

他紙発表論文(所員が First Author)

愛媛県における結核の発生動向および分離結核菌株の反復配列多型(VNTR)法を用いた分子疫学解析について

愛媛県立衛生環境研究所

仙波敬子, 木村千鶴子, 大塚有加, 山下まゆみ
山下育孝, 菅 美樹, 溝田文美, 服部昌志
大倉敏裕, 四宮博人

結核は現在でも世界最大の感染症の一つである。日本は結核の中蔓延国であり、2013年の人口10万人あたりの新規登録患者の罹患率は16.1であった。愛媛県は2010年には罹患率19.3で全国値(18.2)を上回った。結核を制御するためには、結核菌の遺伝子型別に基づく分子疫学解析を実施し、薬剤耐性菌など特定の菌株の流行を把握し、結核菌の伝播経路や拡散性を究明することが必要である。近年、結核菌ゲノム上に点在する繰り返し単位の縦列反復配列多型(Variable Numbers of Tandem Repeats: VNTR)に基づく遺伝子型別法が分子疫学解析に用いられるようになった。本研究において、愛媛県内で分離された結核菌98株を対象に、Japan Anti-Tuberculosis Association (JATA) (15)-VNTRおよびHypervariable (HV)-VNTR解析を実施した。このJATA(15)-VNTR解析の結果、それぞれ2株の菌株を含む13組のクラスターが見出された(クラスター形成率26.5%)。このうち2組については、疫学調査から患者間の接触関係が判明しており、同一菌株による感染が示唆された。さらに、分離株の遺伝子系統解析を実施すると、北京型が78.6%(77/98)、非北京型が21.4%(21/98)で、北京型の内訳は、Ancient型が81.8%(63/77)、Modern型が18.2%(14/77)であった。これらの割合は全国的傾向と一致した。これらの分子疫学情報は、実地疫学調査と相まって、科学的根拠に基づくより効果的な結核対策に非常に有用と考えられる。

四国公衆衛生学会雑誌 60No.1 67-75(2014)

(著書)

愛媛県立衛生環境研究所 山下育孝
食品衛生検査指針2015(微生物編) 第4章各論2ウイルス検出・解析法「(1)電子顕微鏡検査」日本食品衛生協会 2015.3.31 P622-627

(著書につき抄録なし)

(所員が First Author 以外)

西日本におけるノロウイルスの分子疫学

山口県環境保健センター

調 恒明, 岡本(中川)玲子, 村田祥子, 戸田昌一
大阪府立公衆衛生研究所 左近直美, 上林大起
広島県立総合技術研究所保健環境センター

重本直樹, 福田伸治, 久常有里
谷澤由枝, 高尾信一

愛媛県立衛生環境研究所

青木里美, 山下育孝, 四宮博人

福岡県保健環境研究所

芦塚由紀, 吉富秀亮, 千々和勝己

ノロウイルスは、高齢者福祉施設、医療機関、学校、保育園・幼稚園における感染性胃腸炎の集団発生の主要な原因となっている。ノロウイルスの流行もインフルエンザウイルスと同様に、パンデミックと呼んでもおかしくない世界的な大流行を引き起こすことが明らかとなっており、その原因となる可能性のあるウイルスの抗原性や病原性の変化を解析することが重要と思われる。本稿では、N/S領域の配列情報について、大阪府立公衆衛生研究所(10例以上の集団発生)、広島県立総合技術研究所保健環境センター(食中毒、集団発生および散发事例)、山口県環境保健センター(食中毒および集団発生)、愛媛県立衛生環境研究所(食中毒、集団発生および散发事例)、福岡県保健環境研究所(食中毒事例)において検出されたGIIノロウイルスの遺伝子型についてまとめた。

病原微生物検出情報月報 Vol 35.7,196-170 (2014)

Sensitive and Specific PCR Systems for Detection of Both Chinese and Japanese Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Virus Strains and Prediction of Patient Survival Based on Viral Load

Yoshikawa T, Fukushi S, Tani H, Fukuma A, Taniguchi S, Toda S, Shimazu Y, Yano K, Morimitsu T, Ando K, Yoshikawa A, Kan M, Kato N, Motoya T, Kuzuguchi T, Nishino Y, Osako N, Yumisashi T, Kida K, Suzuki F, Takimoto H, Kitamoto H, Maeda K, Takahashi T, Yamagishi T, Oishi K, Morikawa S, Saijo M, Shimojima M

Severe fever with thrombocytopenia syndrome (SFTS) is an emerging infectious disease with a high case fatality risk and is caused by the SFTS virus (SFTSV). A retrospective study conducted after the first identification of an SFTS patient in Japan revealed that SFTS is endemic to the region, and the virus exists indigenously in Japan. Since the nucleotide sequence of Japanese SFTSV strains contains considerable differences compared with that of Chinese strains, there is an urgent need to establish a sensitive and specific method capable of detecting the Chinese and Japanese strains of SFTSV. A conventional one-step reverse transcription-PCR (RT-PCR) (cvPCR) method and a quantitative one-step RT-PCR (qPCR) method were developed to detect the SFTSV genome. Both cvPCR and qPCR detected a Chinese SFTSV strain. Forty-one of 108 Japanese patients suspected of having SFTS showed a positive reaction by cvPCR. The results from the samples of 108 Japanese patients determined by the qPCR method were in almost complete agreement with those determined by cvPCR. The analyses of the viral copy number level in the patient blood samples at the acute phase determined by qPCR in association with the patient outcome confirmed that the SFTSV RNA load in the blood of the nonsurviving patients was significantly higher than that of the surviving patients. Therefore, the cvPCR and qPCR methods developed in this study can provide a powerful means for diagnosing SFTS. In addition, the detection of the SFTSV genome level by qPCR in the blood of the patients at the acute phase may serve as an indicator to predict the outcome of SFTS.

