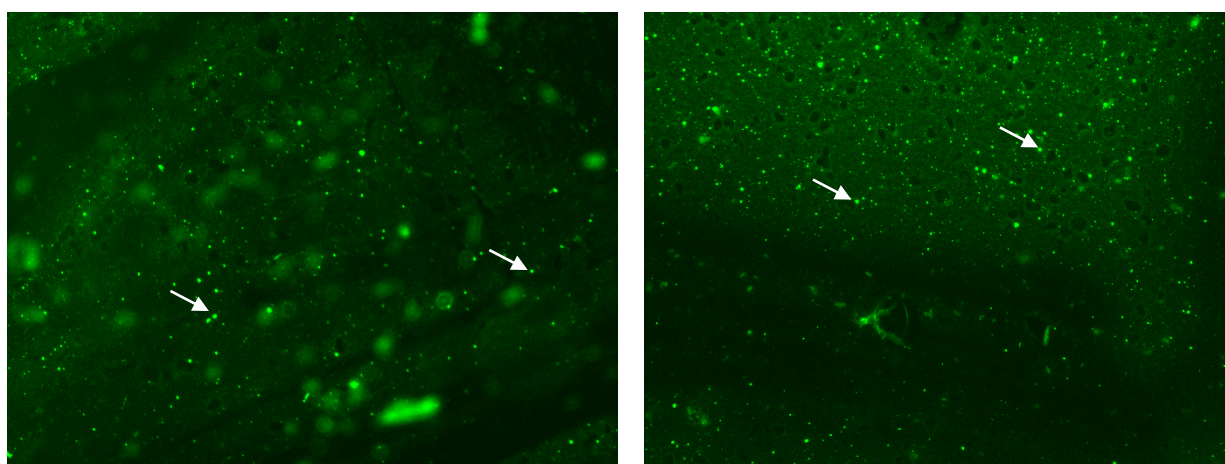


図5 マウス脳に感染させた Rabies virus HEP 株の直接蛍光抗体法による染色画像の比較
左は2014年調製抗体、右は今回調製抗体により処理した組織切片のFITC染色像、矢印: Rabies virus

長崎県における野生動物の保有する病原体調査(2004-2016)

吉川 亮、齋藤 佳子、島崎 裕子*、石原 雅行、山下 綾香

(*:長崎市保健環境試験所)

Research of Zoonosis in Wild Animals in Nagasaki Prefecture (2004-2016)

Akira YOSHIKAWA, Yoshiko SAITO, Yuko SHIMASAKI, Masayuki ISHIHARA
and Ayaka YAMASHITA

Key words : Zoonosis, Wild Animals, Wild Boars, Hepatitis E Virus (HEV), Japanese Encephalitis Virus (JEV), Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Virus (SFTSV), Enterohemorrhagic *Escherichia Coli* (EHEC), *Salmonella*, *Campylobacter*, *Paragonimus*
キーワード : ズーノーシス、野生動物、イノシシ、E型肝炎ウイルス(HEV)、日本脳炎ウイルス(JEV)、重症熱性血小板減少症候群ウイルス(SFTSV)、腸管出血性大腸菌(EHEC)、サルモネラ、カンピロバクター、肺吸虫

はじめに

野生動物はどのような病原体を保有、媒介し、ヒトに対してどのような影響を及ぼすのか、いまだ明らかになっていないことが多い。

近年、里山の崩壊など生態系の変化により、ヒトと野生動物の生活圏が非常に近い、もしくは重複している環境となっている。また、アライグマなど外来生物の定着など新たな問題も起きている。そのようななか、野生動物(主にイノシシやシカなど)を駆除するだけでなく、利活用する取り組みが全国的に行われ、地域振興の一端を担っている。

2003年8月、本県では、11名にも及ぶE型肝炎患者の集団発生が報告された。その原因と推定されたのがイノシシ肉の喫食とされたことから、筆者らは独立行政法人国立病院機構長崎医療センターと共同研究を結び、2004年から患者発生周辺の地域で捕獲されたイノシシのE型肝炎ウイルス(HEV)の調査を開始した。

2007年からは当センターの経常研究「野生動物の病原体保有状況に関する研究(2007~2009)」を開始した。当研究では、調査地域を県下全域に拡大し、調査病原体をHEVに加え、日本脳炎ウイルス(JEV)、腸管出血性大腸菌(EHEC)、サルモネラ、カンピロバクターおよび肺吸虫とした。これに伴い、効率的な調査研究の推進のため、長崎医療センターに加えて、長崎大学熱帯医学研究所、国立感染症研究所および長崎市保健環境試験所と共同研究を実施し、サンプリングに

ついては、県内の食肉(イノシシ)処理施設や市町、有害鳥獣の捕獲従事者などの協力を得て行った。

その結果、HEVをはじめEHEC、サルモネラ、カンピロバクターおよび肺吸虫の本県における浸淫状況の一端を把握することができ、野生動物(イノシシ)肉を喫食する際は、十分に留意する必要があることを再確認できた。また、JEVについては、イノシシとの関連性を示唆する知見も得られた。

このことから、2010年からは当センターの経常研究「ブタ、イノシシに由来する日本脳炎ウイルスの分子性状に関する研究(2010~2012)」、「長崎県における日本脳炎発症患者由来日本脳炎ウイルスの性状解析(2013~2015)」において、イノシシ等のJEV感染状況などの調査を実施した。また、これに併せてHEVや細菌(カンピロバクター)についても継続的に調査を行い、2013年からは重症熱性血小板減少症候群ウイルス(SFTSV)についても調査を実施した。

今回、2004~2016年にかけて実施してきた野生動物における病原体保有状況をはじめとした調査研究について、その概要をまとめたので報告する。

調査方法

1 材料

(1) 調査対象および被検動物数

本県で有害鳥獣として最も捕獲されるイノシシを主として、有害鳥獣として捕獲されたシカ、タヌキ、

テン、アナグマおよびアライグマとした。被検動物数は、イノシシ 792 頭、シカ 4 頭、タヌキ 6 頭、テン 7

頭、アナグマ 6 頭およびアライグマ 1 頭の計 816 頭であった。各年の被検動物数の詳細は表 1 に示す。

表 1 調査動物の内訳および被検(捕獲)動物数(2004～2016年)

動物種	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	Total
イノシシ	24	43	64	170	149	123	38	29	16	33	37	16	50	792
タヌキ										1	3	1	1	6
テン										2	5			7
アナグマ											2		4	6
アライグマ											1			1
シカ				3									1	4
Total	24	43	64	173	149	123	38	29	16	36	48	17	56	816

(2) 調査病原体および被検動物数

調査病原体は、食品媒介性感染症が考えられる HEV、EHEC、サルモネラ、カンピロバクターおよび肺吸虫に加え、イノシシをウイルス増幅動物とする可能性がある JEV および SFTSV とした。

被検動物数は、HEV 722 頭、JEV 533 頭、SFTSV 157 頭、EHEC およびサルモネラ 168 頭、カンピロバクター 263 頭および肺吸虫 196 頭の延べ 2,207 頭であった。

各年の被検動物数の詳細は表 2 に示す。

表 2 調査病原体の内訳および推移 (2004～2016年)

病原体	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	Total
HEV	24	43	53	121	119	122	38	29	16	36	48	17	56	722
JEV			11	88	83	111	38	29	16	36	48	17	56	533
SFTSV										36	48	17	56	157
EHEC				24	47	97								168
Salmonella				24	47	97								168
Campylobacter				24	47	97	25	26	15	29				263
肺吸虫				39	46	111								196
Total	24	43	64	320	389	635	101	84	47	137	144	51	168	2,207

(3) 調査地域および病原体ごとの被検動物数

調査地域は、イノシシの食肉処理施設が設置してある長崎市、松浦市、江迎町(現、佐世保市)、新上五島町および対馬市に加え、当センターがある大村市とした。

病原体ごとの被検動物数を表 3 に示す。

(4) サンプリング

調査研究に使用したサンプル(血液、肝臓、糞便、筋肉等)の採取、保管および輸送(冷蔵もしくは冷凍)は、イノシシ処理施設の従事者もしくは自治体職員により行われた。実施にあたっては、関係者と事前にリスクを含めた協議を行い、サンプルとして最

適な条件になるよう採取、保管および輸送の徹底を図った。

また、当センター周辺で捕獲されたイノシシについては、有害鳥獣の捕獲従事者の協力のもと、当センター職員でサンプル採取を行った。

採取されたサンプルは、冷蔵もしくは冷凍状態で保管、輸送された後、当センターで血清分離および乳剤作製(肝臓および筋肉 30~40%、糞便 10%)を行った。調査に供したサンプルの残りは、小分けして凍結(-80°C)保存した。

表 3 調査地域ごとの各病原体の調査頭数 (2004~2016 年)

	HEV		JEV		肺吸虫	EHEC, Salmonella	Campylo bacter	SFTSV	
	イノシシ	イノシシ以外	イノシシ	イノシシ以外	イノシシ	イノシシ	イノシシ	イノシシ	イノシシ以外
長崎市	163		163		95	82	82		
大村市	45	21	45	21			15	41	21
松浦市	50		50		33	33	48	3	
江迎町・県北	242		53		13	2	2		
新上五島町	169	3	169	3	39	40	104	73	
対馬市	32		32		12	11	12	19	
Total	701	24	512	24	192	168	263	136	21

2 HEV

(1) 被検材料

イノシシ処理施設および有害鳥獣の捕獲従事者の協力により得られた血液、肝臓、糞便および筋肉とした。

(2) 調査方法

血清および乳剤(肝臓 30~40%、糞便 10%)より QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) を用いて RNA 抽出し、Takahashi らの報告²⁾に基づき HEV 遺伝子の検索を行った。HEV 遺伝子を検出した場合、Takahashi らの報告³⁾を参考に ORF1 領域による系統樹解析を行った。

3 JEV

(1) 被検材料

イノシシ処理施設および有害鳥獣の捕獲従事者の協力により得られた血液および肝臓とした。

(2) 調査方法

血清および乳剤(肝臓 30~40%)より QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) を用いて RNA 抽出し、既報⁴⁾に基づき、JEV 遺伝子の検索を行った。

また、併せて抗 JEV-IgM capture ELISA および抗 JEV-IgG indirect ELISA によりイノシシ血清中の抗 JEV-IgM 抗体および抗 JEV-IgG 抗体を測定した。抗 JEV-IgM capture ELISA の条件は既報⁴⁾に基づき、抗 JEV-IgG indirect ELISA の条件等は図 1 に示す。

4 SFTS

(1) 被検材料

イノシシ処理施設および有害鳥獣の捕獲従事者の協力により得られた血液、肝臓および糞便とした。

(2) 調査方法

血清および乳剤(肝臓 30~40%、糞便 10%)より QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) を用いて RNA 抽出し、国立感染症研究所ウイルス第一部の SFTS ウイルス検査マニュアルに準じて SFTSV 遺伝子の検索を行った。

また、併せて長崎大学熱帯医学研究所の開発した抗 SFTSV-IgG indirect ELISA¹⁾ によりイノシシ血清中の抗 SFTSV-IgG 抗体を測定した。

5 EHEC、サルモネラおよびカンピロバクター

(1) 被検材料

イノシシ処理施設および有害鳥獣の捕獲従事者の協力により得られた糞便とした。

(2) 調査方法

EHEC は、ブイオンでの増菌培養に併せて VT 遺伝子の検索を行いつつ分離培養を行った。サルモネラおよびカンピロバクターは、ブイオンでの増菌培養後、分離培養を行った。

EHEC、サルモネラおよびカンピロバクター分離培養の条件等を表 9 に示す。

6 肺吸虫

(1) 被検材料

イノシシ処理施設および有害鳥獣の捕獲従事者の協力により得られた血清とした。

国立感染症研究所寄生動物部にて ELISA によりイノシシ血清中の肺吸虫に対する抗体を測定した。

(2) 調査方法

< anti JEV-IgG indirect ELISA >

- 1) Dilute JEV inactivated antigen to 1:30 in coating buffer
- 2) Add 100 μ L of diluted JEV inactivated antigen to each well
- 3) Incubate overnight at 4°C
- 4) Wash wells 3 times with PBS-T
- 5) Add 100 μ L of Blockace to each well
- 6) Incubate at 37°C for 2 hrs
- 7) Wash wells 3 times with PBS-T
- 8) Dilute positive control sera, negative control sera and samples to 1:100 in PBS-T-10% Blockace
- 9) Add 100 μ L of diluted sera to each well
- 10) Incubate at 37°C for 1 hr
- 11) Wash wells 3 times with PBS-T
- 12) Add 100 μ L of detecting antibody (Anti-IgG(H+L), Swine, Goat-Poly, HRP) to each well
- 13) Incubate at 37°C for 1 hr
- 14) Wash wells 3 times with PBS-T
- 15) Add 100 μ L of substrate (OPD) to each well
- 16) Incubate at RT for 20 min under dark condition
- 17) Add 100 μ L of stop solution (1N H₂SO₄) to each well
- 18) Read OD 450 nm and calculate

サンプルの抗 JEV-IgG 抗体価は陽性コントロールの希釈系列より得られる検量線より陰性コントロールの抗体価を 100 倍として算出する
算出されたサンプルの抗 JEV-IgG 抗体価が 300 倍以上となった場合を陽性とした

