

evaluated using serum samples collected from patients suspected of having SFTS in Japan. All 24 serum samples (100%) containing high copy numbers of viral RNA ($>10^5$ copies/ml) showed a positive reaction in the Ag-capture ELISA, whereas 12 out of 15 serum samples (80%) containing low copy numbers of viral RNA ($<10^5$ copies/ml) showed a negative reaction in the Ag-capture ELISA. Among these Ag-capture ELISA-negative 12 samples, 9 (75%) were positive for IgG antibodies against SFTSV.

CONCLUSIONS: The newly developed Ag-capture ELISA is useful for SFTS diagnosis in acute phase patients with high levels of viremia. SFTS is a tick-borne acute infectious disease caused by the SFTSV. SFTS has been reported in China, South Korea, and Japan as a novel Bunyavirus. Although several molecular epidemiology and phylogenetic studies have been performed, the information obtained was limited, because the analyses included no or only a small number of SFTSV strains from Japan. The nucleotide sequences of 75 SFTSV samples in Japan were newly determined directly from the patients' serum samples. In addition, the sequences of 7 strains isolated in vitro were determined and compared with those in the patients' serum samples. More than 90 strains that were identified in China, 1 strain in South Korea, and 50 strains in Japan were phylogenetically analyzed. The viruses were clustered into 2 clades, which were consistent with the geographic distribution. Three strains identified in Japan were clustered in the Chinese clade, and 4 strains identified in China and 26 in South Korea were clustered in the Japanese clade. Two clades of SFTSV may have evolved separately over time. On rare occasions, the viruses were transmitted overseas to the region in which viruses of the other clade were prevalent.

PLoS Negl Trop Dis. 5;10(4): e0004595(2016)

【学会発表(所員が First Author)】

愛媛県における SFTS への取り組み～特に抗体調査について

愛媛県立衛生環境研究所

○四宮博人, 木村俊也, 山下育孝, 溝田文美
山下まゆみ, 大塚有加, 菅 美樹

2013年1月に国内(山口県)で初めて確認された SFTS 事例を踏まえて, 症例定義に基づく後方視的調査が実施され, 2月13日に愛媛県と宮崎県の成人男子2人も SFTS により2012年に死亡していたことが明らかにされた. 現時点で(2016年5月25日), 計21名の患者(20名は県内在住者)が愛媛県から報告されている. 後方視的調査で3名, 前方視的に17名(2013年6名, 2014年10名, 2015年1名)が診断され, 患者発生数では宮崎県について2番目に多い.

20名の患者の平均年齢は73.7歳, 男女比は9対11である. 20名中7名が死亡している. 患者の居住区(保健所管内)については, 15名(八幡浜9名, 宇和島6名)が南予と呼ばれる県南部の, 5名(松山市3名, 中予2名)が松山市・中予在住の患者であった. 北東部では発生の報告がなく地域性が認められる. 刺し口が認められたのは11名で半数近くは確認されていない. 12名(60%)の患者がペット(イヌ, ネコ)を飼っていた.

SFTS ウイルスの感染実態を明らかにするため, 2015年に患者発生地域を中心に農業・林業に従事者する50歳以上のハイリスクグループ694名から採血し, 国立感染症研究所ウイルス第一部と共同でこれらの対象者における SFTS ウイルス抗体陽性率を調べた. 間接蛍光抗体法で抗体陽性者が2名(抗体陽性率0.29%)確認され, これらは八幡浜保健所管内在住の60歳代男性と70歳代女性で, ともに柑橘栽培・畑作業に従事していた. うち1名は全く SFTS の症状を自覚しておらず, 軽い症状を呈しただけか不顕性感染であったと思われる. この結果から, 患者発生地域においても健康人の SFTS ウイルス抗体陽性率は非常に低いことが明らかにされた.

これまで SFTS 対策として, ①医療従事者, 感染症対策担当者を対象とする研修会, ②地域住民の教育, 啓蒙, ③マダニや野生動物の対策の3点を主に実施してきた. さらに, 抗体調査による地域住民への注意喚起効果も感じられた. これらが総合的に奏功して, 2015年には患者発生が1名に減少したのではないかと推察される.