Journal of Clinical Microbiology
Sep;52(9):3325-33(2014)

重症熱性血小板減少症候群の 5 症例

愛媛県立中央病院検査部 1) 同病理診断部 2)
愛媛県立衛生環境研究所 3)
武田志穂 1) 越智美智 1) 星衛雄樹 1)
加藤真紀子 1) 川本光江 1) 森いづみ 1)
前田智治 2) 菅 美樹 3) 山下育孝 3)
四宮博人 3)

重症熱性血小板減少症候群 Severe Fever with

Thrombocytopenia Syndrome(SFTS)は2011年に初めて中国の研究者により報告され、SFTS ウイルス(SFTSV)による新興感染症である。臨床的特徴には38℃以上の発熱、消化器症状、血小板数・白血球数の減少、AST・ALT・LDHの上昇などがある¹⁾。平成25年3月4日に感染症法による四類感染症に指定されており、血液検体からSFTSV 遺伝子が検出されると、届出を行う必要がある。平成26年9月10日時点で、国内SFTS患者は101例、愛媛県内では19例が報告されている。今回、我々は当院にSFTS疑いで紹介された患者の臨床データについて検討したので報告する。対象は、平成25年5月から平成26年9月までにSFTS疑いで紹介された患者、男性2名、女性3名、平均年齢74.6歳である。5症例の検討により、フローサイトメトリによる細胞表面CD4およびCD4陽性Tリンパ球が重症度と一致する可能性が示唆された。また、高齢、意識レベルの低下、LDH及びCKの増加が致死と有意に関連している可能性も示唆された。ヒトからヒトへの感染も報告されていることから、患者血液・体液からの感染に対して接触予防策を行うなど、院内感染に注意する必要があると考えられた。

愛媛県臨床検査技師会誌 Vol.34 55-61(2015)

学会発表(所員が[†] First Author)

四国および愛媛県におけるSFTSの現況と対策

愛媛県立衛生環境研究所

○四宮博人, 山下育孝, 菅 美樹, 溝田文美, 大塚有加
山下まゆみ, 服部昌志

重症熱性血小板減少症候群(SFTS)は、マダニ媒介性の新興感染症で、現在(2014年5月26日)までに、全国で61人の患者(うち25人が死亡)が確認され、四国では16人の患者(うち7人が死亡)が確認されている。愛媛県では10人(うち4人死亡)の患者が確認され、都道府県別では2番目に多い。当研究所では昨年3月に検査体制を確立し、これまでにSFTS疑い患者28人から採取した検体の遺伝子検査を実施した。SFTSV陽性群と陰性群を比較すると、患者年齢が陽性群でより高齢で、白血球数減少もより高度であった。患者のほとんどは血球貪食症候群の所見を示し、ウイルスの病原性に加えてサイトカインストーム等の宿主側の過剰な反応が全身性の炎症性病態形成に関与することが示唆され

た。患者検体の SFTSV 特異的な PCR 産物の塩基配列 (NP 領域) を解析すると、愛媛県内の株は中国での分離株とは独立しており、もともと日本に存在していたウイルスと考えられる。

愛媛県内のマダニの SFTSV 保有率調査および野生動物や飼い犬の抗 SFTSV 抗体陽性率調査を実施し、いずれも患者発生地域では全国平均よりも高い傾向が認められた。

SFTS 対策として、医療従事者、保健所感染症担当者、地域住民等を対象に研修会を開催し、マダニからの感染防御を中心に研修指導を実施した。また、患者の主治医および病理解剖を実施した病理医と共同して SFTS 症例検討会を開催し、SFTS の病態や治療法について意見交換し、医療機関等との連携を深めた。これらについて報告するとともに、今後の課題や対策についても考察する。

衛生微生物協議会第 35 回研究会
(2014.6 東京)

Salmonella enterica serovar 4:i:- 株の次世代シーケンサーによるゲノム解析

愛媛県立衛生環境研究所

○四宮博人, 烏谷竜哉, 仙波敬子
国立感染症研究所 関塚剛史, 山下明史, 黒田 誠
山口県環境保健センター 野村恭晴, 調 恒明
愛媛大学附属病院 宮本 仁志

サルモネラ属菌はヒトの急性胃腸炎・食中毒の重要な原因菌であり、数多くの血清型が存在する。ヒト感染症のほとんどは *Salmonella enterica* によるもので、このうち、非チフス性サルモネラによる感染症患者が世界中で年間 1 億人近く発生している。近年、O4 (リポ多糖) 抗原を発現し、H (鞭毛) 抗原の第 2 相を発現しない S. 4:i:- 株が、非チフス性サルモネラ感染症の主要な原因菌として注目されている。今回、愛媛で分離された S. 4:i:- 株のゲノム、および多剤耐性プラスミドを次世代シーケンサー (NGS) により解析したので報告する。

NGS ゲノム解析に基づく系統解析を実施し、これまで世界中で分離された S. 4:i:- のうち、全ゲノム解析が実施された CVM23701 株と比較すると、愛媛株はゲノタイプが異なっていた。第 2 相 H 抗原の発現に関連する遺伝子領域を解析すると、愛媛株の遺伝子欠失パターンは CVM23701 とは異なっていた。

愛媛株の多剤耐性プラスミドは不和合性群 Inc A/C replicon で、220 個の ORFs 含み、そのうち約 100 個は既知の遺伝子であった。このなかには、CTX-M-55 を含む多くの薬剤耐性遺伝子のほか、遺伝子の接合伝達に関わる遺伝子も多く存在した。

これらの結果は、NGS ゲノム解析がサルモネラ属菌の高精度同定や分子疫学解析において極めて有用であり、感染症対策に重要な分子基盤を提供しうることを示している。

第 67 回日本細菌学会中国四国支部総会
(2014.10 徳島)

愛媛県内におけるサルモネラ感染症の発生動向と分子疫学解析

愛媛県立衛生環境研究所

○仙波敬子, 浅野由紀子, 烏谷竜哉, 松本純子
林 恵子, 青木紀子, 木村千鶴子, 四宮博人

サルモネラ属菌による感染症患者が世界中で年間 1 億人近く発生している。愛媛県の同菌感染症の健康被害発生防止策構築に資する知見を得るため、県内の 3 医療機関および 2 検査センターの協力のもと、発生動向を調査するとともに、患者、食材、家畜 (豚)、爬虫類由来分離株 262 株の血清型別及び薬剤感受性試験を実施し、菌株の特徴と薬剤耐性状況を明らかにした。

