

調査研究

II 学会・学術誌発表等

学会等発表

高齢者福祉施設で発生した *Salmonella* Nagoya を原因とする食中毒事例

北橋智子、篠田亮子、鈴木信一、東尾裕江、大木旬子
三枝真奈美、都竹豊茂（環境保健研究所）

平成 28 年度（第 29 回）地研全国協議会関東甲信静支部
細菌研究部会

要旨：市内の高齢者福祉施設において、*Salmonella* Nagoya を原因とする集団食中毒が発生したので、その概要を報告する。

2016 年 4 月 14 日、施設から保健所へ入所者の複数名が下痢等の症状を呈しているとの届出があり、その後順次搬入された患者便 7 検体、食品従事者便 5 検体、食材 66 検体（調理済み食品 61 検体、原材料 5 検体）、施設ふきとり 5 検体及び医療機関から分与された菌株 1 検体を検査対象とした。

糞便検体は、選択培地に塗抹・培養後、確認培養、血清型別を実施した。食材及び施設ふきとり検体は、一次増菌培養後、増菌液から Loop-Mediated Isothermal Amplification（以下、LAMP）法を用いたスクリーニングを実施し、陽性となった検体について二次増菌培養を行い、増菌液を選択培地に塗抹し、以降糞便検体と同様の方法で検査を実施した。分離菌株及び分与菌株は、国立感染症研究所の方法に従いパルスフィールド・ゲル電気泳動（PFGE）を実施した。

検査の結果、患者便 7 検体、調理済み食品 1 検体（盛り合わせサラダ）から *Salmonella* Nagoya（6,8:b,1,5）が分離され、PFGE による解析では全てが同じバンドパターンを示した。

本事例では、PFGE において同じバンドパターンを示したことから、4 月 10 日の夕食として提供された『盛り合わせサラダ』を原因とする集団食中毒と考えられた。

原因となった個別食材を特定するため、保存されていた原材料 5 検体について後日検査を実施したところ、結果は全て陰性であった。このことから二次汚染による可能性も示唆されたが、汚染源の特定には至らなかった。

学会等発表

パンソルビン・トラップ法による食品からのノロウイルス検出事例

西川和佳子、山崎恵美、坂本美砂子、三枝真奈美
都竹豊茂、山本一重（環境保健研究所）

平成 28 年度（第 31 回）地研全国協議会関東甲信静支部
ウイルス研究部会

要旨：一般食品からのウイルス濃縮法であるパンソルビン・トラップ法（以下、パントラ法）により一部の食品からノロウイルス（以下、NV）を検出した。平成 25 年度から平成 27 年度までに保健所から搬入された食中毒（疑い）事例の食品 83 検体（6 事例）を検査材料とした。パントラ法は、厚生労働省通知に基づいて行い、RNA 抽出後、ウイルス特異的プライマーを用いた逆転写反応により cDNA を作成した。Conventional PCR による予備増幅の後、Nested real-time PCR を実施し、NV 遺伝子が検出された検体は、2nd PCR を行い、シーケンス解析により遺伝子型を決定した。その結果、4 事例 9 検体の食品から NV が検出された。事例 1 では、患者便、従事者便及び検食から同一の遺伝子型の NV が検出されたことから食中毒と決定し、パントラ法の有用性が示唆された。事例 2 及び事例 3 では、患者便とは異なる遺伝子型が検出され、関連性を特定するには至らなかったが、普段から食品に NV が付着するような状況下で食品が扱われている可能性が考えられた。また、事例 2 及び事例 4 については、各々 3～6 ヶ月以前に市内で発生した別事例と塩基配列が 100% 一致したことから、市内で流行している NV が食品の汚染に関与していることが示唆された。パントラ法は微量の遺伝子を効率的に増幅させることができる一方、実験室内汚染の恐れもあり、より一層の汚染防止策を講じる必要があることから、キャリーオーバー防止を見込んだ PCR 反応系を検討したい。また、パントラ法は日常業務に取り入れることを前提に設計されたものであるが、実際の食中毒事例で食品検体が多数搬入されると作業時間が増加し、限られた時間で結果を出すことが困難な場合がある。遺伝子検出工程について、通常の real-time PCR を検討し、検査時間の短縮に努めたい。

学会等発表

牛乳及び生乳のアフラトキシン M1 試験法の妥当性 確認について

石川永祐、高梨嘉光、三枝真奈美、都竹豊茂、山本一重
(環境保健研究所)

