

調査研究

Ⅱ 学会・学術誌発表等

学会等発表

クドア属粘液胞子虫の遺伝子配列による種同定について (*Kudoa hexapunctata* が原因と疑われた有症事例について)

大木旬子、北橋智子、鈴木信一、東尾裕江、篠田亮子、三枝真奈美、横井 一、山本一重（環境保健研究所）

平成 29 年度（第 56 回）千葉県公衆衛生学会

要旨：本市内で開催された宴会において、食中毒が疑われる事例が発生した。患者の喫食状況及び症状等から、原因としてクドア属粘液胞子虫が疑われた。患者便 9 検体についてリアルタイム PCR による検査を行った結果、*Kudoa septempunctata* は全て陰性であったが、患者便 2 検体でクドア属粘液胞子虫が陽性となった。また、保存されていた刺身 4 検体について同様に検査を実施したところ、*K. septempunctata* は全て陰性であったが、刺身 1 検体（メジマグロ）でクドア属粘液胞子虫が陽性（ 9.4×10^7 コピー/g）となり、鏡検により 6 極嚢を有するクドア属胞子が確認された。メジマグロから抽出した DNA について 28S rDNA のうち約 900bp をシーケンス解析した結果、メジマグロに寄生していたクドア属粘液胞子虫は *K. hexapunctata* であることが明らかとなった。なお、陽性を示した患者便 2 検体に関しては、Ct 値が 38.4、37.5 と高く、コンベンショナル PCR でも遺伝子の増幅が認められなかったことから、シーケンス解析に至らなかった。

ヒトに食中毒症状を起こす 6 極嚢のクドア属粘液胞子虫として、*K. hexapunctata* 及び *K. neothunni* が報告されているが、その同定には 28S rDNA のうち約 3,250bp のシーケンス解析が用いられている。この領域の 5'側に塩基配列の違いが集中しているため、5'側領域を含めた約 900bp の解析でも同定が可能であった。また、当該塩基配列は遺伝子バンクの登録数が多いことから、より多くのクドア属粘液胞子虫の配列解析が可能である。

以上のことから、28S rDNA における 5'側領域を含めた約 900bp のシーケンス解析は、約 3,250bp の解析に比べ、経費と時間の削減を可能とし、迅速な種同定が可能であることから、クドア属粘液胞子虫を疑う有症苦情事例の行政検査に有用であることが示唆された。

学会等発表

マイナーな血清群の腸管出血性大腸菌が分離同定された事例

北橋智子、鈴木信一、篠田亮子、東尾裕江、大木旬子、三枝真奈美、横井 一、山本一重（環境保健研究所）

平成 29 年度（第 30 回）地研全国協議会関東甲信静支部細菌研究部会

要旨：マイナーな血清群（O113、O156 及び O55）の腸管出血性大腸菌（EHEC）を分離同定した事例を経験した。事例 1 では、クロモアガーSTEC の選択性の強さを利用し、EHEC に特徴的な藤色のコロニーを形成したことにより、牛肉から EHEC O113 を分離同定することができた。事例 2 では、検体の増菌培養液 0.1mL をクロモアガーSTEC にコンラージしたことにより、EHEC が培地上に藤色のコロニーを形成したこと及びコロニーのスクリーニングとして VT 遺伝子の検出を優先させたことにより、EHEC O156 を分離同定することができた。このことから、マイナーな血清群の EHEC がクロモアガーSTEC に発育し、且つクロモアガーSTEC が増菌培養液中に存在する夾雑細菌の発育を抑制する場合は、クロモアガーSTEC にエーゼの 10 倍量の増菌液を塗抹することにより、目的の EHEC を分離同定できる可能性が高まるものと考えられた。事例 3 では、分離過程の EHEC が CT-SMAC に発育したこと及び生菌が EHEC O157 血清と交差反応を示したことにより、EHEC O55 を分離同定することができた。なお、分離過程の EHEC O55 は、CT-SMAC に白色コロニーを形成したものの、分離後の EHEC O55 は、CT-SMAC に殆ど発育せず、時間の経過とともに極小の赤色コロニーとして僅かに発育したことから、分離培養の過程で EHEC O55 の性状が変化したことが示唆された。