患者由来株の 22.0%、食材由来株の 97.9%、家畜由来株の 52.1%、爬虫類由来株の 8.0% がいずれかの薬剤に耐性を示し、臨床株から ESBL (基質拡張型 β -ラクタマーゼ) 産生菌が分離された。S. *Infantis* では、食材由来株の全ての株が何らかの薬剤耐性を示した一方、家畜由来株は全て薬剤感受性であった。また、分離由来が異なる同一血清型の菌株、S. *Infantis* 70 株、S. *Typhimurium* 27 株、S. *Thompson* 9 株、S. *Schwarzengrund* 9 株、S. *Saintpaul* 8 株について分子疫学解析を実施した。

地域における感染源を把握し、的確な情報提供を行うことが、サルモネラ属菌による感染症の予防に重要である。今回の調査結果から、食材 (鳥肉) の適切な管理を周知徹底し、生食を控える助言を行うとともに、ペット (爬虫類) 等への接し方についての注意喚起が必要と考えられる。

第 5 回愛媛微生物ネットワークフォーラム
(2014.10 松山市)

サルモネラ 4,5,12:i:- 株のゲノム解析および多剤耐性の性状について

大倉敏裕, 四宮博人

愛媛県立衛生環境研究所

○四宮博人, 烏谷竜哉, 仙波敬子, 木村千鶴子
国立感染症研究所 関塚剛史, 山下明史, 黒田誠
山口県環境保健センター 調恒明, 野村恭晴
愛媛大学医学部附属病院 宮本仁志

In many countries, *Salmonella* 4,5,12:i:- is currently among the 5 to 10 most common serotypes associated with human infections. We analyzed the sequences of chromosomal and plasmid DNA of six *Salmonella* 4,5,12:i:- isolates from Japan, using next-generation DNA sequencing technologies. Single nucleotide polymorphisms (SNPs)-based genomic analysis revealed that these *S.* 4,5,12:i:- isolates represented monophasic variants of *S.* Typhimurium. One of the isolates (designated EHM21-304) carried a deletion of a DNA segment encoding 11 genes around the *fljAB* operon; this deletion differed from any previously reported variant in other 4,5,12:i:- strains. The multidrug resistant (MDR) plasmid (pSO4-21-304) from EHM21-304 was apparently composed of IncA/C and IncFII plasmid backbones. The IncA/C-related region carried *repA*, MDR genes (including *bla*TEM-1b, *floR*, *tetA*, *tetR*, *strB*, *strA*, *sul2*), and several conjugative transfer system-related (*tra*) genes; the IncFII-related region carried MDR genes (including *catA2*, *bla*CTX-M-55, *qnrS1* and *aac(3)-IIId*) and more than 30 *tra* genes. The above findings concluded that the *S.* 4,5,12:i:- isolate EHM21-304 lacked 11 chromosomal genes around the *fljAB* operon and harbored the MDR plasmid pSO4-21-304 which had a two-component chimeric structure apparently derived from IncA/C and IncFII plasmids.

第 88 回日本細菌学会総会
(2015.3 岐阜)

愛媛県における結核菌臨床分離株の Variable Number of Tandem Repeat(VNTR)法を用いた遺伝子型別

愛媛県立衛生環境研究所

○仙波敬子, 木村千鶴子, 服部昌志

結核は、現在でも公衆衛生上重要な感染症である。平成 25 年(2013)の全国の新登録結核患者数は、約 2 万人であり、罹患率(人口 10 万人対の新登録結核患者数)は 16.1 である。愛媛県においても罹患率 12.2 で、全国の罹患率よりは低いものの低蔓延の指標とされる罹患率 10 以下を達成していない。

愛媛県において平成 25 年 11 月から「結核菌の分子疫学調査(VNTR 解析)事業」として県内の結核患者から分離された菌株を VNTR 法による遺伝子型別検査を実施している。

現在までに、当所に搬入された 98 株の結核菌について VNTR 解析を実施した結果から疫学的な関連のある菌株がクラスターを形成していたことがわかった。

また、国内で分離される結核菌の約 8 割を占める北京型株について、当県における分離状況は北京型株 8 割(Ancient 型 8 割, Modern 型 2 割), 非北京株 2 割であった。

本県において、VNTR 等の遺伝子型別を実施し、次第にデータが蓄積されつつある。このことにより、結核感染事例に関して、よりきめ細かい分子疫学情報を公衆衛生行政の場に提供することが可能となった。これらの、分子疫学情報は、実地疫学調査と相まって、今後の地域の結核対策に非常に有用と考えられる。

平成 26 年度愛媛県地域保健研究集会
(2015.1 松山市)

愛媛県における重症熱性血小板減少症候群(SFTS)の発生状況について

愛媛県立衛生環境研究所

○菅 美樹, 溝田 文美, 山下 育孝
服部 昌志, 大倉 敏裕, 四宮 博人

重症熱性血小板減少症候群(以下 SFTS: Sever Fever with Thrombocytopenia Syndrome)は、2011 年に中国で初めて確認された新たなダニ媒介性感染症である。SFTS の診断をする上で臨床的特徴に一致しているかがポイントとなることから、今回は、現在までの検査状況に加え、陽性・陰性症例の特徴についても検討した。対象は、2013 年 3 月～2014 年 11 月 14 日までに、SFTS を疑い当研究所に搬入された検体及び、検査体制が整う以前に国立感染症研究所で検査を行った 53

例とする。発症月は、4月～8月が多く3～4名であり、冬季である12月にも1名の陽性者を認めた。発症日から遺伝子検査検体採取日までの日数は、陽性群3.6±2.6日、陰性群6.1±6.3日であり、陽性群の方が短い傾向であった。ほぼ全例で発熱が認められた。全身倦怠感、出血傾向、神経症状、リンパ節腫脹において、陰性群に比べ陽性群の出現率は高率であった。消化器症状では、下痢症状を呈した症例が最も多かったが、陽性群の約半数は症状を呈していなかった。白血球数減少、CRP値低下の出現率は、陽性群、陰性群それぞれ90% (18/20)と52% (17/33)、67% (8/12)と16% (3/19)であった。血小板数減少、AST、ALT、LDH上昇の出現率は、70%以上に認められた。今回の検討において、合併症等が無い場合、白血球数、CRP値が有意に低下していたことからSFTSの感染を示唆する一指標としてこれらの値が重要であると考えられた。