衛生微生物協議会第37回研究会
(2016.7. 広島)

地研における次世代シーケンサー利用の可能性「細菌分野での活用事例」

愛媛県立衛生環境研究所

○四宮博人, 仙波敬子, 園部祥代
大塚有加, 菅 美樹, 山下まゆみ

食中毒起因菌による患者発生は莫大な経済損失となっており, 的確な感染制御が望まれている. その基盤となる高精度の分子疫学解析のため, 感染性胃腸炎患者, 食材, 家畜から愛媛県内で分離されたサルモネラ株を対象に, 国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センターと共同で, 次世代シーケンサー(NGS)を用いてゲノム解析を実施した. S 血清型が O4 型別不能に分類されていた患者由来 EHM21-304 株が, NGS ゲノム解析により, *Salmonella* Typhimurium に近縁で, H 抗原の第 2 相発現に関連する遺伝子領域に 11 個の遺伝子が欠失する世界的にも新しいタイプの *Salmonella* 4,5,12:i:- 株であることが判明した. また, EHM21-304 株は 9 種の抗菌薬に耐性であるが, この菌株が保有するプラスミド pSO4-21-304 の NGS 解析により, 本プラスミドは Inc A/C と Inc FII を含むキメラ構造を有し, それぞれの領域に薬剤耐性遺伝子が存在することを明らかにした.

一方, 患者由来株 31 株, 食材(鶏肉, 豚肉)由来株 29 株, 家畜(豚盲腸便)由来株 10 株の計 70 株の *Salmonella* Infantis (*S. Infantis*) の全ゲノム配列を NGS で決定し, その系統解析から 3 つの主要なクラスター, クラスター 1 (患者株のみ), クラスター 3 (患者由来株と動物由来株), クラスター 5 (患者株と食材由来株) が得られた. これらのクラスター内で, 患者由来株と食材・動物由来株からなる近縁のペアが認められ, 感染経路を強く示唆する. また, クラスター 1 は愛媛株では患者株のみであったが, 他の都道府県で分離された鶏卵由来株と同一のクラスターを形成した. これはクラスター 1 に属する当県患者の鶏卵喫食について調べる根拠となる. さらに, 薬剤耐性を示す株(患者由来株と食材由来株)は全てクラスター 5 に属したが, これらの株はメガプラスミドの遺伝子マーカーである *irp2* 遺伝子を保有していたことから, 本プラスミド上に薬剤耐性遺伝子が存在することが示唆された.

以上の結果は, NGS による広範囲ゲノム解析が病原体の高精度同定や分子疫学に基づく感染症対策に極めて有用であることを示している.

衛生微生物協議会第 37 回研究会
(2016.7. 広島)

Seroprevalence of severe fever with thrombocytopenia syndrome (SFTS) virus antibodies in SFTS endemic areas of Ehime prefecture, Japan

Shinomiya H, Kimura T, Aiko F, Shimojima M, Yamashita Y, Mizota H, Yamashita M, Otsuka Y, Kan M, Fukushi S, Tani H, Taniguchi S, Ogata M, Kurosu T, and Saijo M

Background and Purpose: Severe fever with thrombocytopenia syndrome (SFTS) is an emerging tick-borne viral infection that was first identified in China. A novel bunyavirus, SFTS virus (SFTSV), was determined as the causative agent of the infection. Patients with SFTS have also been reported in Japan since 2013, and these patients have been so far reported only in western and central Japan including Ehime prefecture. In Ehime, 21 patients including 8 fatal patients have been reported, indicating that Ehime prefecture is one of the highest SFTS-endemic prefectures in Japan. However, the seroprevalence of SFTSV in Japan has not yet been reported. The aim of the present study was to determine the seroprevalence of and risk factors for SFTSV infection.

Materials and Methods: Blood samples were collected from 694 people living in Ehime prefecture in 2015. The participants were aged over 50 years and chiefly engaged in farming and forestry. In addition, all the participants enrolled provided information regarding their gender, age, place of residence, outdoor activities, having pets, experience with tick bites, and chronic diseases under treatment.

Results and Discussion: Eight of the 694 samples (1.15%) were positive for antibody to SFTSV in the ELISA screening tests. The 8 samples were further assessed by indirect immunofluorescence assay. Two of the ELISA-positive samples (0.29% of total samples) firmly reacted with SFTSV antigens, while the other 6 samples did not. One of the two samples exhibited neutralizing activity against SFTSV in an in vitro culture system. The neutralizing antibody positive participant was a healthy 74-year-old woman living in the western part of Ehime prefecture and being engaged in citriculture and fieldwork. She neither had clear history of tick bites nor kept pets. The results revealed that the seroprevalence of SFTSV in general populations in Ehime was very low even in the

SFTS-endemic regions.