図 1 抗 JEV-IgG 抗体測定条件

調査結果及び考察

1 HEV

HEV の地域ごとのイノシシ調査頭数および HEV 遺伝子検出状況を表 4 に示す。

県下で捕獲されたイノシシ 701 頭中 46 頭(6.6%)から HEV 遺伝子を検出した。

HEV 遺伝子が検出されたイノシシ 46 頭中 20 頭(43.5%)が体重 30 kg 以下の幼若な個体であったことから、HEV 未感染個体が多い幼弱個体は、HEV を保有している可能性が高いことが示唆された。幸い体重 30 kg 以下の幼若な個体は、食用になることがないため、喫食による HEV 感染は少ないと考えられる。

しかしながら、2003 年以降、本県では HEV 患者が発生していることから、体重 30 kg を超える HEV 感染個体を加熱不十分、もしくは不適切な処理により HEV 汚染されたイノシシ肉を喫食したことが原因と考えられる。

当該調査を継続する一方で、イノシシ処理施設や自治体の関係者への結果のフィードバック、関係者を含めた一般の方々への情報提供を行ってきたことで、HEV に対する認知度が高くなり、最近では、本県の HEV 患者報告は、ほとんどみられなくなった。

さらに HEV 遺伝子を検出した個体について、系統樹解析を行った結果、捕獲地域ごとにクラスターが形成されたことから、何らかの形で地域ごとに HEV 遺伝子が維持されていることが示唆された。

また、2003 年 8 月の E 型肝炎患者の集団発生事例の患者から検出された HEV 遺伝子とその近傍で捕獲されたイノシシから検出された HEV 遺伝子が同一のクラスターに分布したことから、2003 年の集団感染の原因は、イノシシ肉の喫食による可能性が高いことが示唆された。

イノシシ以外の野生動物 24 頭からは HEV 遺伝子は

表 4 地域ごとのイノシシ調査頭数および HEV 遺伝子検出状況 (2004～2016)

HEV	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	Total
長崎市 調査数				45	44	74								163
PCR(+)					1	5								6
大村市 調査数							3	1		14	7	7	13	45
PCR(+)										1		1	3	5
松浦市 調査数					13	20	12	1	1	1	2			50
PCR(+)					3	7								10
江迎町 調査数	24	43	53	68	32	10	12							242
PCR(+)	1	5	4	11		1								22
新上五島町 調査数				8	23	13	11	26	15	18	28	9	18	169
PCR(+)					1			1						2
対馬市 調査数					7	5		1					19	32
PCR(+)					1									1
Total 調査数	24	43	53	121	119	122	38	29	16	33	37	16	50	701
PCR(+)	1	5	4	11	6	13	0	1	0	1	0	1	3	46

検出されなかった。

2 JEV

JEV の地域ごとの調査頭数を表 5、JEV 遺伝子検索結果および抗体 (IgM、IgG) 保有状況を表 6 に示す。

調査したイノシシ 387 頭中 18 頭 (4.7%) から抗 JEV-IgM 抗体が検出された。抗 JEV-IgM 抗体の検出率の低さは、捕獲された時期の多くが 12 月～3 月の冬場であり、媒介蚊の活動期から外れていることが要因として考えられる。

調査したイノシシ 420 頭中 253 頭 (60.2%) から抗 JEV-IgG 抗体が検出された。また、JEV の増幅動物として知られる豚の捕獲地域における飼養状況を考慮して、豚飼養地域である長崎市、大村市、松浦市及び江迎町の 273 頭と非豚飼育地域である上五島町及び対馬市の 147 頭についての抗 JEV-IgG 抗体保有状況を比較した (表 6)。豚飼養地域は 172 頭 (63.0%)、豚非飼養地域は 81 頭 (55.1%) であり、前者が後者の感染率が若干高い結果であったものの、両地域ともに 50% を超える感染率であった。よって、豚の飼養状況にかかわらず、JEV への一定の感染状況を示したことから、豚を介さない感染環が存在する可能性が示唆された。

以上のことは、イノシシが JEV の新たなウイルス増幅動物としての可能性を示唆するものであり、豚が飼養されていない地域 (離島を含め) においても JEV への感染

が危惧され、患者発生の予防対策が必要であると考えられる。

調査したイノシシ 413 頭から JEV 遺伝子は検出されなかった。これは、捕獲された時期の多くが 12 月～3 月の冬場であり、媒介蚊の活動期から外れていることと、JEV に対する抗体を 50% 以上の個体が保有していることが要因として考えられる。

今回の調査では、イノシシから JEV を得ることができず、イノシシ内に浸淫している JEV を明らかにできなかったため、今後も患者発生防止のため継続的な調査が必要である。

3 SFTSV

SFTSV の地域ごとの野生動物 (イノシシ、イノシシ以外) 調査頭数を表 7 に示す。

調査したイノシシ 136 頭、イノシシ以外の野生動物 21 頭の計 157 頭から SFTSV 遺伝子は検出されなかった。

今回の調査では SFTSV の県内捕獲野生動物への感染は確認されなかったが、早坂らの報告¹⁾によると、イノシシの SFTSV への感染は、190 頭中 36 頭 (18.9%) であった。また、長崎市では他の地域と比べ、53 頭中 27 頭 (50.9%) と高い感染率を示すことが知られている¹⁾。

表 5 JEV の地域ごとのイノシシ調査頭数(2006～2016)

JEV	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	Total
長崎市		63	27	73								163
大村市					3	1		14	7	7	13	45
松浦市			13	20	12	1	1	1	2			50
江迎町	11	17	13		12							53
新上五島町		8	23	13	11	26	15	18	28	9	18	169
対馬市			7	5		1					19	32
Total	11	88	83	111	38	29	16	33	37	16	50	512

表 6 JEV の地域ごとの JEV 遺伝子検索結果および抗体(IgM、IgG)保有状況(2006～2016)

JEV	IgM		IgG		PCR	
	調査頭数	陽性頭数 (%)	調査頭数	陽性頭数 (%)	調査頭数	陽性頭数
長崎市	100	9 (9.0)	163	106 (65.0)	88	0
大村市	37	0 (0.0)	9	3 (33.3)	45	0
松浦市	30	1 (3.3)	48	34 (70.8)	50	0
江迎町	41	8 (19.5)	53	29 (54.7)	29	0
豚飼養地域	208	18 (8.7)	273	172 (63.0)	212	0
新上五島町	152	0 (0.0)	115	66 (57.4)	169	0
対馬市	27	0 (0.0)	32	15 (46.9)	32	0
非豚飼養地域	179	0 (0.0)	147	81 (55.1)	201	0
Total	387	18 (4.7)	420	253 (60.2)	413	0

表 7 SFTSV の地域ごとの野生動物(イノシシ、イノシシ以外)調査頭数(2013～2016)

SFTS	2013		2014		2015		2016		Total	
	イノシシ	イノシシ以外	イノシシ	イノシシ以外	イノシシ	イノシシ以外	イノシシ	イノシシ以外	イノシシ	イノシシ以外
長崎市									0	0
大村市	14	3	7	11	7	1	13	6	41	21
松浦市	1		2						3	0
江迎町									0	0
新上五島町	18		28		9		18		73	0
対馬市							19		19	0
Total	33	3	37	11	16	1	50	6	136	21

4 EHEC、サルモネラおよびカンピロバクター

EHEC、サルモネラおよびカンピロバクターの地域ごとのイノシシ調査頭数を表 8 に示す。なお、EHEC およびサルモネラは 2007～2009 年の間で調査を行い、その後は、カンピロバクターのみ調査を行った。

EHEC およびサルモネラは、調査したイノシシ 168 頭から分離されなかった。

カンピロバクターは、調査したイノシシ 263 頭中 4 頭 (1.5%) から分離された。分離された 4 株は、

いずれも *Campylobacter coli* であった。また、この 4 株はいずれも松浦市で捕獲されたイノシシであった。

近年、イノシシ等の野生動物について調査が行われており、多くの知見が集積されているところだが、本県もイノシシ肉等野生動物の利活用(ジビエ料理等)が盛んに行われていることから、今後、改めて調査を行うことが必要と思われる。

表 8 EHEC、サルモネラおよびカンピロバクターの地域ごとのイノシシ調査頭数(2007～2013)

細菌	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	Total
長崎市	15	7	60					82
大村市				3			12	15
松浦市		13	20	12	1	1	1	48
江迎町	1	1						2
新上五島町	8	20	12	10	24	14	16	104
対馬市		6	5		1			12
Total	24	47	97	25	26	15	29	263

5 肺吸虫

肺吸虫の地域ごとのイノシシ調査頭数を表 9 に示す。調査したイノシシ 196 頭中 79 頭 (40.3%) から肺吸虫に特異的な抗体が検出された。

このことから県内のイノシシには、肺吸虫に感染している個体がいることが明らかになった。特に県北地域(松浦市、旧江迎町)では、高い感染率を示していることから、イノシシの生息環境中に肺吸虫が維持されていることが示唆された。

肺吸虫は、清流に生息していることが知られ、淡水産のカニに寄生していることから、これらを捕食した結果、イノシシが感染したと考えられる。このことから、イノシシの喫食のみならず、淡水産のカニの喫食についても十分な加熱調理が必要であることが示唆された。

まとめ

- 1 県下で捕獲されたイノシシ 701 頭中 46 頭 (6.6%) から HEV 遺伝子を検出した。
- 2 HEV 遺伝子が検出されたイノシシ 46 頭中 20 頭 (43.5%) が体重 30 kg 以下の幼若な個体であった。

3 イノシシの捕獲地域ごとに HEV 遺伝子が維持されていることが示唆された。

4 2003 年の HEV 集団感染は、イノシシ肉の喫食による可能性が高いことが示唆された。

5 豚を介さない JEV の感染環が存在する可能性が示唆された。

6 イノシシが JEV の新たなウイルス増幅動物となりうる可能性が示唆された。

7 イノシシ 136 頭、イノシシ以外の野生動物 21 頭の計 157 頭から SFTSV 遺伝子は検出されなかった。

8 野生動物における本県の SFTSV の浸淫状況の一端が明らかとなった。

9 EHEC およびサルモネラは、調査したイノシシ 168 頭から分離されなかった。

10 カンピロバクターは、調査したイノシシ 263 頭中 4 頭 (1.5%) から *Campylobacter coli* が分離された。

11 調査したイノシシ 196 頭中 79 頭 (40.3%) から肺吸虫に特異的な抗体が検出され、県内のイノシシが肺吸虫に感染していることが明らかとなった。

12 これらの成果は、これまで学会・研究会等での発表、厚生労働省科学研究費研究班への参加、新聞等への寄稿、県内研修会での講演などにより県内外への公表、周知を図ってきた(表 10)。

表 9 肺吸虫の地域ごとのイノシシ調査頭数(2007~2009)

肺吸虫	2007		2008		2009		Total	
	調査頭数	陽性頭数(%)	調査頭数	陽性頭数(%)	調査頭数	陽性頭数(%)	調査頭数	陽性頭数(%)
長崎市	16	1 (6.3)	7	0 (0.0)	72	30 (41.7)	95	31 (32.6)
大村市							0	0
松浦市			13	6 (46.2)	20	16 (80.0)	33	22 (66.7)
江迎町	15	11 (73.3)	1	1 (100)	1	1 (100)	17	13 (76.5)
新上五島町	8	0 (0.0)	18	5 (27.8)	13	5 (38.5)	39	10 (25.6)
対馬市			7	3 (42.9)	5	0 (0.0)	12	3 (25.0)
Total	39	12 (30.8)	46	15 (32.6)	111	52 (46.8)	196	79 (40.3)

謝 辞

本調査のサンプリングに協力いただいた長崎市、松浦市、旧江迎町、新上五島町、対馬市の職員の皆様、イノシシ処理施設の従業員の皆様に深謝します。

また、本調査に協力いただいた独立行政法人国立病院機構長崎医療センターの(故)矢野公士博士および玉田陽子博士、長崎大学熱帯医学研究所ウイルス学分野の森田公一教授および井上真吾准教授、国立感染症研究所寄生動物部の杉山広室長、ならびに各関係機関の職員の皆様に深謝します。

参 考 文 献

1) Hayasaka D, *et al*: Seroepidemiological evidence of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus

infections in wild boars in Nagasaki, Japan. *Tropical Medicine and Health*, 44, 6 (2016)

2) Takahashi K, *et al*: Full-Length Sequences of Six Hepatitis E Virus Isolates of Genotypes III and IV from Patients with Sporadic Acute or Fulminant Hepatitis in Japan. *Intervirology*, 46, 308-318 (2003)

3) Takahashi K, *et al*: Genetic Heterogeneity of Hepatitis E Virus Recovered from Japanese Patients with Acute Sporadic Hepatitis. *The Journal of Infectious Diseases*, 185, 1342-5 (2002)

4) 吉川 亮、三浦 佳奈、松本 文昭、田栗 利紹:長崎県環境保健研究センター所報 61、125-130 (2015)