平成26年度愛媛県地域保健研究集会
(2015.1 松山市)

水中農薬の塩素処理過程における分解性について

愛媛県立衛生環境研究所

○宮本紫織, 越智雄基, 田坂由里
吉田紀美, 大倉敏裕

農薬は、水質管理上留意すべき項目として現在120農薬が水質管理目標設定項目に位置付けられている。今回、水質管理目標設定項目に加え、愛媛県で使用量の多い農薬を調査し、GC/MS、LC/MS及びLC/ICP/MSによる一斉分析法の検討を行った。

その結果、GC/MSで122物質、LC/MSで91物質、LC/ICP/MSで4物質の一斉分析が可能であった。GC/MSの固相抽出カラムによる前処理では、従来ジクロロメタン3mLを抽出溶媒としていたが、検討の結果アセトン0.7mLで良好な結果が得られ、大幅な時間短縮と環境への排出低減が可能となった。また、LC/ICP/MSでは、グリホサート、グルホシネート及びそれらの分解物に加え最終分解物であるリン酸の分離分析が可能となった。

さらに、開発した分析法により農薬の塩素処理実験を実施した結果、塩素処理による農薬の安定性に差があることが明らかとなった。そこで、201農薬について、塩素処理後即分解する物質から24時間経過後ほとんど分解しない物質までの5段階に分類し、水道原水に農

薬が混入した場合の安全性評価につながる基礎資料を作成した。

第51回全国衛生化学技術協議会年会
(2014.11. 別府市)

第12回愛媛県薬剤師会学術大会
(2015.2. 松山市)

愛媛県における食品中の残留農薬等の一日摂取量調査

愛媛県立衛生環境研究所

○井戸浩之, 大西美知代, 大谷友香, 宇川夕子
館野晋治, 吉田紀美, 大倉敏裕

愛媛県では、県民の食の安全安心の確保を図るため、平成23年度から25年度にかけてマーケットバスケット方式による食品中の残留農薬、食品添加物、動物用医薬品及び放射性セシウムの一日摂取量調査を行ったので報告する。

愛媛県内で購入した食品を13群に分け、フードプロセッサで細切均一化したもの及び水道水を試料とし、農薬202項目(GC/MS/MS法121項目、LC/MS/MS法81項目)、食品添加物9項目(保存料及び漂白剤)、動物用医薬品19項目及び放射性物質(Cs-134、Cs-137)について実態を調査した。

残留農薬は、平成23年度は7項目、平成24年度は13項目が検出され、対ADI比は、最大24.3%であった。また、平成25年度は残留農薬が比較的多く検出された緑黄色野菜群について、県内3地域に分け、より詳細に調査した結果、対ADI比は最大18.3%であり、安全性に問題はないと考えられた。検出農薬のうち、EPNは対ADI比が比較的高かったが、様々な年齢層の平均体重と摂取量に基づいて算出したADIと比較したところ、安全性に問題は認められなかった。

食品添加物については、平成23年度、24年度ともに保存料が検出されたが、対ADI比は最大0.95%で、安全性に問題は認められなかった。

動物用医薬品及び放射性物質はいずれの食品群からも検出されなかった。

以上のことから、愛媛県内の食品の安全性に問題は認められなかったが、農薬等が検出された食品群があったことから、食品衛生法に違反する食品が流通しないよう、さらに保健所等との連携を図っていく必要があると考えられた。

第 51 回全国衛生化学技術協議会年会
(2014.11. 別府市)
第 12 回愛媛県薬剤師会学術大会
(2015.2. 松山市)

愛媛県立衛生環境研究所
○中村洋祐, 兵頭孝次, 大塚将成
愛媛大学農学部 治多伸介
株式会社ダイキアクシス
大森大輔, 門屋尚紀, 吉見瑠姫

愛媛県における危険ドラッグからの指定薬物等の検出事例

愛媛県立衛生環境研究所

○石丸 宗徳, 福田 裕子
吉田 紀美, 大倉 敏裕
愛媛県保健福祉部薬務衛生課 望月 美菜子

近年、飲用や吸引等により多幸感や陶酔を高めるものとして、危険ドラッグと呼ばれる麻薬や覚せい剤等に作用が類似するものの各種法律で規制されたものとは化学構造が異なる薬物や植物が販売、乱用されている。これらの製品の乱用により、幻覚・酩酊感等の症状を起こす事例が発生しており、健康被害や社会的被害が問題となっている。

各都道府県においても、危険ドラッグの買上調査が行われているところであるが、愛媛県においても、県民への健康被害の未然防止及び流通実態の把握を目的として、平成 25 年 11 月に県内において買上検査を実施した。

その結果、1 製品から指定薬物と構造が類似した物質が 3 物質 (PV9, 5-fluoro-AB-PINACA, 4-methyl- α -ethylaminopentipenone) 検出された。いずれも購入時点では未規制物質であったが、それぞれ平成 26 年 3 月 6 日, 平成 26 年 6 月 11 日, 平成 25 年 12 月 13 日 (カチノン系化合物包括指定) に指定薬物となった。

現在、当所においては分析機器等が十分に整備されていないため、未知物質の同定は非常に困難であることから、今後は包括指定も含め既知物質のライブラリー、データベース (GC/MS, LC/MS) の充実を図り、化合物の同定能力を強化することが重要である。

第 51 回全国衛生化学技術協議会年会
(2014.11. 別府市)
第 12 回愛媛県薬剤師会学術大会
(2015.2. 松山市)

し尿汚泥焼却灰からのバクテリアリーチングを利用したリン回収システムのミニプラント試験による性能評価

リンの回収・再利用は、リン資源の有効利用の観点から極めて重要である。そこで、し尿汚泥に含まれるリンを、利用価値の高いリン酸カルシウムとして安価に回収する方法として、廃棄物硫黄から硫黄酸化細菌で生成させた硫酸により汚泥焼却灰からリンを溶出させ、吸着材を用いて、純度の高いリン酸カルシウムとして回収するシステムを提案した。