第 64 回日本ウイルス学会学術集会
(2016.10. 札幌市)

日本における感染症サーベイランスの現状と課題「地方衛生研究所の立場から」

愛媛県立衛生環境研究所

四宮博人

病原体サーベイランスは、患者発生サーベイランスとともに、我が国の感染症サーベイランスの根幹をなすものである。その目的は、患者の確定診断を行うことではなく、患者検体より病原体を分離、培養、同定し、流行している病原体の特性を明らかにすることにある。病原体の特性とは、血清型、遺伝子型、抗原型、塩基配列、変異、薬剤耐性等を指す。

地方衛生研究所(地研)と国立感染症研究所(感染研)は、病原体サーベイランスにおいて中核的役割を担い、病院検査室・民間検査所では扱わない、または扱えない領域の病原体検査を実施する。病原体サーベイランスでは、患者発生報告の情報と異なり、患者由来の検体を得て検査を行うことから、検体の提供、収集、搬送等の対応と、病原体を取り扱う検査室の設備、試薬等の手配、さらには正確な技術をもった臨床微生物の専門家の配置が必要となる。その実施において医療機関や保健所との連携が不可欠であり、このような体制を各自治体において確保する必要がある。

多種多様な病原体の分離同定には、専門的知識と経験の積み重ねが必須であり、長期にわたる修練が求められる。この点は、病原体検査の質の確保において基盤となるものである。また、個々の地研がすべての病原体に関する検査技術を維持し、対応していくことは難しい面もあり、重要な病原体についてはレファレンスセンターが設けられ、全国の地研間の分担協力、感染研との連携が図られている。さらに、国立保健医療科学院および感染研との連携により、地研職員の技術研修が行われている。

病原体サーベイランスの第一線に位置する地研の活動から、原因病原体が新規に同定された例も少なくない、現時点で原因不明の感染症について病原体の検索を行うことも地研の重要な役割であり、今後この重要性は増していくと考えられる。また、感染症法上で位置付けられていない新興感染症等の発生を早期に探知するための「イベントベースサーベイランス」において、地研がどう関与するか

についても検討する必要がある。

本フォーラムでは、地研の立場から、以上の病原体サーベイランスについて、現状と課題について述べたい。

第 75 回日本公衆衛生学会総会
(2016.10. 大阪)

小児感染性胃腸炎患者から分離された腸管凝集付着性大腸菌の性状について

愛媛県立衛生環境研究所

○四宮博人, 仙波敬子, 園部祥代, 木村俊也
中予保健所 木村千鶴子

腸管凝集付着性大腸菌(EAEC)は、下痢原性大腸菌のうち最も新しく分類されたもので、乳幼児や成人の下痢症の原因となり、食中毒などの集団発生事例も報告されているが、未だ不明な点も多い。今回、愛媛県内で分離された EAEC 株の性状および分子疫学解析を行ったので報告する。愛媛県内医療機関で採取された糞便を検体とし、下痢原性大腸菌の検出は病原性関連遺伝子のマルチプレックス PCR 法によって行い、*aggR* が陽性の菌株を EAEC と判定した。付着性試験として、Clump 形成試験および HEp-2 細胞凝集付着性試験を実施し、凝集付着性線毛をコードする遺伝子を PCR 法によって検出した。

小児感染性胃腸炎患者の糞便 1040 検体から EAEC が 38 株(3.6%)分離された。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。また、市販抗血清によって分類されないものも多数存在した。EAEC 株は全て *aggR* と CVD432 を保有していたが、*astA* については血清型によって保有状況に特徴が見られた。付着性試験では、38 株すべてが Clump 形成試験陽性であり、HEp-2 細胞への凝集付着性も見られた。AAF 遺伝子の保有状況では、血清型との関連が認められ、O126:H27(11 株)は AAF/II を、O86a:HNM(4 株)は AAF/IV を、O 型別不能(11 株)は AAF/I を保有していた。PFGE パターンによる疫学解析では、血清型別に 4 つのクラスターを形成し、同一のパターンを示すものが 5 グループ認められ、小児の生活環境のなかで何らかの感染源があった可能性が示唆された。

第 90 回日本細菌学会総会
(2017.3. 仙台市)