表 9 サルモネラ、カンピロバクターおよび EHEC の培養条件等

	<i>Salmonella</i>	<i>Campylobacter</i>	EHEC
Day 1	①糞便(直腸便など) ↓ ②緩衝ペプトン水(OXOID) 10 mL に糞便 1 白金耳 ↓ ③35°C, 18 時間培養	①糞便(直腸便など) ↓ ②プレストン培地(OXOID) 10 mL に糞便 1 白金耳 ↓ ③42°C, 18 時間微好気培養	②糞便(直腸便など) ↓ ②m-EC ブイヨン(OXOID) 10 mL に糞便 1 白金耳 ↓ ③35°C, 18 時間培養
Day 2	①ラパポート・バシリアディス(RV) ブイヨン 10 mL に緩衝ペプトン 水培養液 0.5 mL 接種 ↓ ②42°C, 18 時間培養	①CCDA 培地(OXOID) にプレス トン培地培養液 1 白金耳を塗 抹 ↓ ②42°C, 48 時間微好気培養	①PCR(VT gene)スクリーニング ↓ ②CT-SMAC 培地(OXOID)、マ ッコンキー寒天培地(栄研)に m-EC ブイヨン培養液 1 白金耳 を塗抹 ↓ ③35°C, 18 時間培養
Day 3	①DHL 寒天培地(日水)、クロモ アガー・サルモネラ(関東化学) に RV ブイヨンの培養液 1 白金 耳を塗抹 ↓ ②35°C, 18 時間培養		①純培養(定型的集落を 5 個以 上釣菌し、TSA 培地に画線塗 抹) ↓ ②35°C, 18 時間培養
Day 4	①判定(DHL: 中心部は黒色で 半透明湿潤な集落、CS: 直径 1~2 mm の藤紫色) ↓ ②鑑別試験(TSI・LIM・VP 半流 動) ↓ ④35°C, 18~24 時間培養	①判定(直径 1~3 mm の乳白 色・水滴状の半透明の S 型集 落) ↓ ②PCR スクリーニング試験 ↓ ②純培養(血液寒天培地) ↓ ③42°C, 48 時間(37°C, 72 時 間)微好気培養	①VT 遺伝子検索 ↓ ②鑑別試験(CLIG・TSI・LIM・ SC) ↓ ③35°C, 18~24 時間培養
Day 5	①血清学的検査 (O 抗原群別および H 抗原)	↓	①血清学的検査(O 抗原) ②ベロ毒素産生試験(RPLA)
以降		①鑑別試験 ②追加試験 ③血清学的検査	

表 10 調査研究成果の公表等

<p>【学会】</p> <p>1. 長崎県におけるイノシシの日本脳炎ウイルス感染状況 ○吉川亮、井上真吾、吾郷昌信、森田公一 第 57 回 日本ウイルス学会学術集会 2009.10.25～27 東京都 都市センターホテル</p>
<p>【研究会等】</p> <p>1. 長崎県におけるイノシシの日本脳炎抗体保有率調査(1) ○吉川亮、井上真吾、吾郷昌信、森田公一 第 43 回 日本脳炎ウイルス生態学研究会 2008.5.30 香川県観音寺</p> <p>2. 長崎県におけるイノシシの病原体保有状況調査 ○吉川亮、島崎裕子、飯田國洋、吾郷昌信 第 34 回 九州衛生環境技術協議会 ウイルス分科会 2008.10.9 セントヒル長崎</p> <p>3. 長崎県におけるイノシシの日本脳炎抗体保有率調査(第 2 報) ○吉川亮、井上真吾、吾郷昌信、森田公一 第 44 回 日本脳炎ウイルス生態学研究会 2009.6.20 北海道 支笏湖</p> <p>4. 長崎県におけるイノシシの日本脳炎ウイルスに対する抗体保有状況 ○吉川亮、井上真吾、山口顕徳、平野学、吾郷昌信、森田公一 第 35 回 九州衛生環境技術協議会 ウイルス分科会 2009.10.8 大分県 大分市コンパルホール</p> <p>5. 長崎県下のブタ、イノシシにおける日本脳炎ウイルスの侵淫状況 ○吉川亮、井上真吾、岡本健太、鍋島武、比嘉由紀子、前川芳秀、森田 公一、吾郷 昌信 第 46 回 日本脳炎ウイルス生態学研究会 2011.5.20-21 金沢白鳥路ホテル</p>
<p>【厚生労働省科学研究費研究班】</p> <p>1. 長崎県北の猪、豚における HEV 解析 ○吉川亮、玉田陽、吾郷昌信、矢野公士 厚生労働省科学研究費「E 型肝炎の感染経路・宿主域・遺伝的多様性・感染防止・診断・治療に関する研究」 平成 20 年度 第 1 回班会議 2008.7.25 (独法)長崎医療センター 平成 20 年度 合同班会議 2009.1.29 KKR ホテル東京</p> <p>2. 長崎県下における日本脳炎ウイルスの動向調査 ○吉川亮、井上真吾、鍋島武、吾郷昌信、森田公一 日本脳炎ウイルスの疫学に関する研究 ○吉川亮、井上真吾、鍋島武、吾郷昌信、森田 公一 長崎県における日本脳炎ウイルスの活動調査 ○吉川亮、鍋島武、井上真吾、吾郷昌信、森田公一 日本脳炎ウイルスの疫学に関する研究 ○吉川亮、鍋島武、井上真吾、吾郷昌信、森田公一 厚生労働省科学研究費「我が国における日本脳炎の現状と今後の予防戦略に関する研究」 平成 20 年度 第 2 回班会議 2009.3.13 国立感染症研究所 平成 21 年度 第 1 回班会議 2009.8.4 第 2 回班会議 2010.2.8 国立感染症研究所 平成 22 年度 第 1 回班会議 2010.2.8 第 2 回班会議 2011.2.18 国立感染症研究所</p>
<p>【新聞】</p> <p>1. 長崎新聞「研究所から」 2010.7.18 掲載「人獣共通感染症」</p> <p>2. 長崎新聞「研究所から」 2012.7.15 掲載「日本脳炎の脅威を忘れていませんか？」</p>
<p>【研修会等】</p> <p>1. 食肉由来の E 型肝炎の報告事例と現状について ○吉川亮 平成 18 年度 長崎県食品衛生監視員研修会 2007.2.2 出島交流会館</p> <p>2. 長崎県におけるイノシシの病原体保有状況 ○吉川亮 平成 21 年度 長崎県食品衛生監視員研修会 2010.2.2 長崎タクシー会館</p> <p>3. 日本脳炎は再び流行するのか？ —再興感染症としての日本脳炎に関する研究— ○吉川亮、山口顕徳、平野学、吾郷昌信 平成 21 年度 環境保健研究センター研究発表会 2010.2.5 出島交流会館</p> <p>4. 食肉処理施設を活用した日本脳炎ウイルスをはじめとする感染症サーベイランス ○吉川亮、石原雅行、吾郷昌信 平成 24 年度 食肉衛生技術研修会および衛生発表会 2013.2.2 諫早商工会議所</p> <p>5. 感染症に関わる野生動物 —特にイノシシと日本脳炎ウイルスおよび E 型肝炎ウイルスに関する解析を中心にして— ○吉川亮、石原雅行、吾郷昌信 平成 24 年度 環境保健研究センター研究発表会 2013.3.13 環境保健研究センター</p> <p>6. ウイルス感染症との闘い ○吉川亮 出前講座(壱岐出前講座) 2014.9.5、壱岐市小学校</p> <p>7. ウイルス感染症との闘い ○吉川亮 出前講座(佐賀県伊西地区高等学校保健会) 2015.10.15 環境保健研究センター</p> <p>8. 日本脳炎ウイルスの生態について ～対馬の患者 4 名発生を考える～ ○吉川亮 平成 28 年度 県職員臨床検査技師研修会 2017.1.20 日本生命ビル</p>

農村部住民における心理的なストレスとバイオマーカーに関する研究

蔡 国喜、田栗 利紹

A Survey on Psychological Stress and Biomarker Level among Rural Residents

Guoxi CAI and Toshitsugu TAGURI

Key words: Psychological stress, Biomarkers, EB virus, Rural area

キーワード: 心理的ストレス、バイオマーカー、EB ウイルス、農村地区

はじめに

長崎県では日本全国と同様な傾向で、農村部で過疎化、高齢化の進行に伴って、高齢者の家族やコミュニティとの繋がり希薄化がもたらす心理的なストレス・孤独感の問題が深刻化している。同じ東アジアにある中国でも似ている社会現象が起きている。経済発展と同時に食生活が欧米化し、身体活動量が低下することによる肥満・生活習慣病の増加や、社会格差の拡大、拝金主義・実用主義・無縁化社会の蔓延が一般住民の心理的ストレスに関連する^{1,2)}。先行研究によると、心理的ストレスは人間の免疫力にマイナス影響をもたらす、日和見感染の発生に繋がる^{3,4)}。

この研究は、日本と同じ東南アジアにある中国農村部住民を対象にして現地疫学調査により、村民達の人口・社会経済的な指標、出稼ぎ経験や EB ウイルス (Epstein-Barr virus) 抗体価との関連を探索し、心理的ストレスバイオマーカーとして EB ウイルス抗体価の有効性を検証することにより、日本の農村部での高齢化がもたらす健康問題を緩和するためのかがりを探索する。

調査方法

2015年5月2日より、本格調査の実行性を検証するため福建省 S 県において予備調査を行った。予備調査では現地の生活の様子に関する聞き取りを行なったほか、健康調査を行うにあたって必要となる設備や医療スタッフの準備・状況確認や、質問票を使ってアンケート調査を実施した。

2015年7月末より開始した本格調査では、福建医科大学、現地疾病管理センター及び郷衛生院の協力の下、S 県にある二つ郷に属する 7 つの村に暮らす 797 名村民が研究調査に参加した。研究対象に対するアンケート内容には、基本社会経済属性(性別・年齢・教育、収入、婚姻状況)以外に、家族構成、出稼

ぎの経験、家族との離別の経験、ソーシャルキャピタル、食生活、飲酒、喫煙、ストレス尺度 (EBV 抗体価) 等に関する質問が含まれている。

質問票調査以外に、村医の協力により採血、身体計測(身長・体重・腹囲・臀囲)を実施した。本文は対象者の心理的ストレスやバイオマーカー等に関する結果に絞って報告する。

結果

S 県の地方衛生局、郷衛生院などの協力の下で本格調査を実施した。調査参加者 797名の内、ミッシングデータを除外し 734 名対象者のデータを統計分析に用いた。これを出稼ぎ労働者家族(38.1%, n = 280)と非出稼ぎ労働者家族(61.9%, n = 454)を分けて比較すると、前者の平均年齢(62.4 VS. 56.7, P < 0.001)、男性の割合(43.6% VS. 35.7%, P= 0.033)や非識字率(32.1% VS. 33.9, P=0.031)は、後者と比べると有意に高いことが明らかになった。加えて、心理的ストレスの指標である EBV 抗体価(136.7 VS. 118.2, P=0.020)にも有意差が認められた。しかしながら、両者の間には、ライフスタイルと社会経済的な資本 (social capital) の差が見られなかった。出稼ぎ労働者の残留家族 280 人を焦点に絞って解析すると、出稼ぎ者は家族の中で子供か孫にあたるケースが殆どであり、出稼ぎ先の 6 割は同じ省以内であり、4 割は国内の他の省であった。

考察

本研究の特徴は、中国農村部の出稼ぎ労働者家族の EBV 抗体価が非出稼ぎ労働者家族に比べて有意に高いことが明らかとなり、本バイオマーカーが心理的ストレスの指標となりうることが実証されたことにある。本研究の結果に基づいて、違う地域や言語背景で比較可能なバイオマーカーを用いることにより、日本にお

いても過疎化・高齢化が進む農村部住民の心理的なストレス状態を科学的に比較することが可能になる。今後はEBVをバイオマーカーとして応用することにより、

心理的なストレスの保護因子の探索などにつなげると共に、住民における日和見感染症予防などの実用化研究への展開を検討したい。

Table 1. Basic characteristics of the participants in S county, Fujian province, China (N = 734)

	People left behind (n = 280)	People not left behind (n = 454)	p-value
Age (in years), mean [SD]	62.4 [10.9]	56.7 [13.5]	< 0.001
Sex (male), n(%)	122 (43.6)	162 (35.7)	0.033
Marital status, n(%)			
Not married	4 (1.4)	24 (5.3)	0.028
Have a partner	230 (82.1)	363 (80.0)	
Divorced or widowed	46 (16.4)	67 (14.8)	
Education, n(%)			
Illiterate	118 (42.1)	154 (33.9)	0.031
Less than elementary school	109 (38.9)	182 (40.1)	
Junior high school or high	53 (18.9)	118 (26.0)	
Household income (high), n(%)	157 (56.1)	252 (55.5)	0.881
Household size, median [IQR]	5 [4 – 6]	4 [3 – 6]	< 0.001
Individual-level			
Cognitive social capital (high), n(%)	162 (57.9)	288 (63.4)	0.132
Structural social capital (high), n(%)	215 (76.8)	348 (76.7)	0.967
Community-level			
Cognitive social capital, mean [SD]	0.61 [0.05]	0.61 [0.05]	0.993
Structural social capital, mean [SD]	0.76 [0.09]	0.77 [0.08]	0.212
EBV antibody titer (ELISA unit), median [IQR]	136.7 [79.7 – 273.2]	118.2 [71.3 – 223.1]	0.020
CRP concentration (mg/L), median [IQR]	0.75 [0.38 – 1.48]	0.61 [0.31 – 1.55]	0.783

Table 2. Anthropological examination results of the participants in S county of Fujian province, China