様々な室内実験を踏まえて、し尿処理場敷地内にミニプラントを設置し連続運転を行った。ミニプラントは、実規模の 1/100 とし、吸着材は一般の下水からのリン回収向けに開発されたジルコニウム系吸着材を使用した。脱着液は 5%NaOH を用い、脱着液からのリン回収には $\text{Ca}(\text{OH})_2$ を用いた。

その結果、次のことが明らかとなった。

- リン溶出工程では、加温により水温 30℃を維持すれば溶出率 100% (リン溶出濃度 7,000mg/L) で安定し、15℃程度までは溶出率 80%以上を維持できた。
- 吸着・脱着工程では、水温 20℃において吸着率 100%, 脱着率 80%となった。10℃程度となると、吸着率 80%, 脱着率 50%程度まで低下した。
- リン回収工程では、リン溶出液から 100%回収可能で、回収物も、リン酸カルシウム主体であることを確認した。また回収物は、有害物質の含有率が低く、ク溶性リン含有率が高い等、肥料としての法令基準を満たしていることを確認した。

以上のとおり、システムの有効性が実証できた。

水温低下の影響を受けにくい吸着材の選定や開発が、より安定したシステム構築のための一つの留意点と考えられた。

なお、今回の報告は環境研究総合推進費補助金により実施した成果の一部である。

第 49 回日本水環境学会年会
(2015.3. 金沢市)

バクテリアリーチングのための実用的な硫黄酸化細菌の集積株と経済的な培地組成について

愛媛県立衛生環境研究所

○中村洋祐, 兵頭孝次, 大塚将成
愛媛大学農学部 治多伸介
株式会社ダイキアクシス

大森大輔, 門屋尚紀, 吉見瑠姫

我々は、平成 24 年度から硫黄酸化細菌を用いたし尿汚泥等焼却灰からリンの溶出回収について研究を行っている。その中で実用化を考える上において実用性や経済性は極めて重要と考えている。

そこで、本研究ではバクテリアリーチング(以下「BL」)によるリン溶出技術について、実用性の点から従来の分譲株に替えてし尿処理施設等から採取した集積株について、硫酸生成能等の比較から有効性を検討し、経済性の点から培地成分削減等について検討した。

その結果、次のことが明らかとなった。

- し尿処理施設等の現地で有効な集積株を確保できることが明らかとなった。
- 確保した集積株は、従来使用していた分譲株 NBRC13701(純粋株)と同等以上の硫酸生成能力が認められた。クローンライブラリー解析の結果から、4種類の *Acidithiobacillus* 属の菌種から構成されていることが分かった。
- 使用する培地は、脱硫硫黄に加えて NH_4^+ , Fe^{2+} , PO_4^{3-} の 3 成分まで削減可能で、 Fe^{2+} , PO_4^{3-} については、BL 溶出液の一部を使用することにより培地成分の削減が可能で、溶出工程における大幅な経済性が見込めることが分かった。

以上のとおり BL 溶出工程における実用性と経済性の観点からの改善が確認できた。

なお、今回の報告は環境研究総合推進費補助金により実施した成果の一部である。

第 49 回日本水環境学会年会
(2015.3. 金沢市)

し尿汚泥等の焼却灰からのリン回収技術の開発研究(3K123021)

愛媛県立衛生環境研究所

○中村洋祐, 兵頭孝次, 大塚将成, 津野田隆敏

愛媛大学農学部

株式会社ダイキアクシス

治多伸介

大森大輔, 門屋尚紀, 吉見瑠姫, 寺坂晃子

本研究所は、平成 24 年度から 3 年間、環境研究総合推進費補助金により、愛媛大学及び株式会社ダイキアクシスと連携して標記研究を行い、26 年度末に総合研究報告書として取りまとめ環境省に報告した。

主な概要は次の通りである。

近い将来リン資源の枯渇が懸念されている状況にあって、し尿汚泥等の焼却灰は、多量にリンが含まれていながら廃棄されているのが現状である。

そこで、し尿汚泥等の焼却灰から硫黄酸化細菌を用いたバクテリアリーチング(以下「BL」)によりリンを溶出させ、吸着材によりリンを分離回収する技術を用いて、肥料として利用価値の高いリン酸カルシウムとして回収することを目的に研究を行った。研究を進めるに当たり実用性、経済性、安全性の高い方法を目標とした。

平成 24 年度は、BL による溶出の可能性、最適吸着材の探査等基礎的事項の検討を行った。

平成 25 年度は、連続的な溶出、連続的な吸着回収が可能な技術について検討し、実証ミニプラントの設計仕様を確定した。

平成 26 年度は、これまでの室内実験結果を踏まえて県内し尿処理場の実規模の 1/100 スケールの実証ミニプラントを設置し、性能評価や経済性、実用性を含めた総合評価を行った。

実証ミニプラント試験においては、し尿汚泥焼却灰から BL により高い溶出率でリンを溶出させ、吸着材により高い回収率で純度の高いリン酸カルシウムとして、肥料取締法の基準に適合するものであることが確認できた。同時に、より良いリン回収設備とするための方向性が明らかとなった。

実証ミニプラント試験に至るまでの室内実験においては、実用的で経済的なリン溶出技術の検討結果や吸着回収工程における有害金属の動態等貴重な知見が得られた。

以上の結果は、学会発表や一般県民対象の講演会、マスコミ等を通じ公表した。

平成 26 年度環境研究総合推進費補助金研究事業
総合研究報告書

愛媛県立衛生環境研究所

○山内 啓治, 山中 省子, 長尾 文尊, 山中悟
愛媛県立とべ動物園 永峰 令子
愛媛自然環境調査会 松田 久司
河原医療大学校 宇和 孝
環境省希少野生動植物種保存推進員
伊藤 邦夫

愛媛県における両生類無尾目は、ヒキガエル科 1 種、アマガエル科 1 種、アカガエル科 8 種、アオガエル科 2 種が確認されている。このうちニホンアカガエル、トノサマガエル、ナゴヤダルマガエルが本県レッドリスト種に選定されており、また、本県独自の категорияとして設けている「低地減少種」にニホンヒキガエルが選定されている。

本県における両生類の研究は歴史が浅く、生息状況に関する情報量が不足しているのが現状である。特に瀬戸内海島しょ部に生息しているとされるナゴヤダルマガエルについては、愛媛県の特定希少野生動植物に指定されており、生息状況に関する情報が必要となっている。