マイナーな血清群の EHEC については、増菌液の VT 遺伝子が陽性であっても、菌株として分離同定できないことがある。免疫磁気ビーズ法及び生菌の試し凝集試験によって、主要な血清群（O26、O103、O111、O121、O145 及び O157）の分離が出来ない場合は、クロモアガーSTEC に発育した藤色コロニーの VT 遺伝子を迅速にスクリーニングできる LAMP 法が有効であった。

学会等発表

千葉市におけるヒトライノウイルス検出状況

西川和佳子、佐藤典子、坂本美砂子、三枝真奈美
横井一、山本一重（環境保健研究所）

平成 29 年度（第 32 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：ヒトライノウイルス（HRV）の地域的な流行状況を把握することを目的に 4 年間の HRV 検出状況を解析した。2013 年 1 月から 2016 年 12 月までの期間に、市内小児科定点の急性呼吸器患者の鼻汁等 1,254 検体を検査材料とした。検索ウイルスは HRV の他、エンテロウイルス、ヒトメタニューモウイルス（hMPV）、ヒトコロナウイルス、RS ウイルス（RSV）、パラインフルエンザウイルス 1～3 型、ヒトボカウイルス（HBoV）、アデノウイルス及びインフルエンザウイルスとした。

検索を実施した 1,254 検体のうち、317 検体（25.3%）から HRV が検出された。HRV 全体の検出率は各年 20% 台であったが、遺伝子群間では各年で HRV-A は 44.3～64.1%、HRV-C は 34.6～52.3%と検出率に差がみられた。HRV は春季または秋季を主体とした流行があることが示唆されたが、2016 年は季節的な検出ピークが認められず通年横ばいで、他年とは異なる傾向を示したことから、今後の発生動向を注視する必要があると考えられた。HRV が検出された患者の年齢は 0 歳～2 歳が全年齢の 92.1%を占めた。その中でも 1 歳が最多で、次いで 0 歳からの検出が多く、各遺伝子群及び各年においても同様の傾向が認められた。臨床診断名では下気道炎が 76.0%と最も多く、さらに、検出された HRV の 58.6%が他のウイルスとの共検出例であった。共検出されたウイルスのうち HBoV が最も多く、次いで RSV、hMPV の順であった。しかし、これらのウイルスは HRV と同様に下気道炎の症状を呈する割合が高く、どのウイルスに起因して下気道炎を発症したか推察するためには、ウイルス量、発症から検体採取までの日数、さらには抗体価などを考慮した急性呼吸器ウイルスのサーベイランスを実施することが重要であると考えられた。

学会等発表

清涼飲料水に関する試験法の改良と妥当性確認について

石川永祐、上村勝、大竹正芳、三枝真奈美、横井一、
山本一重（環境保健研究所）

平成 29 年度（第 56 回）千葉県公衆衛生学会

要旨：当所における清涼飲料水中のヒ素、鉛、スズに関する試験法について、試料の分解操作には、マイクロウェーブ分解装置を使用している。この方法は、ケルダールフラスコ湿式分解に比べ簡便で前処理時間の短縮が可能であるが、清涼飲料水の多くが設定した条件で十分に分解できず、分解できる試料は糖類やタンパク質などの含有物が少ない茶系飲料のみであった。

そこで、試験法の適用範囲を広げるため、茶系飲料以外の清涼飲料水を分解できる新たな条件の検討を行った。また、改良した試験法を導入するために妥当性評価を実施し、真度・併行精度・室内精度の各パラメータが、あらかじめ設定した目標値（真度 80～110%（スズは 90～110%）・併行精度<10%・室内精度<15%）を満たすか否かを確認した。

条件の検討では、炭酸飲料・果実飲料・コーヒー飲料・茶系飲料・野菜飲料・スポーツ飲料・乳性飲料の 7 種類を試料とし、マイクロウェーブ分解の最高温度を従来の 150℃から 10℃ずつ上昇させた。各温度における各試料の分解の程度を観察したところ、200℃の場合に 7 種類全てを十分に分解できることが明らかとなった。また、硝酸添加量を従来の 5mL から 4mL に減らしても同様に分解可能であったことから、検体 2g に対し、硝酸 4mL、水 4mL を添加することとした。

改良した試験法により試料 7 種類の妥当性評価を行ったところ、ヒ素が真度 91～95%・併行精度 2.1～3.7%・室内精度 2.4～4.6%、鉛が真度 96～99%・併行精度 0.5～0.9%・室内精度 2.1～3.4%、スズが真度 97～99%・併行精度 1.3～2.2%・室内精度 2.7～4.2%であり、全てのパラメータが目標値を満たしたことから、糖類やタンパク質などの含有物が多い、茶系飲料以外の清涼飲料水に対しても、本試験法を適用することが可能となった。