	People left behind (n = 280)	People not left behind (n = 454)	p-value
Employment status			
No employment	70 (25.0)	109 (24.0)	0.761
Farming	197 (70.4)	296 (65.2)	0.148
Small business	6 (2.1)	25 (5.5)	0.028
Formally employed	4 (1.4)	6 (1.3)	0.903
Part-time job (Heavy physical activity)	17 (6.1)	24 (5.3)	0.653
Part-time job (Light physical activity)	13 (4.6)	52 (11.5)	0.002
Army	1 (0.4)	0 (0.0)	0.203
Others	2 (0.7)	4 (0.9)	0.761
Self-rated physical activity			
Low	100 (35.7)	130 (28.6)	0.091
Middle	72 (25.7)	143 (31.5)	
High	108 (38.6)	180 (39.6)	
Body Mass Index	23.1 ± 3.13	23.4 ± 3.34	0.191
Waist-hip ratio			
Among males (n = 284)	0.90 ± 0.06	0.90 ± 0.06	0.976
Among females (n = 450)	0.94 ± 0.08	0.91 ± 0.08	<0.001

Table 3. Lifestyle factors of the participants in S county of Fujian province, China

	People left behind (n = 280)	People not left behind (n = 454)	p-value
Diet (Sources of protein) (days per week)			
Pork	3.38 ± 2.47	3.34 ± 2.63	0.841
Beef	0.04 ± 0.22	0.07 ± 0.44	0.191
Lamb	0.01 ± 0.12	0.03 ± 0.19	0.347
Chicken/Duck/Goose	0.80 ± 1.36	0.81 ± 1.41	0.911
Eggs	1.83 ± 2.16	2.04 ± 2.30	0.219
Seafood	0.27 ± 0.75	0.38 ± 1.06	0.116
Freshwater fish	0.51 ± 1.05	0.61 ± 1.27	0.289
Smoking (Have stopped or currently smoke)	44 (15.7)	55 (12.1)	0.165
Alcohol (Once a week or more)	78 (27.9)	114 (25.1)	0.411
Mobile phone usage (RMB/month)			
Do not use	79 (28.2)	107 (23.6)	0.157
1 – 20	72 (25.7)	109 (24.0)	
21 – 40	84 (30.0)	136 (30.0)	
> 40	45 (16.1)	102 (22.5)	

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、協力をしていただいた福建医科大学公衆衛生学院の共同研究関係者や福建省 S 県衛生局、福建省疾病管理センターの医療従事者、各郷(村)衛生院の村医及び村民達のご協力に深謝する。

参 考 文 献

- 1) Inoue Y, Yazawa A, Li D, Du J, Jin Y, Chen Y, Watanabe C and Umezaki M. (2014). Epstein-Barr virus titer and its association with the domain scores from the World Health Organization's Quality of Life Questionnaire: Findings from rural Hainan province, China. *American Journal of Human Biology* 26, pp.51-55.
- 2) Yazawa A, Inoue Y, Li D, Du J, Jin Y, Chen Y, Nishitani M, Watanabe C and Umezaki M. (2014). Impact of Lifestyle Changes on Stress in a Modernizing Rural Population in Hainan Island, China. *American Journal of Human Biology* 26, pp.36-42.
- 3) Kennedy S (2016). Psychosocial Stress, Health, and the Hippocampus. *J Undergrad Neurosci Educ.* 2016 Apr 15;15(1):R12-R13.
- 4) Glaser R (2005). Stress-associated immune dysregulation and its importance for human health:

a personal history of psychoneuroimmunology. *Brain Behav Immun.* 2005 Jan;19(1):3-11.

エンテロウイルスの検出状況(2016年度)

松本 文昭、三浦 佳奈、山下 綾香、田栗 利紹

Surveillance Report of Enteroviruses in Nagasaki (2016)

Fumiaki MATSUMOTO, Kana MIURA, Ayaka YAMASHITA and Toshitsugu TAGURI

Key word : Hand-Foot-and-Mouse Disease, Enterovirus, Phylogenetic analysis

キーワード: 手足口病、エンテロウイルス、系統樹解析

はじめに

Enteroviruses (以下、EVs) は、ヒトに感染力を有するウイルスの中で最も発生頻度の高いウイルスの一つである。たいていの感染は、手足口病やヘルパンギーナに代表されるとおり非定型熱性疾患や上気道炎を呈し、不顕性感染か軽症にとどまることが多い。しかしながら、EVs は急性出血性結膜炎、無菌性髄膜炎、急性弛緩性麻痺、心筋炎や新生児敗血症様疾患などの重篤な臨床症状を引き起こすことも知られている¹⁾。

EVs はピコルナウイルス科に属するエンベロープを持たない 1 本鎖 RNA ウイルスであり、Poliovirus、Coxsackievirus、Echovirus およびその他の EVs で構成されるウイルス群を総称しているが、近年の分子遺伝子学的研究により 4 つの遺伝子型に大別される²⁾。

主に小児の間で流行する手足口病およびヘルパンギーナは「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律」(以下、感染症法)において 5 類感染症の定点把握疾患に指定され、患者の発生状況は例年調査されているが、全ての症例において EVs の実験室内診断をしているわけではなく、県内の EVs 株の流行状況は十分に把握されていない。また、同一型のウイルスに感染しても、軽症と重症に分れることが報告されている。例えば、Coxsackievirus B 群はヘルパンギーナの原因ウイルスの一つだが、ウイルス血症を経て中枢神経に移行すると髄膜炎を呈し、稀ではあるが命に関わるような心筋炎を惹き起こすこともある³⁾。

ここでは、今年度の県内の EVs 流行状況を明らかにするために実施した調査の概要を報告する。

調査方法

1) 流行状況の把握のための検体採取

2016 年 6 月から 2017 年 3 月まで、全県立保健所管内(県央、西彼、県南、県北、五島、上五島、壱岐、対馬)および長崎市、佐世保市の計 10 地点の協力医療機関において、エンテロウイルス感染症と診断された患者のうち、主治医から研究内容を説明のうえ、同意が得られた患者を対象とした。

当該患者から採取された咽頭拭い液または便(直腸拭い液)を 48 時間以内に搬入可能な場合は 4°C で、それ以上の時間がかかる場合には -20°C 以下に一時保管した。検体は医療機関から直接または郵送により搬入された。以上のとおり収集された咽頭拭い液 105 検体および直腸拭い液 2 検体の計 107 検体を検査・解析に供した。

2) 遺伝子検査方法

提供された臨床検体は、ウイルス保存輸送液(ハンクス液(日水))に最終濃度 0.5%となるようにゼラチンを添加したものに懸濁させたのち、12,000 rpm で 15 分間遠心分離したあとの上清を RNA 抽出用検体とした。QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)を用いて抽出した RNA に対して、エンテロウイルスを網羅的に検出可能な CODEHOP VP1 reverse transcription-seminested PCR¹⁾を実施した(図 1)。特異的増幅産物が得られた場合、AN89 および AN88 をシーケンス用プライマーとしてダイレクトシーケンスを行い、塩基配列を決定した。決定した配列情報に基づき Enterovirus Genotyping Tool Version 0.1⁴⁾により検出ウイルスを型別した。塩基配列は、GENETYX ver.12(ゼネティクス社)により解析した。また、Coxsackievirus

A6(以下、CVA6)については、2011年以降、手足口病の原因ウイルスとして全国的な流行が報告されているため⁵⁾、VP1領域の一部(485塩基対)を標的としたプライマーセット(Forward 487: ATGTWYGYICCCIGGIGNCC, Reverse 489: AYIGCICISWITGYTGNC)を用いたRT-PCR⁶⁾を行い、近隣結合法(NJ法)⁷⁾による分子系統解析を実施した。

3) ウイルス分離

遺伝子検査陽性となった場合は、24ウェルマルチプレートに単層を形成させたRD-A, RD-18S, HeLa-4, Vero, Caco2細胞を準備し、検体100 µLを接種してウイルス分離を試みた。維持培地には、2%非働化牛胎児血清を含有したEagle MEM(日水)を用いた。37°C、5% CO₂の培養条件で7日間培養後、3代継代して細胞変性効果(CPE)が出現したものをウイルス分離陽性とした。

調査結果及び考察

1) 調査検体の診断名と流行状況

本研究で2016年度は107検体提供された。検体の診断名は手足口病(43検体)が最も多く、次いで発疹症(28検体)、ヘルパンギーナ(23検体)の順であり、これら3疾病で全体の87.9%を占めた。月別の発生状況はEVsの流行期である夏季に比較的多く認められたものの、調査期間中は毎月検体が得られていた(図2)。発疹症は6月に始まり11月に流行が終息していたが、ヘルパンギーナは6月から2月まで断続的に発生し、手足口病は7月以降毎月発生していた(図2)。

2) EVsの検出状況

提供された107検体のうち、咽頭拭い液82検体および直腸拭い液1検体からEVs属の遺伝子が検出され、35検体からは同属ウイルスが分離された。図3に検出されたEVsの同定結果を示した。2016年度に最も多く検出されたウイルスは、CVA6であり、26検体であった。CVA6は、2016年に手足口病の原因ウイルスとして最も報告されている種であり⁵⁾、本県においても同様の傾向であったことが示された(図3)。次に多く検出されたウイルス型はEchovirus 9型(以下、ECV9)とCoxsackievirus A16型(以下、CVA16)であり、それぞれ20検体と15検体から検出され、以上3種で全体の約73.5%を占めた(図3)。その他はCoxsackievirus

A2が1検体、Coxsackievirus A4が6検体、Coxsackievirus A4とB1が各1検体、Coxsackievirus A5が3検体、Coxsackievirus A10が3検体、Coxsackievirus B2が1検体、Echovirus 6が1検体、Echovirus 25が1検体、Rhinovirus A、BおよびCがそれぞれ3、1および1検体であった。

3) 主要ウイルス型の診断名と流行状況

検出数の多かったウイルス型のうちCVA6とCVA16は「手足口病」と診断された検体から検出されることが多く、ECV9は「発疹症」から多く検出される傾向にあった(図4)。

主要ウイルス型の月別推移を図5に示した。CVA6は7月から翌年3月までほぼ一年を通して検出され、10月から1月にかけて多く検出される傾向にあった。ECV9は6月から11月にかけて検出され、7、9、10月が多い傾向にあった。CVA16は8月から3月まで断続的に検出された。

4) CVA6の系統樹解析

今年度、全国的な流行を示しているCVA6⁵⁾については、解析可能であった16検体について系統樹解析を行った。その結果、県内検出CVA6株は2つのクラスターに分類され、2016年の長崎県内では、少なくとも遺伝学的に異なる2種類のCVA6による手足口病が流行していたことが明らかとなった(図6)。

以上のとおり、今年度のEVsの流行状況を取りまとめたが、今後も引き続きEVs感染症例を収集・解析してEVsの流行状況をより詳細に明らかにするとともに、その重症化にかかわるウイルス側因子の探索を実施していく予定である。

謝辞

本研究は、2016年度から3年間の計画で実施している長崎県経常研究事業で行われた。研究にご協力頂いた各協力医療機関の諸先生、検体の収集及び搬入にご協力頂きました各保健所の関係諸氏に深謝する。

参考文献

- 1) Nix *et al.*: Sensitive, Seminested PCR Amplification of VP1 Sequences for Direct Identification of All Enterovirus Serotypes from Original C

- linical Specimens. *J Clin Microbiol*, 44, 2698-2704, 2006.
- 2) 斎藤昭彦: エンテロウイルス・パレコウイルス、医学と薬学、第 73 巻、2016.
 - 3) 吾郷昌信 他: 劇症型新生児心筋炎を惹起したコクサッキーウイルス B2 型の性状解析、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、2014.
 - 4) Enterovirus Genotyping Tool ver. 0.1 (<http://www.rivm.nl/mpf/typingtool/enterovirus/>)
 - 5) IDWR、注目すべき感染症 手足口病、23、2017.
 - 6) Obsert *et al.*: Species-specific RT-PCR amplification of human enteroviruses: a tool for rapid species identification of uncharacterized enteroviruses. *J Gen Virol*. 87, 119-128, 2006.
 - 7) N. Saitou, M Nei: The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*, 4, 406-425, 1987.