そこで、2012 年から 3 年間、瀬戸内海の西瀬戸自動車道(しまなみ海道)沿いの今治市と上島町の島々の水田地帯を中心に両生類無尾目の分布状況を調査した。

調査は大三島、伯方島、大島および岩城島の全ての水田とその周辺域において、水田の利用形態調査を実施するとともに夏季の夜間調査や水稲収穫後の踏査、さらにはICレコーダーによる鳴き声調査を実施した。

その結果、島しょ部の水田面積は 10 年前の約 40%と大きく減少し、水路のコンクリート化や夏季に落水する栽培形態の普及が進んでいることが判明した。また近年全国的に減少傾向にあるトノサマガエル(県絶滅危惧Ⅱ類)が多数生息し、その他水田を生息場所とする多様な種類の生物の生息も確認することができた。

なお、ナゴヤダルマガエルについては、本調査では個体が確認されなかったことから、今後、減少要因について解析するとともに、動物園等の関係機関や地元住民などと連携し、引き続き本種の生息に関する情報収集に努めていく予定である。

(所員が First Author 以外)

Applications of next generation sequencer (NGS) and advanced bioinformatics technology in medical microbiology

○Kunihisa Kozawa (Gunma Prefectural Institute of Public Health and Environmental Sciences)

Makoto Kuroda, Hirokazu Kimura (National Institute of Infectious Diseases)

Yukio Morita (Tokyo Kasei University)

Hiroto Shinomiya (Ehime Prefectural Institute of Public Health and Environmental Science)

Komei Shirabe (Yamaguchi Prefectural Institute of Public Health and Environment)

Nucleotide sequencing technology has recently evolved drastically from the contemporary “Sanger sequencing”, which had been the only DNA sequencing method for the last three decades, to the novel non-Sanger-based sequencing genome analyses. Since this new technology is so revolutionary, the device is generally referred to as “next generation sequencer (NGS)”. NGS allows deciphering genomes of any organisms comprehensively and simultaneously at unprecedented speed, and is changing the landscape of bioinformatics in the life sciences with its enormous potential. The application of NGS will bring unlimited expansion of the microbiology front, and significantly in the field of human infections as well, and is expected to broaden the horizon of metagenomics up to another dimension.

In order to study molecular epidemiology of the various infectious diseases, we have conducted comprehensive analyses of the major antigen coding regions of human respiratory viruses such as human rhinovirus (HRV), respiratory syncytial virus (RSV), and human parainfluenza virus (HPIV). We also performed whole genome analyses of non-hydrogen sulfide-producing *Salmonella typhimurium* isolates. The results obtained from the virus study showed that the major antigen coding genes in the viruses had evolved

uniquely and rapidly. And the results from the Salmonella study revealed that the gene mutation of some enzyme coding regions had affected the biochemical properties of phenotypes of the bacteria which are considered biologically essential.

In conclusion, our study proved that NGS is a very useful and promising tool in bioinformatics and the applications of advanced bioinformatics technology relevant to medical microbiology will be discussed in general.

2014 International Hua-Xia Medicine Summit Forum on Human Genes (2014 April China)

第 29 回公衆衛生技術研究会

<特別講演>

公衆衛生30年、「過去・現在・未来」

愛媛県八幡浜保健所長 竹之内 直人

昭和 58 年に採用され 30 年が経過し、公衆衛生の変遷と課題をのべます。

1. 保健所法(S22 年改正):人口 10 万対 1 か所, 全国 800 余か所, 県内にも 14 ありました. 石油ショックを乗り越えバブル期, 行政の予算も潤沢で, 老人保健法受託健診全盛期です. 全国の研修や, 欧州公衆衛生事情視察制度などがあり仲間ができてよかったです. 木村慶教授のもとで, 学生実習や, 非常勤講師を務め, 成果物を愛媛医学に投稿しました. 「肝硬変, 肝癌死亡の地域分布に関する研究」, 「愛媛県の自殺の疫学的研究・自殺者の実態と住民の自殺にかかわる意識調査」, 「愛媛県における川崎病の疫学的研究」など. 国立循環器病センター「突然死の実態に関する疫学調査研究班」に参加し小西教授と出会いました. 県立医療技術短大も開学し, 木村慶学長の要請で, 地域看護学の健康管理論を担当しましたが, 大学へと発展しすでに 10 周年経過です.

今治では, A 型肝炎の散発例があり, 全国でも多発しました. 伊予三島では無医地区検診, 新居浜ではテトラクロロエチレン地下水汚染, ATL, AIDS, ダイオキシン(環境ホルモン)対策が課題でした. 平成 4 年から全国保健所長会の保健所問題検討委員会「精神保健」, 「保健と福祉の連携」, 「保健所医師確保等」委員となりました.

2. 地域保健法(平成 6 年):保健所の機能強化と市町村との役割分担を目的に, 保健所を統廃合, 全国 400 余か所, 今の体制へと移行しました. 平成 6 年全国保健所長会「地域保健対策検討委員会」, 平成 7~15 年常任理事, 地域保健総合推進事業が開始しました.

バブルがはじけ財政再建・地方分権により, 国の事業が自治体へ, 市町の合併で県も 20 市町となりました. 医療監視が自治事務に移管されて, 「保健所の立ち入り検査に関する研究班」が開始しました. 一方安全神話が崩壊し, 健康危機管理や災害対策, 人畜共通感染症が課題となりました. 八幡浜, 松山, 松山市時代は, 阪神淡路大震災, 堺 O157 食中毒, 雪印牛乳食中毒,

和歌山カレー事件, 牛海綿状脳症(BSE)検査などがありました.

3. 保健部から健康福祉環境部へ:宇和島えひめ丸事故 PTSD 対策, SARS, 新型インフルエンザ, SFTS, デング熱, エボラ出血熱等, 新興感染症の発生が続きます. 「保健所における新医師臨床研修モデル事業の受け入れについて」, 「犯罪被害者の精神健康の状況とその回復に関する研究」, 「健康危機管理体制の評価指標, 効果の評価に関する研究」, 「司法精神医療の適正な実施と普及に関する研究」の研究事業に参加できました.