平成 28 年度 (第 55 回) 千葉県公衆衛生学会

要旨:「乳に含まれるアフラトキシン M1 の取扱いについて」平成 27 年 7 月 23 日付け食安発 0723 第 1 号により、 $0.5\mu\text{g}/\text{kg}$ を超えて検出する乳は食品衛生法第 6 条 2 号に違反するものとして取り扱われることとなった。当所でも行政検査に対応する必要が生じたことから、試験法導入のため、牛乳及び生乳についてアフラトキシン M1 試験法の妥当性評価を実施するとともに、市内に流通する牛乳の現段階での汚染状況を調査した。

試験法は平成 27 年 7 月 23 日付け食安発 0723 第 5 号「乳に含まれるアフラトキシン M1 の試験法について」に従い、妥当性評価の方法は平成 23 年 8 月 16 日付け食安発 0816 第 2 号「総アフラトキシンの試験法について」を基に、検査員 1 人、2 併行、5 日間で行った。選択性を確認した牛乳及び生乳のブランク試料に濃度が $0.5\mu\text{g}/\text{kg}$ となるようアフラトキシン M1 を添加し、真度・併行精度・室内精度を求め、それぞれの目標値(真度 70~110%、併行精度 $\leq 20\%$ 、室内精度 $\leq 30\%$) を満たすか否かを確認した。

妥当性評価の結果、真度が牛乳 95%・生乳 95%、併行精度が牛乳 2.6%・生乳 2.0%、室内精度が牛乳 3.4%・生乳 2.3%であり、全てのパラメータで目標値を満たしたことから、本試験法の妥当性が確認できた。

また、本試験法により市内に流通する牛乳 16 検体のアフラトキシン M1 の含有量調査を行ったところ、全ての牛乳で定量下限値である $0.05\mu\text{g}/\text{kg}$ 未満であることが明らかとなった。

学会等発表

1,4-ジオキサン及び VOCs 等の分析条件の検討

鈴木瑞穂、坂元宏成、設楽夕莉菜、五木田正
(環境保健研究所)

平成 28 年度全国環境研協議会関東甲信静支部
水質専門部会

要旨: 1,4-ジオキサンは近年環境基準値が設定されるなど、分析の機会が増えている状況にあるが、水との親和性が高く、HS-GC/MS 法では他の VOCs と比べ低感度である。しかし、特定の塩析剤を用いることで感度が向上することが報告されていることから、1,4-ジオキサン及び VOCs の同時分析について検討した結果、塩析剤として炭酸カリウム及び硫酸ナトリウムを用いることで 1,4-ジオキサンの感度を向上させることができた。

特に 1,4-ジオキサンの感度が向上した炭酸カリウムを用い市内 6 河川 17 地点において 1,4-ジオキサン濃度の測定を行ったところ、すべての地点で 1,4-ジオキサンが検出されたものの、環境基準値 ($50\mu\text{g}/\text{L}$) の 10 分の 1 未満であった。また、他都市の河川と比較してやや高濃度の地点が点在しており、一定レベルの汚染が確認された。

要監視項目等の VOCs 及びカビ臭物質についても塩析剤を変更することで感度を向上させられるか確認を行ったところ、塩析剤として塩化ナトリウムを使用した場合と比べると、VOCs では塩化カルシウム、炭酸カリウム及び硫酸ナトリウムでピーク面積が 1.3 倍程度、カビ臭物質では塩化カルシウム、炭酸カリウム、炭酸ナトリウム及び硫酸ナトリウムでピーク面積が 1.5 倍程度増加した。

学会等発表

オゾンスクラバーとして BPE を用いた環境大気中 アルデヒド類サンプリングについての検討

岡本誓志、坂元宏成
(環境保健研究所)

平成 28 年度全国環境研協議会関東甲信静支部
大気専門部会

第 43 回環境保全・公害防止研究発表会

要旨：大気中のホルムアルデヒド及びアセトアルデヒドの測定については、千葉市では有害大気汚染物質測定方法マニュアルに従い、ヨウ化カリウム（以下 KI）をオゾンスクラバーとして、DNPH カートリッジで捕集する固相捕集－高速液体クロマトグラフ法を用いている。

KI をオゾンスクラバーとして用いた場合、高湿度下で捕集すると KI がカートリッジ内で溶けて目詰まりを起こす等の問題があるため、オゾンスクラバー周辺を加温しなければならず、加温器及び電源が必要となる。

一方、trans-1,2-bis(4-pyridyl)ethylene(以下 BPE)もオゾンスクラバーとして用いることができるが、これは高湿度時にも溶けず、加温が不要である。