① 逆転写反応 (RT reaction)						
< primer set > AN32 : GTYTGCCA, AN33 : GAYTGCCA, AN34 : CCRTCRTA, AN35 : RCTYTGCCA						
	volume	final conc.	temp.	time	cycles	
5 × First Strand Buffer	2.0 μL	1 ×	22°C	10 min.	1	
RT primer Mix (10 μM each)	0.5 μL	0.5 μM	42°C	60 min.	1	
20 mM dNTPs	0.5 μL	1 mM	95°C	5 min.	1	
0.1 M DTT	1.0 μL					
SuperScript III (200 U/μL)	0.5 μL	10 U/μL				
RNase Inhibitor (40 U/μL)	0.5 μL	2 U/μL				
Extract RNA	5.0 μL					
total	10 μL					
② 1次増幅反応 (PCR1)						
< primer set > SO224 : GCIATGYTIGGIACICAYRT SO222 : CICCIGGIGGIAYRWACAT						
	volume	final conc.	temp.	time	cycles	
10 × PCR reaction buffer	5.0 μL		95°C	30 sec.	40	
20 mM dNTPs	0.5 μL	0.2 mM each	42°C	30 sec.		
primer (SO224: 10 μM)	5.0 μL	1 μM	60°C	45 sec.		
primer (SO222: 10 μM)	5.0 μL	1 μM				
Taq Polymerase (1 U/μL)	2.5 μL	0.05 U/μL				
DW (DNase/RNase free)	22.0 μL					
cDNA	10.0 μL					
total	50 μL					
③ 2次増幅反応 (snPCR)						
< primer set > AN89 : CCAGCACTGACAGCAGYNGARAYNGG AN88 : TACTGGACCACCTGGNGGNAYRWACAT						
	volume	final conc.	temp.	time	cycles	
10 × PCR reaction buffer	5.0 μL		95°C	6 min.	1	
20 mM dNTPs	0.5 μL	0.2 mM each	95°C	30 sec.	40	
primer (AN89: 10 μM)	4.0 μL	0.8 μM	60°C	20 sec.		
primer (AN88: 10 μM)	4.0 μL	0.8 μM	72°C	15 sec.		
FastStart Taq (5 U/μL)	0.5 μL	0.05 U/μL				
DW (DNase/RNase free)	35.0 μL					
PCR1 product	1.0 μL					
total	50 μL					

図1 CODEHOP VP1 RT- seminested PCR 反応条件

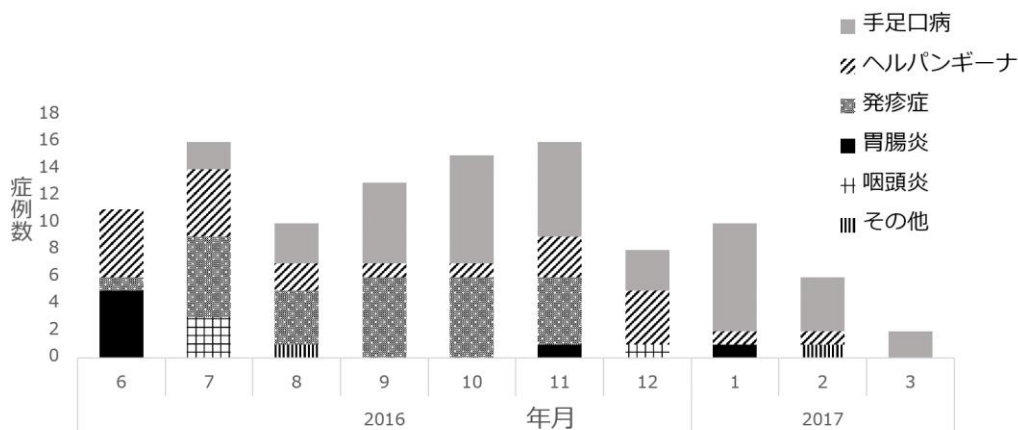


図2: 供試検体(症例別)の月別搬入状況

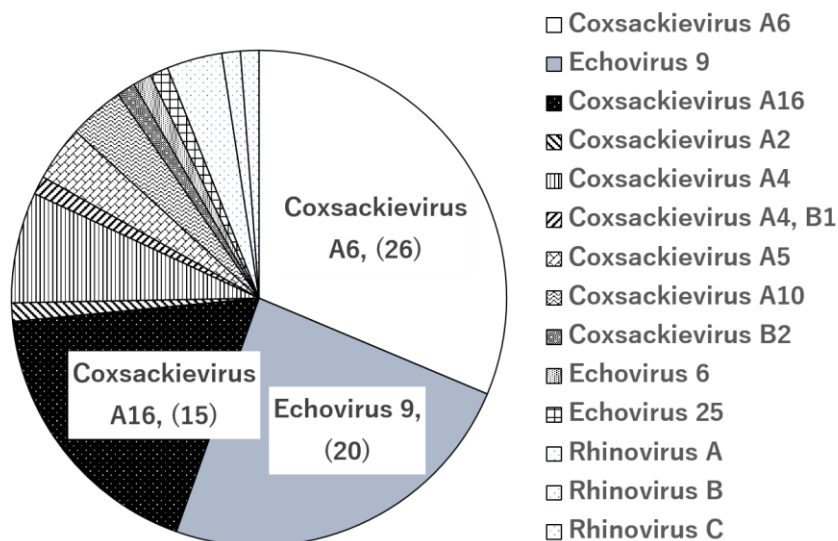


図3: 2016年度に検出されたEVsのウイルス型(n=83)

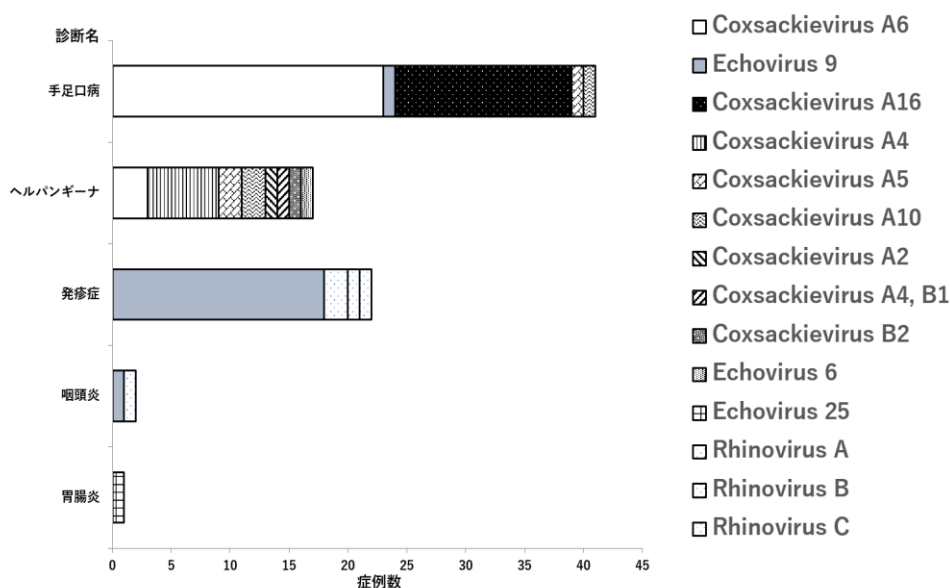


図4: 診断名別のEVsウイルス型(n=83)

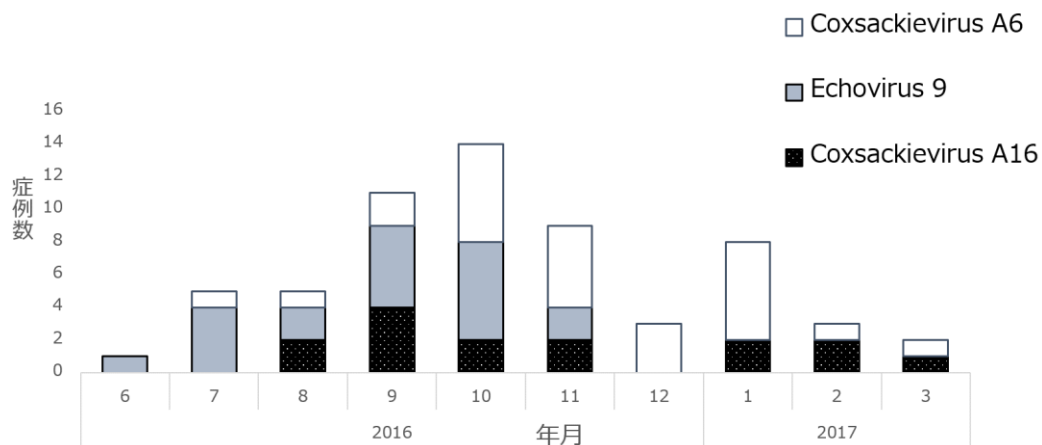


図 5: 三大検出ウイルス型(CA6, E9, CA16)の月別検出状況(n=61)

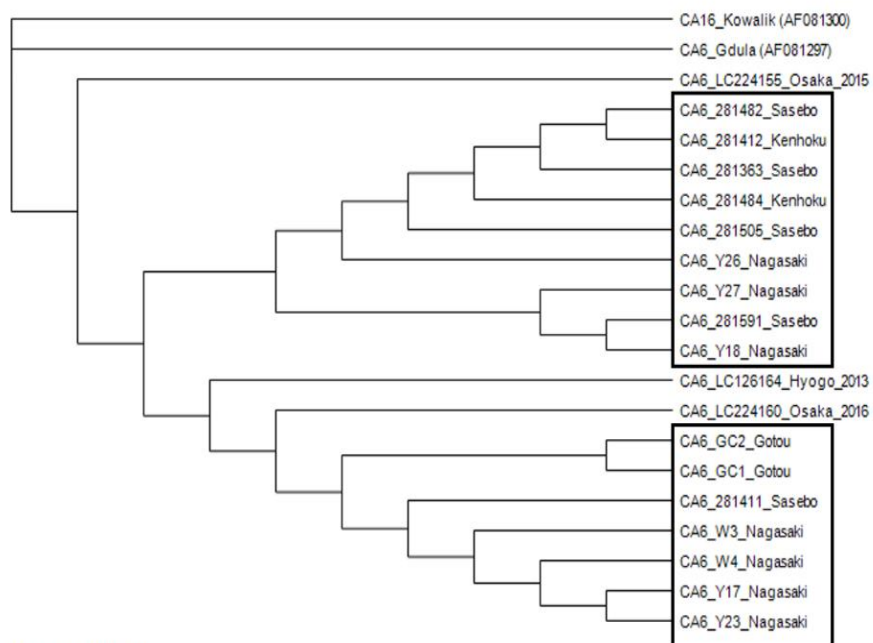


図 6: Coxsackievirus A6 の 系統樹解析

Rectangle: Clinical isolates identified in this study

長崎県における腸管出血性大腸菌感染症の発生状況

川野 みどり、高木 由美香、蔡 国喜、田栗 利紹

Surveillance for Enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection in Nagasaki

Midori KAWANO, Yumika TAKAKI, Guoxi CAI and Toshitsugu TAGURI

Key word: enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection, PFGE, MLVA

キーワード: 腸管出血性大腸菌感染症、パルスフィールド・ゲル電気泳動法、反復配列多型解析法

はじめに

腸管出血性大腸菌 (enterohemorrhagic *Escherichia coli*, 以下 EHEC) 感染症はベロ毒素 (Vero toxin; VT) を産生、または VT 遺伝子を保有する EHEC の感染によって起こり、腹痛、水様性下痢および血便を主訴とする全身性疾病である。有症者の 6~7% では溶血性尿毒症症候群や脳症等の重篤な合併症を引き起こし、死に至ることがある。長崎県環境保健研究センター (以下、環保研) では、感染源の究明と感染拡大防止のため、「長崎県感染症発生動向調査事業」に基づき、菌の検索および分子疫学解析を行っている。EHEC の分子疫学解析には、主にパルスフィールド・ゲル電気泳動 (pulsed-field gel electrophoresis: PFGE) 法、反復配列多型解析 (multilocus variable-number tandem-repeat analysis: MLVA) がある。

本報では、2012 年から 2016 年に長崎県内で発生した EHEC 感染症の発生状況および分子疫学解析結果をまとめたので報告する。

調査方法

1 EHEC 発生状況

2012 年 1 月 1 日から 2016 年 12 月 31 日の期間に長崎市保健所、佐世保市保健所および各県立保健所 (西彼、県央、県南、県北、五島、上五島、壱岐、対馬) より感染症サーベイランスシステムに登録された EHEC 感染症を、年別、月別、地域 (保健所) 別、年齢別、血清群別および症状別に集計した。

2 分子疫学解析

分子疫学解析は、長崎県で検出され環保研に搬入された EHEC 株を国立感染症研究所 (以下、感染研) に送付し、解析された還元データを対象とした。感染研では、2014 年 4 月 1 日受付分より O157、O26、O111

の血清群については MLVA 法による解析を開始したため、今回の調査期間の解析方法は 2012 年 1 月 1 日から 2014 年 3 月 31 日までは全ての血清群を PFGE 法で行い¹⁾、2014 年 4 月 1 日から 2016 年 12 月 31 日受付分は O157、O26、O111 を MLVA 法²⁾³⁾、その他の血清群を PFGE 法で行った

結果及び考察

1 EHEC 発生状況

長崎県内 EHEC 感染症の年別発生件数は、2012 年;43 件、2013 年;84 件、2014 年;142 件、2015 年;50 件、2016 年;84 件で推移しており、月別の発生件数では夏期から秋期にかけて発生が多い傾向にあった (図 1)。地域別では対馬地区を除く長崎県全域で発生しており、保健所別の人口 1 万人あたりの報告件数上位 3 保健所は、2012 年;上五島 (5.46)、壱岐 (2.47)、県北 (0.98)、2013 年;壱岐 (10.04)、県南 (1.15)、佐世保市 (0.66)、2014 年;五島 (11.38)、壱岐 (4.38)、県南 (3.42)、2015 年;壱岐 (8.15)、県北 (1.31)、五島 (0.54)、2016 年;壱岐 (12.42)、県南 (2.24)、県央 (0.37) であった。年齢別の割合は 0~4 歳が最も多く 44.9% (181 件)、次いで 5~9 歳が 16.6% (67 件) であった (図 2)。また、O 血清群の割合は、O157 が最も多く 45.4% (183 件)、次いで O26 が 28.5% (115 件)、O103 が 9.9% (40 件) であった (表 2)。主な症状の割合は、水様性を含む下痢 35.5%、腹痛 24.3%、血便 20.3%、発熱 12.2% であり、溶血性尿毒症症候群 (HUS) を合併した症例は、2012 年に 2 件、2013 年および 2015 年に 1 件ずつ発生していた。集団発生はいずれも保育園で認められており、数十~数百人規模の事例が毎年 1~3 件発生していた。

2 分子疫学解析

2012年から2016年にかけて解析した対象株は317株であり、PFGE法およびMLVA法による解析の結果、他株との関連があったものは241株(57事例)であった(表3)。そのうち「家族内発生」例は207株(42事例)、他県のEHEC株と関連があったものは62株(19事例)であった。その他、5株(3事例)はその年の全国的な流行株との相同性が認められ、広域に発生していると推測されたが、疫学的な関連性は見出されなかった。