まとめ 感染症発生, 化学物質による環境汚染, 災害時の危機管理等, 県民への不安解消や, 風評被害対策のためには今後も地域保健従事者の協働による迅速な対応と啓蒙活動が重要です. 技術の継承に関しては, 事例の記録と検証が必要です. 衛生研究所は衛生行政推進において, 科学的根拠となる大事な分野ですので, 今後も切磋琢磨を期待します.

<特別報告>

「SFTS の制圧に向けた総合的研究」班の 2 か年の研究成果から見えてきたもの

愛媛県立衛生環境研究所長 四宮 博人

重症熱性血小板減少症候群 (severe fever thrombocytopenia syndrome: SFTS)は, 2009 年頃より中国中央部において報告され, 2011 年に原因ウイルスが特定されたダニ媒介性の新興感染症である. 中国以外での報告はなかったが, 2012 年秋に死亡した山口県の海外渡航歴のない患者が, SFTS ウイルス (SFTSV)による感染症であったことが, 2013 年 1 月に明らかにされた. 同年 3 月 4 日からは感染症法の四類感染症として全例届出対象となり, 地方衛生研究所(地研)において検査体制が確立された. 現在(2015 年 1 月 6 日)までに, 15 県において 113 人の患者が確認され, そのうち 37 人が死亡している(死亡率 32.7%). 愛媛県では 20 人の患者が確認され, うち 8 人が死亡しており, 患者発生数が多い県の一つである.

本感染症の重要性を鑑み, 2013 年 5 月に厚生労働科学研究費補助金研究, 「SFTS の制圧に向けた総合的研究」班が組織され, 地研, 国立感染研, 大学等の研究者が, 診断・予防・治療法の研究, ウイルス学的研究, マダ

ニや野生動物の生態に関する研究、臨床対応ガイドラインの研究、国内ネットワークの研究など、多面的な調査研究が精力的に実施されてきた。

マダニについては、全国26自治体において、植生マダニと動物付着マダニを調査したところ、患者が報告されている地域のみならず患者が報告されていない地域においても SFTSV が確認された。愛媛県においてもマダニについて調査し SFTSV の保有率が全国よりも高いことが明らかにされた。動物の抗 SFTSV 抗体価調査については、全国27自治体でシカ、イノシシ、イヌ等の調査が実施され、患者発生地で抗体価が高い傾向が見られている。愛媛でも約100頭の動物について調査し、抗体陽性動物の地域性が認められた。

SFTSV 患者について、年齢、性別、発症時期、臨床症状の特徴、病理学的特徴などが調べられた。特に、病理学的解析は中国からの報告はほとんどなく、血球貪食症候群の所見など SFTS の病態の解明に重要な知見を提供している。また、SFTSV のゲノム解析から、日本における同ウイルスは中国のものとは異なるクラスターに属することが明らかになり、それぞれ独立に進化してきたことが示唆された。

本研究班が中心となり、臨床医、ウイルス学、病理学、疫学、獣医学、昆虫学等の研究者、行政担当者、その他多くの関係者が連携・協力して対策を進めており、愛媛県における SFTS 対策にも有効活用できるものと考えられる。

<最新情報>

危険ドラッグ等薬物の濫用による危険から県民の健康と安全を守るために

薬務衛生課 望月 美菜子

近年、危険ドラッグの乱用による事件、事故が全国的に多発し、深刻な社会問題となっている。県内においても危険ドラッグの販売店を確認したが、県警、麻薬取締部と連携した指導等により、販売中止に追い込んだ。しかしながら、インターネットでは購入が可能であり未だ流通していると考えられ、また、県としてできる対策は全てやるべきであると考え、県民の健康と安全を守ることを目的に愛媛県薬物の濫用の防止に関する条例を制定した。

この条例においては、知事指定薬物を指定し、その

製造、販売、所持、使用等を禁止し、これらに違反した場合は罰則も科すこととしている。国においても法改正により規制の強化を行ったところであるが、規制だけでなく、危険ドラッグ等薬物に関し、若年層を中心とした教育、啓発が重要であることから、あらゆる機会を通じて一層の啓発等に努め、薬物を拒絶する意識を育てることにより薬物の撲滅を目指していきたい。

危険ドラッグ等薬物の分析について

愛媛県立衛生環境研究所 福田 裕子

平成20年以降全国各地で、当時いわゆる「脱法ハーブ」などと呼ばれた中枢神経に強い作用を及ぼす薬物が流通し、近年、健康被害が多く報告されるようになった。新たな構造の化合物が次々と市場に流通することから、国は、化合物を包括指定するなどして、指定薬物としての規制対象を約1,400種とした。これに対応するため、迅速な検査体制の構築が必要となり、国立医薬品食品衛生研究所だけでなく、各都道府県でも検査が行われるようになった。

当所では、県民への健康被害の未然防止及び流通実態の把握を目的として、平成25年度より危険ドラッグの試験検査体制を整備している。ガスクロマトグラフ質量分析計(GC-MS)及び液体クロマトグラフ質量分析計(LC-MS)などの機器を使用し、化合物の推定及び標準品との比較による化合物の特定を行っている。

現在、当所では、県内で販売されている製品を対象に危険ドラッグ等の分析を実施しており、今後は、県条例による知事指定薬物に関する情報収集や分析法についても研究を行うこととしている。

今回、県内で買い上げを行った1製品から、平成26年3月、3種の指定薬物が検出された事例をあげ、当所における危険ドラッグ等薬物の分析法に関して概要を報告する。

<研究発表>

酸化防止剤(BHA, BHT)の分析について

西条保健所 岡本 哲也

食品添加物であるBHA, BHTは、食品に含まれる油脂の酸化等による食品の変質を防止するために使用さ

れている酸化防止剤であり、当所では、食品衛生検査指針に基づき検査を実施している。本法の添加回収率は食用油、バター等で 80%以上と示されているが、バター等の飽和脂肪酸を多く含む油脂製品の添加回収率が 80%を下回ることがあった。そこで、減圧ろ過操作での油脂との分離に原因があると仮定し、洗いこみ用混合溶媒の量を 15ml から 20ml に増量することで、BHA、BHT 共に十分な回収率が得られた。