そこで今回、大気中のアルデヒド類について、市販の BPE-DNPH カートリッジを用いた方法と、KI をオゾンスクラバーとして用いた従来法とで、同時・同地点で捕集・測定し、比較検討を行なった。

その結果、従来法で KI を加温しないと、ほとんどアルデヒド類が検出されない場合もあったが、その際も BPE カートリッジを用いることで、ある程度の量を捕集することができ、BPE がオゾンスクラバーとして機能することを確認できた。しかし、従来法で KI を加温した場合と比べるとその分析値は低濃度であった。この一因としてカートリッジの破過が考えられたため、今後捕集条件の最適化を行なう必要があると考えられた。

学術誌発表

uidA と *stx1/stx2* を指標とした腸管出血性大腸菌の比率予測

北橋智子¹、吉原純子²、島村亮子¹、大木旬子¹
(¹環境保健研究所、²千葉市保健所)

日本臨床微生物学雑誌：26(4)，304-310，2016

要旨：腸管出血性大腸菌（以下 EHEC）の中には選択分離培地が利用できない血清型がある。あらかじめ糞便中の大腸菌に占める EHEC の割合が判明していれば、DHL 平板からどの程度のコロニー数を釣菌することにより EHEC が検出できるかの推測が可能である。そこで、リアルタイム PCR において、大腸菌の指標として広く用いられる *uidA* (β-グルクロニダーゼ遺伝子) と EHEC の病原因子である *stx1/stx2* (志賀毒素遺伝子) の Ct 値の差を比較することにより、EHEC の割合を推定することが可能であるか否かを検討した。なお、リアルタイム PCR は厚生労働省の通知法に従い、*uidA* は当所で設計したプライマー及びプローブを使用した。

既知量の EHEC 標準株及び *Escherichia coli* 株を混合し、リアルタイム PCR を利用し、大腸菌が保有する *uidA* に対する *stx1/2* の割合 (Ct 値の差) を調べたところ、実測値と近似であった。患者糞便で確認したところ、コロニーの釣菌の予測に利用できる結果が得られ、選択培地を利用できない稀な O 抗原型の腸管出血性大腸菌の効率的な分離に利用可能であると考えられた。

また、無症状の EHEC O146 患者 1 名及び軽症の EHEC O157 患者 1 名について、無治療で陰性化するまで *stx1/stx2*-Ct と *uidA*-Ct の差について経日的推移を調べたところ、EHEC O146 患者は日数の経過とともに Ct 値の差が大きくなって陰性化した。一方、EHEC O157 患者は Ct 値の差が増減しながら陰性化した。

学術誌発表

2016 年 9～11 月のノロウイルス感染集団発生事例について — 千葉市

坂本美砂子、山崎恵美、西川和佳子、三枝真奈美
都竹豊茂、山本一重（環境保健研究所）

掲載誌：病原微生物検出情報月報
Vol.38, 18-19, 2017

要旨：千葉市では 2016 年 9～11 月にノロウイルス (NoV) GII.2 による感染性胃腸炎の集団発生事例が多発したので、その概要について報告する。2016 年 9～11 月、千葉市で発生したヒト-ヒト伝播 (疑い) による感染性胃腸炎の集団発生は 22 事例であり、例年の同時期に比較し、本疾患の集団感染が多発している (過去 3 シーズンは各 1 事例)。22 事例の月別発生状況は、9 月に 2 事例、10 月に 5 事例、11 月に 15 事例であり、症状は嘔吐、下痢が主体であった。発生場所は保育所が最も多く 16 事例、次いで小学校 5 事例、老人施設 1 事例であった。これらの施設は千葉市内全 6 区にわたり、各区 2～6 事例発生しており、時期的な偏りはなかった。

原因究明のため、各事例の発症者 2～5 名について、リアルタイム RT-PCR 法によるウイルス遺伝子検査を実施したところ、全ての事例から NoVGII が検出された。さらに、NoVGII が検出された検体のうち各事例 1～2 検体について、PCR 産物をダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定し、近隣結合法による系統樹解析を実施した。その結果、NoV の遺伝子型は 21 事例が GII.2、保育所 1 事例が GII.3 であった。21 事例の GII.2 の解析部位の塩基配列は類似しており、99.2～100% 一致した。このことから、今回の感染性胃腸炎の集団発生の増加は、保育所を中心とした GII.2 の流行によることが判明した。

NoV 感染集団発生は、例年、12 月頃にピークを迎える。今回の GII.2 株はその前に短期間で保育所間に感染が広がり集団発生が多発したことから、本格的な流行時期に入ってからのさらなる感染拡大が懸念される。