まとめ

2012年から2016年の長崎県のEHEC感染症の発生件数は403件で、43件から142件で推移しており、夏期から秋期にかけて発生が多い傾向にあった。対馬地区を除く長崎県全域で発生しており、保健所別の人口1万人対の報告件数では、壱岐、県南、五島及び県北で多い傾向にあった。年齢別では0～4歳の発生が最も多く、O血清群の割合はO157が最も多かった。集団発生は年に1～3回、いずれも保育園で認められた。

PFGE法およびMLVA法の分子疫学解析では、集団発生および家族内発生等の疫学的関連を推測できる事例が確認されたが、他地域との疫学的な証明ができなかった事例も認められた。本感染症対策において、感染研を中心とする全国的なサーベイランスシステムが構築されており、有用な情報還元データとなっているが未だ迅速性にかける欠点から現場との関連づけが困難な状況にある。

EHEC感染症は現在でも県内で流行しており、今後も本感染症における県内データと他地域及び全国データとの比較解析を継続することが、効率的かつ有用な感染源の究明および拡大防止のために必要であると考えられた。

参考文献

- 1) Tenover et al. JCM Vol. 33. No. 9, 2233-2239, 1995.
- 2) Izumiya H, et al., Microbiol Immunol 54: 569-577, 2010.
- 3) 3) Ishihara T, et al., IASR Vol.35:129-130, 2014

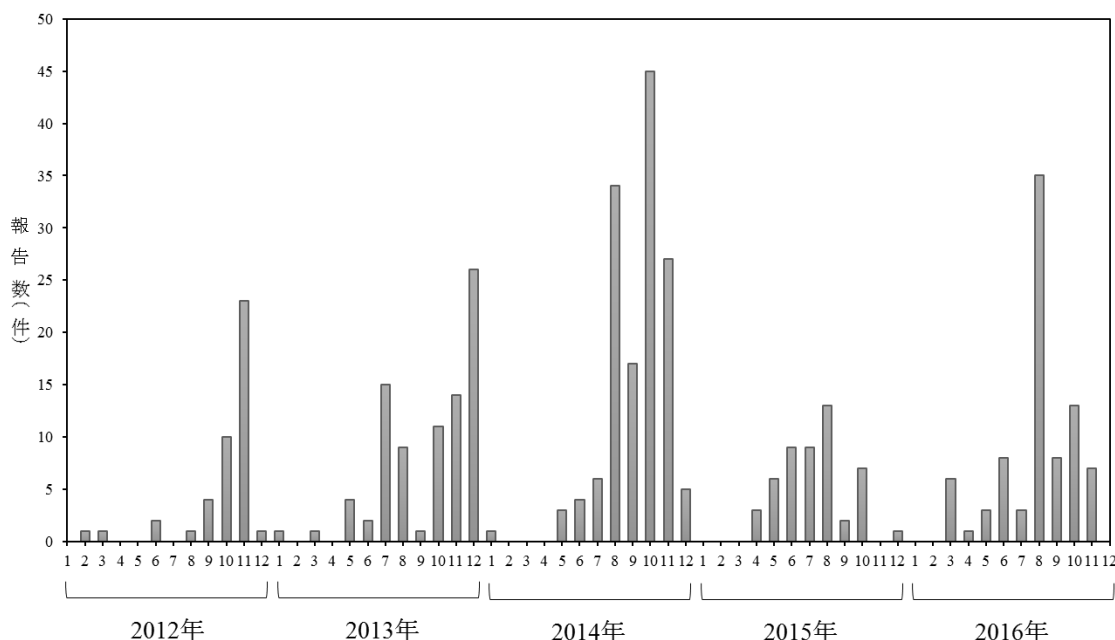


図1. EHEC感染症月別発生状況, 2012年1月~2016年12月

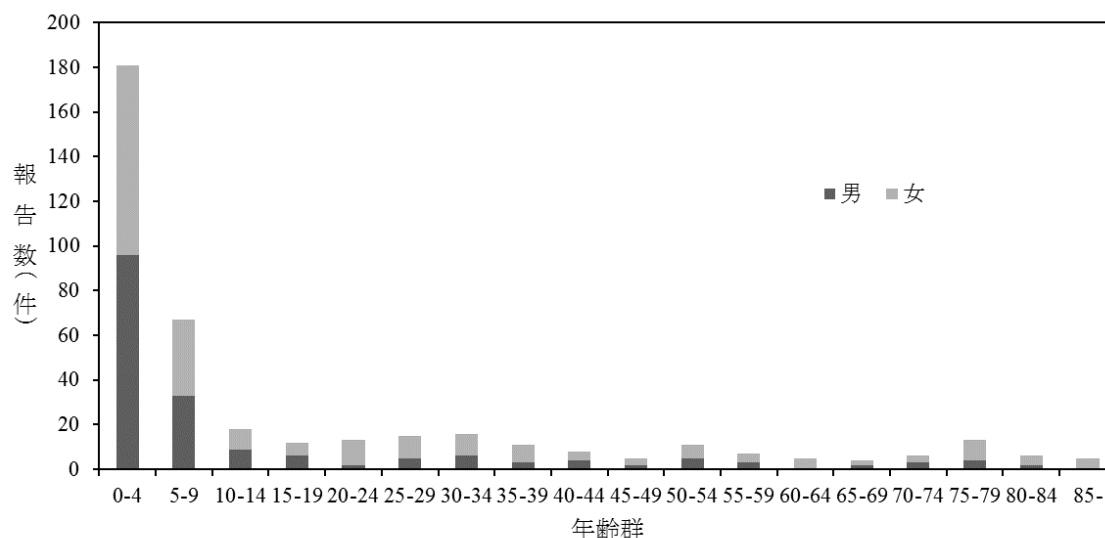


図 2. 年齢別の EHEC 感染症発生状況

表 1. 血清群別の EHEC 検出数

	2012年	2013年	2014年	2015年	2016年	合計
O157	25	44	71	16	27	183
O26	4	27	34	10	40	115
O103	2	3	23	10	2	40
O111	2	2	11	11	8	34
O121	2	1	0	1	3	7
O145	5	2	0	0	0	7
O91	0	1	0	0	1	2
その他	3	4	3	2	3	15
Total	43	84	142	50	84	403

表 2. EHEC 感染症の集団発生

発生地域	発生日	発生施設	O血清群	毒素型	陽性者数/ 被験者数
上五島	2012/11/13	保育園	O157	VT2	12 / 不明
壱岐	2013/7/27	保育園	O26	VT1	12 / 不明
佐世保	2013/11/29	保育園	O157	VT2	11 / 不明
県北	2014/8/6	保育園	O103	VT1	19 / 320
県南	2014/9/4	保育園	O26	VT1	13 / 113
五島	2014/10/25	保育園	O157	VT2	33 / 51
壱岐	2016/8/12	保育園	O26	VT1	15 / 121
県南	2016/8/16	保育園	O26	VT1	13 / 127

表 3. PFGE 法および MLVA 法から見出された株の他株との関連性

No.	発生時期	発生地域	株数	O血清群	他株との関連性
1	2012年9月	県北	3	O145	家族内発生
2	2012年10月	県北	2	O121	家族内発生
3	2012年10月	県南	2	O145	家族内発生
4	2012年 10-11月	壱岐	2	O26	家族内発生
5	2012年11月	上五島	4	O157	保育園集団発生(家族内発生あり)
6	2012年11月	佐世保	3	O157	家族内発生、散発事例、2012年10月さいたま市及び埼玉県
7	2012年11月	壱岐	2	O103	保育園内発生
8	2012年11月	県南	1	O157	2011年11月宮崎県、2012年9月三重県
9	2013年 6-7月	壱岐	3	O157	家族内発生
10	2013年7月	壱岐	7	O157	保育園集団発生(家族内発生あり)
11	2013年8月	佐世保	1	O157	2012-2013年シーズン流行株の一つ(22道府県・政令市で発生)
12	2013年10月	県南	1	O157	2012年10月福岡県
13	2013年 10月、12月	県南	9	O26	保育園内発生、家族内発生
14	2013年11月	県央	1	O103	2013年11月長崎市
15	2013年11月	壱岐	2	O146	家族内発生
16	2013年11月	県北	2	O157	家族内発生
17	2013年 11-12月	佐世保	7	O157	保育園集団発生(家族内発生あり)、2012年10月福岡県
18	2013年12月	県南	2	O157	家族内発生
19	2013年12月	県南	1	O157	2013年11月さいたま市
20	2013年12月	壱岐	7	O157	家族内発生
21	2014年5月	西彼	2	O157	家族内発生
22	2014年 6-7月	県南	3	O157	家族内発生、2014年5月岡山県
23	2014年8月	県北	20	O103	保育園集団発生(家族内発生あり)
24	2014年8月	県央	3	O157	家族内発生
25	2014年8月	県南	6	O26	保育園集団発生
26	2014年8月	県北	1	O157	2014年7月富山県、8月横浜市、10月富山県
27	2014年 9月、11-12月	県南	19	O26	保育園内発生、家族内発生、2014年8、9、10、12月鹿児島県
28	2014年10月	県南	3	O157	家族内発生
29	2014年10月	県南	2	O157	家族内発生
30	2014年10月	県南	2	O157	家族内発生
31	2014年 10-11月	五島	9	O157	保育園集団発生(家族内発生あり)
32	2014年 10月、12月	県南、佐世保	2	O157	2014年5月岡山県
33	2014年11月	西彼	3	O103	家族内発生
34	2014年11月	壱岐	11	O111	保育園内発生、家族内発生

表 3(続き)

No.	発生時期	発生地域	株数	O血清群	他株との関連性
35	2014年 11-12月	県南	7	O26	保育園内発生、家族内発生
36	2015年4月	壱岐	2	O111	家族内発生
37	2015年5月	県北	2	O26	家族内発生
38	2015年6月	壱岐	4	O26	同一初発患者事例、2015年6月福岡市
39	2015年7月	県北	3	O103	家族内発生
40	2015年7月	壱岐	6	O111	家族内発生
41	2015年8月	五島	2	O157	家族内発生
42	2015年8月	県南	2	O157	家族内発生、2015年7月佐賀県
43	2015年8月	県北	4	O103	保育園内発生、家族内発生
44	2015年8月	壱岐	2	O103	家族内発生
45	2015年8月	県央	1	O157	2015年6月鹿児島県
46	2016年5月	佐世保	2	O26	家族内発生
47	2016年6月	壱岐	5	O26	家族内発生
48	2016年8月	壱岐	16	O26	保育園集団発生(家族内発生あり)
49	2016年8月	県南	14	O26	保育園集団発生(家族内発生あり)
50	2016年8月	県南	2	O157	家族内発生
51	2016年8月	県央	1	O157	2016年7月埼玉県
52	2016年9月	県央、佐世保	3	O157	2016年シーズン流行株の一つ(32都府県・政令市で発生)
53	2016年9月	壱岐	2	O121	家族内発生
54	2016年10月	県南	1	O157	2016年シーズン流行株の一つ(25都府県・政令市で発生)
55	2016年10月	県南	8	O157	2016年8月京都市・千葉県、2016年10月横浜市
56	2016年11月	県央	2	O111	家族内発生、2016年5月埼玉県
57	2016年11月	県南	2	O157	家族内発生

III 論文投稿・学会発表

III 論文投稿・学会発表

■ 論文 1

水環境学会誌, 39(A), 178~182(2016).

大村湾における底層溶存酸素量の変遷と改善に向けた取り組み

粕谷智之

長崎県環境保健研究センター

大村湾は長崎県本土のほぼ中央に位置し、佐世保湾を介して狭い針尾瀬戸と早岐瀬戸だけで外海と通じている閉鎖性の強い湾である。形上湾や津水湾などの支湾があり、平均水深は14.8m、面積はおよそ320km²で琵琶湖の約1/2である。主要な漁業資源としては真珠養殖やナマコ漁業などが挙げられる。しかし、近年、底魚などの底生水産物の漁獲量が減少しており、2001年度に海洋シンクタンク事業の一環として行われた海の健康診断において、生物の生息空間や底質などに問題がある可能性が指摘されている¹⁾。2007年には津水湾で大規模な青潮が発生し、対策が急務となっている。本稿では大村湾における水質の推移について述べ、次に底層が貧酸素化するメカニズムについて概説した後、大村湾における水環境改善の取り組みについて事例を紹介する。

■ 論文 2

Oncotarget. 2017 Feb 4. doi: 10.18632/oncotarget.15096.

Independent and joint effects of tea and milk consumption on oral cancer among non-smokers and non-drinkers: a case-control study in China

Fa Chen^{1,2}, Yu Qiu³, Guoxi Cai⁴, Kiyoshi Aoyagi⁵ and Baochang He^{1,2}

¹ *Department of Epidemiology and Health Statistics, School of Public Health, Fujian Medical University, Fujian, China.,*

² *Key Laboratory of Ministry of Education for Gastrointestinal Cancer, Fujian Medical University, Fujian, China,*

³ *Department of Oral and Maxillofacial Surgery, the First Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Fujian, China,*

⁴ *Nagasaki Prefectural Institute of Environmental Research and Public Health, Nagasaki, Japan,*

⁵ *Okayama Department of Public Health, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki, Japan.*

This study aims to evaluate the independent and joint effects of tea and milk consumption on oral cancer risk among non-smokers and non-drinkers (NS/ND). A hospital-based case-control study was performed in Fujian, China. 421 cases and frequency-matched 1398 controls were included without tobacco smoking and alcohol drinking habits. Unconditional logistic regression model was used to assess the relationship of tea and milk consumption with oral cancer risk. Tea and milk consumption

were significantly associated with decreased risk of oral cancer, the adjusted odds ratios (aORs) were 0.73 (95% CI: 0.54-0.97) and 0.69 (95% CI: 0.55-0.88), respectively. According to subgroup analysis, the inverse associations between tea consumption and oral cancer risk were only observed among the elders (>60 years) and urban residents. While the protect effect of milk drinking was more obvious in males, normal body mass index population (18.5-23.9), urban residents and those age \leq 60 years. Additionally, a significantly multiplicative interaction between tea and milk consumption was observed for oral cancer risk ($P = 0.001$). The present study is the first to simultaneously assess the association of tea consumption and milk drinking with oral cancer risk. The results suggest that tea and milk consumption are independent protective factors for oral cancer among NS/ND, with a joint effect between them.