また、煮干等の不飽和脂肪酸を多く含む魚介乾製品に BHT と波長スペクトルが近似している妨害ピークが発現した。そこで、分析カラムを VP-ODS 4.6 mm i.d.×150 mm, 5 μm から CLC-ODS 4.6 mm i.d.×250 mm, 5 μm に変更し、アセトニトリル・メタノール混液(1:1)を 10 分間で 70%から 90%まで変化させることで、分析カラムの長さやグラジエント条件の変更による、妨害ピークとの短時間での良好な分離が得られた。

パージ・トラップ GC/MS 等水道法告示3法による水中かび臭物質分析結果の比較と妥当性評価

愛媛県立衛生環境研究所 越智 雄基

かび臭物質として知られるジェオスミン及び 2-メチルイソボルネオール(MIB)は、水道における異臭の観点から水道水質基準項目に位置付けられている。告示で指定されているかび臭物質の検査方法には、パージ・トラップ(PT)/GC/MS、ヘッドスペース(HS)/GC/MS、固相抽出(SPE)/GC/MS 等があり、それぞれ前処理方法が異なるが濃縮過程を経て微量分析を可能としている。上記3手法により水道水及び河川水を用いて妥当性評価を実施した結果、いずれにおいても真度、併行精度及び室内精度は目標を満たした。以上の結果から、当所では PT/GC/MS によりかび臭物質検査を実施しているが、当該機器に不具合が生じた場合は HS/GC/MSもしくは SPE/GC/MS で対応できることがわかった。また、平成 26 年 10 月に愛媛県内の水道事業者等を対象に実施した精度管理用の試料(ジェオスミン水溶液)を測定した結果、定量値の平均は 8.90~9.38 ppt であり、変動係数は 10%以内と良好な結果であった。

愛媛県における光化学オキシダント自動測定機の精度管理について

愛媛県立衛生環境研究所 大内 伸保

光化学オキシダントは、光化学反応により生成するオゾンを中心とした酸化性の大気汚染物質であるが、環境基準の達成率は低く、注意報発令等の緊急時対応を要する場合もあり、重要な監視項目の一つとなっている。

このため、汚染状況を的確に把握し、円滑な緊急時対応を実施するためには信頼性の高い測定値を得る必要があり、自動測定機の正確な目盛校正が求められるところである。

平成 22 年 3 月に環境大気常時監視マニュアルが改定され、校正方法が紫外線吸光度法(UV 法)に統一されるとともに、全国的な精度管理体制が構築されたところであるが、同体制導入後に実施した校正状況を検証した結果、基準器及び自動測定機の校正精度や安定性は良好であり、精度管理目標値を十分満足するものであった。

リン回収技術における硫黄酸化細菌の連続培養への最適化

愛媛県立衛生環境研究所 大塚 将成

近い将来、世界的なリン資源不足による農工業等への影響が懸念されており、国内で自給不可能なリン資源を循環利用する技術開発が急務となっている。このような状況のなか、衛生環境研究所では平成 24 年度からリン回収技術について、愛媛大学(株)ダイキアキスと共同研究を実施している。本研究では、本技術の特徴でもある硫黄酸化細菌について、実用化に向けた効果的な培養を実現するため、卓上型培養装置による連続培養方法において各パラメータの経時変化を明らかにし、より最適な培養条件を探索した。

その結果、各パラメータを総合的に考えると希釈率は 0.167 が適当であることが確認された。今後、硫酸をより生成できる条件で硫酸生成速度を大きく保ちながら連続培養を行うことで、希釈率をより大きく設定(滞留時間を短縮)できる可能性がある。また、リン回収技術において希釈率 0.167 で連続培養する場合、酸素溶解効率を 54%以上満足するような曝気強度に設定することが最適であると考えられた。

腸管凝集付着性大腸菌の病原性と分子疫学解析

愛媛県立衛生環境研究所 木村 千鶴子

2012年1月から2013年3月の間に小児科定点医療機関において感染性胃腸炎と診断された1040検体中73株(7.0%)の下痢原性大腸菌が分離された。そのうちEAECが38株(3.6%), EPECが31株(3.0%), ETECが4株(0.4%)分離された。

EAECの血清型は、8種類に分類され、O126:H27が11株(28.9%), O127a:H21が9株(23.7%)と高率に分離された。O血清型別不能が12株(31.6%)と多く分離され、市販されている抗血清に分類されないものも多く存在することが示唆された。

分離株すべてがClump形成試験、細胞付着性試験により病原因子が確認されたことから感染性胃腸炎の原因菌と考えられた。

今回の調査は、散発事例のため疫学的情報は不明であるが、小児の生活環境のなかで何らかの感染源があると考えられる。小児感染性胃腸炎の原因として、また食中毒事例の報告があるO126:H27が高率に検出されたことから、集団事例の発生に対しても注視する必要があると考えられる。

次世代シーケンサーを用いたサルモネラ属菌の分子疫学解析について

愛媛県立衛生環境研究所 仙波 敬子

サルモネラ属菌はヒトの急性胃腸炎・食中毒の重要な原因菌である。ヒト感染症のほとんどは *Salmonella enterica* によるもので、このうち、非チフス性サルモネラによる感染症患者が世界中で年間多く発生している。近年、O4抗原を発現し、H抗原の第2相を発現しない *S. 4,5,12:i-* 株が、非チフス性サルモネラ感染症の主要な原因菌として注目されている。今回、従来の方法では、血清型がO4型別不能に分類されていた患者由来株が、NGSゲノム解析により、遺伝的に *S. Typhimurium* に近縁で、H抗原の第2相発現に関連する遺伝子領域(*fljA*, *fljB* 等)が欠失する *S. 4,5,12:i-* 株であることが判明した。本菌株の遺伝子欠失は、*S. 4,5,12:i-* 株のうち全長のゲノム塩基配列が決定されている既知のCVM23701株とは欠失パターンが異なる新しいタイプであった。また、この菌株は7種の抗菌薬に耐性であるが、プラスミドのNGS解析により、CTX-M-55遺伝子を有する基質特異性拡張型β-ラクタマーゼ産生菌である他、種々の薬剤耐性因子を保有することが明らかになった。