地方衛生研究所における薬剤耐性菌サーベイランスの現況と展望

愛媛県立衛生環境研究所

四宮博人

地方衛生研究所における病原体サーベイランス:

日本における全国レベルの感染症サーベイランスは、1981年に国の事業として開始され、1999年の「感染症法」施行後は、法に基づく感染症発生動向調査として位置づけられている。病原体サーベイランスは、患者発生サーベイランスとともに、我が国の感染症サーベイランスの根幹をなすものである。その目的は、患者検体より病原体を分離、培養、同定し、流行している病原体の特性を明らかにすることにある。病原体の特性とは、血清型、遺伝子型、抗原型、塩基配列、変異、薬剤耐性等を指す。地方衛生研究所(地研)と国立感染症研究所(感染研)は、病原体サーベイランスにおいて中核的役割を担い、病院検査室・民間検査所では扱わない、または扱えない領域の病原体検査を実施している。

地研における薬剤耐性菌サーベイランス:

医療機関は院内感染対策委員会の設置などにより薬剤耐性菌を把握し、その拡大防止に努めており、院内感染発生予防に効果を上げてきたと思われる。一方、医療機関の枠を超えた地域における薬剤耐性菌の広がりを把握し、必要に応じて拡大防止対策を講じることは医療機関の役割の範疇を超えており、自治体の役割も大きいと思われる。

この点に関し、平成23年2月に「院内感染対策中央会議提言」が提出され、同年6月及び平成26年12月には、同提言を引用した厚労省通知「医療機関における院内感染対策について」が発出された。同通知では、「地研において適切に院内感染起因微生物を検査できるよう体制を充実強化すること」、「地研が薬剤耐性菌の検査において地域の中心的な役割を担うことが望ましい」とされている。平成27年度には地研と感染研が連携して、薬剤耐性菌検査体制の整備推進のため、「薬剤耐性菌レファレンスセンター」が全国に設置された。さらに、今年度4月に策定された国の「薬剤耐性(AMR)対策アクションプラン」において、地研の役割が明記されている。以上のような近年の動向を踏まえ、多くの地研で薬剤耐性菌の詳細検査が可能になってきている。

当所における薬剤耐性菌に関する検査・研究への取り組み:

(1) 薬剤耐性菌の検査体制の整備

平成26～28年度の愛媛県試験研究課題研究費により、カルバペネム耐性腸内細菌科細菌(CRE)をはじめとする感染症法で規定される7種の耐性菌、及び臨床的に重要な基質拡張型β-ラクタマーゼ(ESBL)産生菌等の遺伝子検査を含む詳細検査体制を確立した。

(2) 薬剤耐性サルモネラ属菌のゲノム解析

サルモネラ属菌は食中毒原因菌として重要であるが、県内患者から分離された、血清型がO4型別不能で9種の抗菌剤に耐性を示したEHM21-304株が、次世代シーケンサー(NGS)によるゲノム解析により、*Salmonella* Typhimuriumに近縁で、第2相鞭毛抗原関連遺伝子領域の11遺伝子が欠失する世界的にも新しいタイプの*Salmonella* 4,5,12:i:-株であること、また、本菌株のプラスミドがこれまでに報告のないタイプのキメラ構造を有することを明らかにした。

(3) 国際的 AMR サーベイランス(GLASS)へのデータベース構築

2015年のWHO総会において、薬剤耐性に関するGlobal Action Planが採択されたが、その一環として、GLASS(Global Antimicrobial Resistance Surveillance System)が展開され、AMRサーベイランスを世界的に協調して実施することが求められている。日本から報告するARMデータベース構築に当所をはじめとする地研グループが参画している。

(4) 医療施設で分離されたGES型β-ラクタマーゼ産生菌由来プラスミドの解析

2004年に日本やギリシャで分離されたCRE肺炎桿菌から新規に同定されたGES型β-ラクタマーゼは、現在世界各地から検出されており、今後の広がりが警戒されている。2008～2015年に愛媛県の医療施設Aにおいて、患者検体から分離されたGES-24産生菌株12株由来のプラスミドDNAをNGS解析した結果、これらのプラスミドは共通の*bla*_{GES-24}保有IncL/Mプラスミドから派生し、複数菌種を含む菌株間で水平伝達したことが示唆された。

第7回愛媛微生物学ネットワークフォーラム
(2016.10.松山市)