■ 学会発表 1

日本ウォーターズ株式会社主催 地域産業活性化支援フォーラム[長崎・佐賀]
平成 28 年 9 月 17 日 長崎大学文教キャンパス(長崎市)

いわゆる『健康食品』中の違法成分分析

辻村和也

健康志向食品(いわゆる健康食品)は、健康・美容意識の高まりやインターネットによる通信販売の普及により、市場増加が見込まれる製品のひとつである。しかしながら、その中には、意図的に医薬品成分やその類縁体を混入した違法な製品があり、健康被害の報告事例もある。本フォーラムで長崎県における LC-MS/MS による違法成分検出事例及び LC-QTOF/MS での分析手法の検討の取り組みを示す。

■ 学会発表 2

日本防菌防黴学会 第 43 回年次大会 2016 年 9 月 26 日～27 日 きゅりあん(東京都)

携帯型フローサイトメトリー測定器によるレジオネラリスクの現地評価の有効性

田栗利紹¹、高木由美香¹、川野みどり¹、蔡 国喜¹、下田貴宗²、小田康雅³

¹長崎県環境保健研究センター、²(株)シモダアメニティ、³シスメックス(株)

【目的】レジオネラ属菌(レ菌)は市中肺炎の起因菌の一つであり、環境中至る所に生息しているが、アメーバ類との共生関係やバイオフィルム(BF)との複雑な相互関係のために、その実態はよくわかっていない。入浴施設等でレ菌の汚染問題が発覚して以降、我国では浴槽水の塩素消毒管理が義務付けられてきたが、循環ろ過器等の複雑な設備構造はもとより、泉質、ろ過の規模、入浴者数、時間、および消毒状況等によって時々刻々と変化する BF の影響、さらには衛生管理体制や経営状況など、いわば現地でしかわからない個々の問題のためにレ菌が再発を繰り返して深刻な事態に発展している事例も少なくない。今回、我々は、これまでに卓上型フローサイトメトリー(FCM)測定器を用いて開発してきた浴槽水中レジオネラリスクの迅速細菌計数法(RDM)¹⁾を、重さ 6 kg 程度の携帯型 FCM 測定器に適用した結果、有効性が認められたので報告する。

【方法】添加回収実験:*Escherichia coli* NBRC 3972 と *Legionella pneumophila* ATCC 33152 を用いて 1～7 log CFU/mL の菌液を調製し、卓上型 FCM、携帯型 FCM および培養法にて添加回収実験を行い、結果を比較した。携帯型 FCM(CyFlow miniPOC, Sysmex)の測定では、0.6 mL 浴槽水に等量の希釈液¹⁾と 4 μL 染色液(propidium iodide)を加えたものを 5 mL ディスポジシングに吸い上げて機器にセットし、核酸量と側方散乱光(SSC)を指標とする特定領域の細胞数を測定した。卓上型 FCM の試薬及び操作方法と標準菌の培養法については既報のとおり処理した¹⁾。施設調査:平成 27 年 12 月～28 年 3 月に、N 県内の入浴施設 3 浴槽および 4 社会福祉施設の 5 浴槽(1 つは配管なし)を調査した。各浴槽は配管洗浄剤(モノクロラミンまたは過炭酸ナトリウム製剤)を用いて洗浄し、処理前と処理後の浴槽水を採水するとともに、ろ過器および配管排水もサンプリングして検査に供した。

【結果】標準菌株を用いた添加回収実験では、卓上型 FCM が培養法に対して直線性を示した範囲は約 3.4～7.4 log CFU/mL であったが、携帯型 FCM は約 4.4～7.2 log CFU/mL であった。しかし、浴槽水やろ過器等排水を用いた培養検査結果(30 検体中陽性 10、陰性 20)との比較では、卓上型 FCM の +/- 判定結果が 27 検体の

一致であったのに対して携帯型 FCM の判定結果は 28 検体が一致した。偽陰性と判定したサンプルは洗浄後のすすぎ水であり、過剰に残留した中和剤の影響が考えられ、偽陽性と判定したサンプルは掛流し式の排水で、レ菌自体の汚染が認められないか、または VBNC 化していると考えられた。

【結論】塩素管理下における浴槽水中のレジオネラリスクを迅速に評価する RDM 法において、若干の感度の差は認められたものの携帯型 FCM は卓上型と同程度の判定能を期待できる。データの視覚化が可能な本方法は、現地で BF の状況を施設衛生管理者に直接示すことで管理者の自発的な衛生管理を促すコーチングアイテムとしての効用が期待され、衛生管理者との現地での対話を通じてレジオネラ属菌予防に大きく寄与することができると考えられた。本研究は、平成 27 年度長崎県環境部 研究成果普及推進事業として実施された。

1) Taguri, T. *et al.*, J. Microbiol. Method, 2011

■ 学会発表 3

第 42 回九州衛生環境技術協議会 2016 年 10 月 13~14 日、都久志会館(福岡市中央区)

長崎県で発生したコクサッキーウイルス B5 型による乳児無菌性髄膜炎事例について

松本 文昭

【目的】エンテロウイルスによる感染症は、主に夏季に小児において流行し、その主因となる血清型は年により異なっている。その臨床像は幅広く多彩であり、手足口病やヘルパンギーナ、無菌性髄膜炎等は感染症発生動向調査における 5 類定点把握疾患として、患者発生動向に加えその病原体情報も一部報告されている。

今回、臨床医から情報提供を受け、県内で散発的に発生していた新生児における無菌性髄膜炎事例に対する調査を実施したところ、コクサッキーウイルス B5 型(CB5)を相次いで検出したので報告する。

【方法】材料は、2016 年 3 月から 2016 年 7 月にかけて本県で発生した無菌性髄膜炎の新生児症例 19 例から採取された臨床検体(髄液、血清、咽頭拭い液、便等)70 検体を用いた。

方法は、これらの検体に対し、エンテロウイルス属の遺伝子を網羅的に検出する CODEHOP VP1 RT-sn PCR を実施し、遺伝子検出を試みた。特異的増幅産物が得られたものについて、ダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定し、検出マニュアルに基づきウイルス型別を実施した。

【結果】調査した 19 症例のうち、9 症例 28 検体から CB5 の遺伝子を検出した。そのほか 1 症例から Echo9 を検出したが、残る 9 症例からはエンテロウイルスに由来する遺伝子は検出されなかった。CB5 検出事例のうち 2 症例では、子の発症前に母親に感冒症状が認められ、母親からの感染も疑われた。

【結論】搬入された症例の約半数から CB5 が検出された。コクサッキーウイルス B 群は、新生児期の感染では心筋炎や髄膜炎を起すウイルスとして知られており、2013 年には本県において CB2 による劇症型心筋炎による新生児死亡例も発生している。しかしながら、本県における通常の病原体サーベイランスでは、手足口病やヘルパンギーナなどの検体からコクサッキーウイルス A 群の流行は探知出来るものの、コクサッキーウイルス B 群の流行状況は十分に把握できていない。髄膜炎に限らず、エンテロウイルスの流行は年によってその血清型が異なるため、今後も通常のサーベイランスを継続するとともに、臨床医との情報共有を図ることで地域流行の早期探知につなげていくことが重要である。

■ 学会発表 4

平成 28 年度日本獣医三学会(獣医学術九州地区学会) 平成 28 年 10 月 16 日 千草ホテル(北九州市)

長崎県で分離された日本脳炎ウイルスの性状解析

吉川亮、斎藤佳子

【はじめに】日本脳炎は日本脳炎ウイルス(JEV)を病原体としたコガタアカイエカを主な媒介動物とするアルボウイルス感染症である。多くの場合が不顕性感染であるが、発症した場合、20~40%が死亡に至る公衆衛生上最も留意すべき急性ウイルス性脳炎である。現在、日本脳炎患者は 1990 年半ばから 10 名以下の報告数を推移し、長崎県においても 2001~2009 年まで患者報告がなかった。しかしながら、2010 年、2011 年および 2013 年に重篤な患者発生があったことに加え、演者らは長崎大学熱帯医学研究所との共同研究から長崎県では JEV 株の入れ替わりが頻繁にあり、大陸から JEV が飛来している可能性を強く示唆する結果をえたことから、長崎県で分離された JEV 株の性状を明らかにすることは患者発生要因を探索するうえで重要と考えた。そこで当所にて保管された 2007~2014 年の JEV 分離株について性状解析を行った。

【材料および方法】材料は 2007~2014 年までに長崎県で飼育された豚の血清から分離された JEV17 株および長崎県で捕集された蚊から分離された JEV9 株の計 26 株を用いた。方法は JEV のエンベロープ領域(1,500 塩基)を用いた分子疫学解析およびプラーク形成能、抗原性等のウイルス性状の比較解析を行った。

【結果】2007~2014 年までに長崎県で分離された JEV はすべて遺伝子型 1 型であり、系統樹解析の結果、3 つのグループに分類された。このうち 2 つのグループは中国で近年多く報告のある JEV 株を含むものであった。2007~2014 年までの JEV 分離株は ϕ 2 mm 前後のプラークを形成し、分離株間での差はみられなかった。マウスの抗 JEV 血清を用いた中和試験の結果、すべての株が抗 JEV 血清で中和された。

【まとめ】長崎県は種々の面で大陸の影響を受けているが、JEV についても分子疫学解析の結果から大陸からの影響が強くみられた。長崎県の分離株はすべて遺伝子型 1 型であるが、患者の多いインドや中国では 1 型 3 型ともに患者発生しており、遺伝子型は発生要因ではないと考えられる。また、ウイルス性状の比較解析の結果から長崎県で分離された JEV はプラーク形成能や抗原性において患者発生を誘発する要因はみつからなかった。今回、ウイルス側からの患者発生要因は明らかにできなかったが、引き続き病原因子の探索を続けていきたい。

■ 学会発表 5

日本食品衛生学会 平成 28 年 10 月 27- 28 日 函館国際ホテル(北海道函館市)

キンシバイ(巻貝)食中毒事例における生体試料中テトロドトキシン濃度推移と毒成分に関する考察

辻村和也¹、吉村裕紀¹、坂本真樹子²、池田由紀¹、山之内公子³、本村秀章¹

1長崎県環境保健研究センター、2長崎県県央保健所、3元長崎県環境保健研究センター

【目的】平成 27 年 11 月長崎県県北エリアで巻貝(キンシバイ)による食中毒が発生し、主要原因物質としてテトロドトキシン(TTX)が検出された。TTX に起因するキンシバイ食中毒は、過去 1 件長崎県で発生しているが、今回を含め全国で 3 例しかない。そのため、キンシバイによる食中毒に関する知見は少ない。

そこで、県生活衛生課、医療機関等の協力のもと、治療・検査の過程で経日的に採取された患者生体試料(血清及び尿)中の TTX 濃度推移と当該巻貝中の毒成分解析を行った。

【方法】

食品検体は、入手した巻貝(十数個)のうち、可食部の残っていた 2 検体(検体 1、2)を分析した。血清検体は、食中毒発生時「Day 0」～「Day 13」の検体を、また、尿は「Day 0-1」及び「Day 2-3」蓄積尿を入手、分析した。食品及び血清の LC-MS/MS による TTX 定量分析は、当センターで確立した方法により分析を行った。尿検体についても血清と同じ方法で測定した。また、食品検体中の TTX 類縁体探索のために LC-QTOF/MS 分析を行い、マウスバイオアッセイによる食品検体の総合的毒力(MU)も算出した。

【結果】

巻貝残品 2 検体とも高濃度 TTX が検出された。特に検体 2 は、1 個体で致死量の TTX を含有していた。また、血清中 TTX 量推移及び尿排泄の結果より、患者は致死量を超える TTX を摂取していたと推察された。

LC-Q/TOF/MS 及びマウスバイオアッセイの結果、11-oxo-TTX 等 TTX 類縁体の存在が示唆された。

【考察】

今回長崎県で発生したキンシバイの喫食による食中毒事例は、過去の事例と同じく、食品残品、血清及び尿から TTX が確認された。また、食品残品中 TTX 濃度は極めて高濃度であると共に、毒性能を有する類縁体の存在が示唆された。一方、生体内 TTX 推移の結果、臨床症状と相関するように、キンシバイ喫食直後の TTX 血清中濃度は急速に上昇、喫食後翌日が最高濃度であり、数日かけて緩やかに減少がみられた。しかし、意識回復まで 6 日間と長く、実際喫食したキンシバイも食品残品同様に高濃度の TTX が蓄積していたことが推察された。以上のことから、キンシバイは、食品衛生上極めて危険な種であると結論づけられた。