学会等発表

1,4-ジオキサン分析方法に関する検討

設楽夕莉菜、鈴木瑞穂、坂元宏成、五木田正
(環境保健研究所)

平成 29 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-ジオキサンは人や生態系に有害な影響を及ぼすおそれがあることから、「人の健康の保護に関する水質環境基準項目」および「地下水の水質汚濁に係る環境基準項目」に追加された。そのため分析頻度の高い状況であるが、当該物質は水との親和性が高く、他の VOCs に比べるとヘッドスペース-GC/MS 法（以下、HS-GC/MS 法と記す。）では低感度である。しかし、本研究所において、これまで HS-GC/MS 法による 1,4-ジオキサン分析方法について検討した結果、塩析剤に炭酸カリウムを用いることで感度を向上させることができた。そこで、本方法の妥当性を評価するため、本方法と公定法である固相抽出-GC/MS 法（以下、固相抽出法と記す。）とで分析を実施し、両者の結果について比較・検討を行った。

はじめに、環境水を用いて HS-GC/MS 法および固相抽出法で添加回収試験を行った。どちらも $0.2 \mu\text{g/L}$ の濃度になるように 1,4-ジオキサン標準液を添加した。回収率はそれぞれ 98%、89%、変動係数も 2.8%、3.4%と、両者とも良好な結果を得ることができた。

また、両方法を用いて市内 4 河川 8 地点において 1,4-ジオキサンの分析を行った結果、両者の分析値は R^2 値が 0.999 以上と非常に強い相関が見られ、回帰直線の傾きは 1.07 とほぼ同程度であることが確認できた。

このことから、塩析剤に炭酸カリウムを用いることで、HS-GC/MS 法により、河川中の 1,4-ジオキサンを簡便に分析できることがわかった。

学術誌発表

カルバペネム耐性腸内細菌科細菌（carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* : CRE）による院内感染事例について

北橋智子、篠田亮子、鈴木信一、大木旬子、元吉まさ子、都竹豊茂、山本一重（環境保健研究所）
飯島善信、早川克実、舘岡恭子、大山照雄、大塚正毅、山口淳一（千葉市保健所）

病原微生物検出情報月報 Vol.38, 229-230, 2017

要旨：本市内の医療機関においてカルバペネム耐性腸内細菌科細菌（CRE）の院内感染が発生し、分離菌株の遺伝学的解析を行った。2014 年 2 月から 2015 年 12 月に 25 人の患者から分離された *Enterobacter cloacae* 30 株を解析対象とした（患者 5 人については 2 株ずつ）。30 株のうち、22 株においてメルカプト酢酸ナトリウム（SMA）による阻害を利用したメタロ- β -ラクタマーゼ（MBL）産生スクリーニング試験で陽性となり、PCR 法による IMP-1 型 MBL 遺伝子の検出結果と一致した。残り 8 株の MBL 産生スクリーニング試験は陰性、カルバペネマーゼ遺伝子も陰性であった。これら 8 株のうち 7 株は、ボロン酸による阻害を利用した AmpC β -ラクタマーゼ産生スクリーニング試験で陽性であったことから、AmpC β -ラクタマーゼ産生の可能性が考えられた。

PFGE（制限酵素 *Spe I*）の結果、18 株が 3 つのクラスター（I・II・III）を形成し、いずれも IMP-1 型 MBL 遺伝子陽性株であった。クラスター I に属する株は 22 カ月にわたって分離された。クラスター III に属する株が分離された患者 2 名から、後日、クラスター I に属する株も分離された。さらに、IMP-1 型 MBL 遺伝子の保有株が各クラスターで認められたことから、IMP-1 型 MBL 遺伝子を保有するプラスミドの水平伝達が、同じ *E. cloacae* 間で起こった可能性が考えられた。一方、クラスター（I・II・III）に属さない 12 株のうち 8 株は、IMP-1 型 MBL 遺伝子陰性の株であった。*E. cloacae* 30 株は、10 の病棟（ICU 及び A 病棟～I 病棟）の入院患者から分離されたが、クラスターを形成した株は、ICU、B 病棟、G 病棟入院患者分離株に集中しており、これら 3 病棟を中心に複数の CRE 株が拡がったものと考えられた。