■ 学会発表 6

第 57 回日本熱帯医学会大会 2016 年 11 月 4～6 日、東京

A survey on health status among farmers in a local county of southeastern China

蔡 国喜¹、塗 饒萍²、張 文昌²、黄 萌²、陳 潔²、何 斐²、矢澤 亜季³、市川 智生⁴、山本 太郎⁴、門司 和彦⁵

¹長崎県環境保健研究センター、²福建医科大学、³東京大学大学院医学系研究科、⁴長崎大学熱帯医学研究所

⁵長崎大学大学院熱帯医学・グローバルヘルス研究科

【背景】1980 年代後半に改革開放政策が導入されて以降、中国の急速な市場経済化は人びとの生活環境に大きな変化をもたらし、彼らの持続的な健康は脅かされている。たとえば、食生活が欧米化し身体活動量が低下することによる肥満・慢性疾患の増加や、社会格差の拡大・人びとの関係性の希薄化がもたらす心理的健康影響などが挙げられる。日本の農村部でも過疎化、高齢化の進行に伴う成人病・孤独感問題が深刻化している。

【調査方法】2015 年 5 月 2 日より F 省 S 県において予備調査を行った。予備調査では現地の生活の様子に関する聞き取りを行なったほか、健康調査を行うにあたって必要となる設備や医療スタッフの準備・状況確認を実施した。2015 年 7 月末からの本調査では、7 つのコミュニティに暮らす 797 名を対象として生活環境や心理ストレスに関する質問紙調査、採血、身体計測(身長・体重・腹囲・臀囲)、血圧測定を実施した。質問紙調査には家族構成、出稼ぎの経験、家族との離別の経験、ソーシャルキャピタル、食生活、飲酒、喫煙、ストレス尺度等に関する質問が含まれている。

【結果】2015 年 8 月に、S 県の地方衛生局、郷衛生院などの協力の下で本調査を実施した。調査参加者 790 名のうち男性の割合は 39.1%で、平均年齢は 59.5 歳(男性が 61.9 歳、女性が 58.0 歳)であった。また 38.1%が教育を受けておらず、39.4%が小学校卒業、22.5%が中学校卒業以上の学歴であった。婚姻状況については 78.9%が婚姻状態にあった。過体重(BMI \geq 25)は男性で 23.0%、女性で 31.7%であった。高血圧は 36.7%の男性、48.4%の女性で見られた。本研究は中国農村部で肥満や高血圧をはじめとした慢性疾患の拡大状況を明らかにし、生活様式や環境変化との関連性が示唆された。

■ 学会発表 7

平成 28 年度日本水産学会九州支部総会 2016 年 12 月 10 日 長崎大学水産学部

ヒスタミン産生菌 *M.morganii* 食中毒分離株からの HDC 遺伝子のクローニング及びその発現系の構築

高 禎俐¹・蔡 国喜²・田栗 利紹²・本多 隆²・吉田朝美¹・長富 潔¹

¹長崎大学大学院水産・環境科学総合研究科

²長崎県環境保健研究センター

【目的】ヒスタミンによるアレルギー様食中毒は、ヒスタミン産生菌のもつヒスチジン脱炭酸酵素 (Histidine decarboxylase: HDC) により引き起こされることである。取扱い菌は長崎県で 2008 年に発生した食中毒の原因食品から分離・同定された *Morganella morganii*、*Raoultella planticola* で、そのうち *M. morganii* の食中毒分離株と標準株について低温での増殖活性を比べると、分離株の方が増殖活性が高い傾向が見られた。そこで本研究では、ヒスタミン産生菌 *M. morganii* 食中毒分離菌からの HDC 遺伝子のクローニング及びその発現系の構築を行い、食中毒分離菌 HDC の性状解明を目的とした。

【方法】*M. morganii* 食中毒分離株より染色体 DNA を抽出し、PCR 法により HDC 遺伝子を増幅し、TA クローニングした。同遺伝子を pCold I DNA vector に挿入し、大腸菌による大量発現系の構築を試みた。

【結果】*M. morganii* の食中毒分離株より HDC 遺伝子のクローニングを行った上に、そのコード領域の塩基配列 1,137 bp (378 アミノ酸推定) を決定し、標準株と比べると、34 箇所の塩基置換が認められ、5 箇所のアミノ酸置換が認められた。さらに、本酵素遺伝子を発現ベクターに挿入し、大量発現系の構築を試みているところである。

■ 学会発表 8

平成 28 年度日本獣医師会獣医学術学会年次大会 (日本獣医公衆衛生学会) 平成 29 年 2 月 24 日～26 日 ホテル金沢 (石川県)

長崎県で分離された日本脳炎ウイルスの性状解析

吉川亮、斎藤佳子

【はじめに】日本脳炎は日本脳炎ウイルス (JEV) を病原体としたコガタアカイエカを主な媒介動物とするアルボウイルス感染症である。多くの場合が不顕性感染であるが、発症した場合、20～40% が死亡に至る公衆衛生上最も留意すべき急性ウイルス性脳炎である。現在、日本脳炎患者は 1990 年半ばから 10 名以下の報告数を推移し、長崎県においても 2001～2009 年まで患者報告がなかった。しかしながら、2010 年、2011 年および 2013 年に重篤な患者発生があったことに加え、演者らは長崎大学熱帯医学研究所との共同研究から長崎県では JEV 株の入れ替わりが頻繁にあり、大陸から JEV が飛来している可能性を強く示唆する結果をえたことから、長崎県で分離された JEV 株の性状を明らかにすることは患者発生要因を探索するうえで重要と考えた。そこで当所にて保管された 2007～2014 年の JEV 分離株について性状解析を行った。

【材料および方法】材料は 2007～2014 年までに長崎県で飼育された豚の血清から分離された JEV17 株および長崎県で捕集された蚊から分離された JEV9 株の計 26 株を用いた。方法は JEV のエンベロープ領域 (1,500 塩基) を用いた分子疫学解析およびプラーク形成能、抗原性等のウイルス性状の比較解析を行った。

【結果】2007～2014 年までに長崎県で分離された JEV はすべて遺伝子型 1 型であり、系統樹解析の結果、3 つのグループに分類された。このうち 2 つのグループは中国で近年多く報告のある JEV 株を含むものであった。

2007～2014年までの JEV 分離株は $\phi 2$ mm 前後のプラークを形成し、分離株間での差はみられなかった。マウスの抗 JEV 血清を用いた中和試験の結果、すべての株が抗 JEV 血清で中和された。

【まとめ】長崎県は種々の面で大陸の影響を受けているが、JEV についても分子疫学解析の結果から大陸からの影響が強くみられた。長崎県の分離株はすべて遺伝子型 1 型であるが、患者の多いインドや中国では 1 型 3 型ともに患者発生しており、遺伝子型は発生要因ではないと考えられる。また、ウイルス性状の比較解析の結果から長崎県で分離された JEV はプラーク形成能や抗原性において患者発生を誘発する要因はみつからなかった。今回、ウイルス側からの患者発生要因は明らかにできなかったが、引き続き病原因子の探索を続けていきたい。

■ 学会発表 9

第53回長崎県総合公衆衛生研究会 2017年3月3日 長崎大学医学部ポッセム会館

長崎県におけるノロウイルスの検出状況

山下綾香¹、三浦佳奈¹、松本文昭¹、吉川亮¹、田栗利紹¹

¹長崎県環境保健研究センター

【はじめに】ノロウイルスは食中毒や感染性胃腸炎の原因となる主要な病原体の一つとして知られている。本ウイルスは GI から GV までの遺伝子グループに分類されており、その中で主にヒトに感染するのは GI と GII である。さらに GI には 9 種類、GII には 22 種類の遺伝子型が存在するが、平成 26 年 3 月にはこれまで世界的に流行していたウイルス株と遺伝子型が異なる新規遺伝子型の GII.P17- GII.17 が神奈川県川崎市で発見された¹⁾。新規遺伝子型のウイルスに対しては、一般的には免疫を持たないヒトが多いことから大きな流行に繋がることが懸念されている。このことを受けて、今回、長崎県内のノロウイルスを原因とする食中毒および感染性胃腸炎について、過去 5 年間に長崎県で発生したノロウイルスの分子疫学解析を行い、本ウイルスの長崎県への侵淫状況を調査した。

【対象と方法】2-1. 供試したノロウイルス株 平成 23 年 4 月から平成 28 年 3 月までに、ノロウイルスによる食中毒および感染症胃腸炎の疑いで長崎県環境保健研究センターに検査依頼された事例により搬入された便、嘔吐物および食品について、ノロウイルス陽性と判定された 213 株を用いた。2-2. 検体からの RNA 抽出方法、RT-PCR および遺伝子型別 厚生労働省からの通知に基づいて 2)、便検体を PBS (-) で約 10% 懸濁液とし、10,000 rpm で 15 分間遠心分離した上清から RNA 抽出キット (QIAamp Viral RNA Mini Kit, QIAGEN) を用いてウイルス RNA の抽出を行った。抽出した RNA は DNA 分解酵素で処理した後、RT-PCR 検査キット (QIAGEN OneStep RT-PCR Kit, QIAGEN) を用いてノロウイルス遺伝子の構造タンパク質遺伝子を増幅した。PCR 増幅用のプライマーセットとしてノロウイルス GI には COG1F/G1SKR を、ノロウイルス GII には COG2F/G2SKR を用いた。食品検体に関しては超遠心法²⁾を用いて濃縮し RNA 抽出後、DNA 分解酵素処理、RT-PCR 検査、及び Semi Nested PCR を行った。Semi Nested PCR 増幅用のプライマーセットとしてノロウイルス GI には G1SKF/G1SKR を、ノロウイルス GII には G2SKF/G2SKR を用いた。アガロースゲル電気泳動により増幅バンドが確認されたものについてダイレクトシーケンスを行い、塩基配列を決定後、ノロウイルス遺伝子型分類ツール (Norovirus genotyping tool) を用いて遺伝子型別した。2-3. GII.17 の分子疫学解析 今回、GII.17 と同定された検体に関してはより詳細に解析した。逆転写反応キット (SuperScriptIII™ Reverse Transcriptase, invitrogen) を用いて抽出 RNA の相補的 DNA を合成し、DNA ポリメラーゼ (Ex Taq Hot Start Version, TaKaRa) を用いてノロウイルスの RNA 合成酵素 (RdRp) 遺伝子を増幅した。PCR 増幅用のプライマーセットとして Yuri22F/G2SKR を用いた。PCR を行った後、アガロースゲル電気泳動により増幅バンドが確認されたものについてダイレクトシーケンスを行い、塩基配列を決定後、ノロウイルス遺伝子型分類ツールを用いて遺伝子型別したのち系統樹解析を実施した。系統樹解析は GENETYX ver.12 を用いて、近隣結合法 (NJ 法)³⁾で行った。

【結果及び考察】3-1. 長崎県において平成 26 年までは GII.4 が主に検出されていたが、同年末から翌年にかけて GII.17 が検出されはじめた。平成 27 年には GII.17 の占める割合が増えていたが、GII.4 の検出もやや減少傾向にあるものの続いており、全国との比較において大きな違いは認められなかった。3-2. 新型ノロウイルスの流行状況 新分類法に基づくノロウイルスの遺伝子型別解析を行ったところ、通知法 2)により構造蛋白質の遺伝子型が GII.17 に分類された株は全てノロウイルス GII.P17- GII.17 に分類された。また、事例ごとに 1 検体選出し、系統樹を作成したところ、川崎市にて平成 26 年と平成 27 年に検出されたノロウイルス GII.P17- GII.17 と全て同じグループを形成しており、川崎市での発見から数ヶ月遅れで長崎県に侵入していたことが明らかとなった。今後もノロウイルス GII.P17- GII.17 の動向には十分な注意が必要と考えられる。ノロウイルスの遺伝子解析を継続していくことで、シーズンごとの流行の傾向等を監視し、感染症や食中毒等の感染拡大を防止していきたい。また、今シーズンは GII.2 の流行についても注目されている。本県も、それらを含めた調査を引き続き実施する予定である。

1) 新規遺伝子型ノロウイルス GII.P17-GII.17 の流行, IASR, 36, 175-178, 2015

2) 厚生労働省通知, ノロウイルスの検出法について, 平成 19 年 5 月 14 日食安監発第 0514004 号, <http://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/kanren/kanshi/031105-1.html>

3) Saitou N & Nei M., The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees, Mol Biol Evol 4,406-425, 1987

【環境保健研究センター案内図】



〒856-0026 長崎県大村市池田2丁目1306番地11
TEL 0957-48-7560 FAX 0957-48-7570
E-Mail : s09070@pref.nagasaki.lg.jp
URL : <http://www.pref.nagasaki.jp/section/kankyoc>

■業務時間

9:00～17:45 ※休業日/土・日・祝日 年末年始(12月29日～1月3日)

■アクセス

長崎自動車道「大村IC」より車で3分

JR大村線大村駅からバスで約20分(1日朝夕2便)、タクシーで約10分

長崎空港からタクシーで約15分

編集委員

委員長	森 淳子	(企画環境研究部)	委員	國光 健一	(企画・環境科)
委員	本多 隆	(保健衛生研究部)	委員	田栗 利紹	(保健科)
委員	植野 康成	(地域環境科)	委員	山口 美津子	(総務課)
委員	本村 秀章	(生活化学科)			

長崎県環境保健研究センター所報(平成27年度業務概要・業績集)

平成29年11月 発行

編集・発行 長崎県環境保健研究センター