愛媛県立衛生環境研究所における「人を対象とする医学系研究」の倫理審査体制について

愛媛県立衛生環境研究所

○西原伸江, 佐々木健二
岡田洋一, 四宮博人

「人を対象とする医学系研究」では、その研究の必要性や目標の妥当性、科学的合理性等が求められることに加え、個人情報の保護や倫理的妥当性についても重要になる。

愛媛県立衛生環境研究所では、人(試料・情報を含む。)を対象とする医学系研究が、「ヘルシンキ宣言」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針(平成 26 年文部科学省・厚生労働省告示第 3 号)」及び「愛媛県個人情報保護条例(平成 13 年 10 月 16 日条例第 41 号)」等の趣旨に沿って、倫理的配慮のもとで適切に行われることを目的として、愛媛県立衛生環境研究所倫理審査委員会設置要綱に基づき倫理審査委員会を設置し、当所及び愛媛県保健福祉部内関係機関の倫理審査体制を整備している。

今回、当所における倫理審査体制について紹介するとともに、倫理審査委員会の運営状況を報告する。

第 14 回愛媛県薬剤師会学術大会
(2017.2. 松山市)

愛媛県における急性胃腸炎流行から検出された新規キメラノロウイルス G II. P21-G II. 1 株について

愛媛県立衛生環境研究所

○山下育孝, 溝田文美, 山下まゆみ
越智晶絵, 四宮博人

感染性胃腸炎の主な原因であるノロウイルス(NoV)は、遺伝子変異やゲノム組換えによる新しい変異株の出現を繰り返し、地域流行や世界的な流行を起こしている。特に、近年、ORF1 と ORF2 の junction 領域で遺伝子組換えを起こした変異株の流行が報告されている。

愛媛県では、2000 年以降報告数の少なかった NoV GII.1 が 2008/2009 シーズンに多数検出されたことから、検出された GII.1 について分子疫学的解析を行った。

2008 年 10 月から 2009 年 9 月に、小児科定点医療機関等で採取された感染性胃腸炎患者糞便 337 検体を用いて検査を実施したところ、NoV GII.1 が 24 株検出された。

この 24 株について ORF2 の N/S 領域の系統樹解析を行った結果、すべて同一クラスターを形成し、塩基配列の相動性は 98.9~100% で近縁であった。次にこのうちの 18 株について ORF1 のポリメラーゼ領域から ORF2 の N/S 領域の塩基配列を決定し遺伝子型別を行った結果、すべてポリメラーゼ領域が GII.P21, N/S 領域が GII.1 のキメラ

ウイルスであることが示された。なお、ポリメラーゼ領域の遺伝子解析の結果、塩基配列の相動性は 99.4%~100% で、N/S 領域と同様に近縁であった。

更にこのうちの 1 株について次世代シーケンサー(NGS)による全長解析を行った結果、ORF1 が GII.21, ORF2 及び ORF3 が GII.1 で、新しい GII.P21-GII.1 のキメラウイルスであることが明らかとなった。

この新規キメラウイルスの出現が地域流行に関与していたと考えられた。

第 64 回日本ウイルス学会学術集会
(2016.10. 札幌市)

愛媛県で検出された A 型肝炎ウイルスについて

愛媛県立衛生環境研究所

○溝田文美, 越智晶絵, 山下育孝
木村俊也, 井上 智, 四宮博人

A 型肝炎は、感染者の糞便中に排泄されたウイルスを経口摂取することで感染する。主な感染原因は汚染された食品や飲用水であり、まれに集団感染を起こすことがある。

愛媛県では、例年 A 型肝炎患者の発生は 1~2 例であるが、2016 年 3 月中旬から 4 月上旬の短期間に 7 例の患者届出があったことから、原因を探索するために遺伝子解析を行った。

届出のあった 7 例の糞便検体について、A 型肝炎ウイルス遺伝子の特異的に増幅する HAV-2F/1R-A(1st), 2F/2R(Nest)のプライマーセットを用いた RT-PCR 法を実施したところ、すべての検体から A 型肝炎遺伝子が検出された。

そこで、この 7 検体について、ダイレクトシーケンス法により VP1/2C 領域の塩基配列(568bp)を決定し、系統樹解析を実施したところ、全て遺伝子型 I A に型別された。また 7 例中 6 例は、塩基配列が 100%一致した。残りの 1 例は、塩基配列の相動性は 96.8%であり、他の株とは異なっていた。

関係保健所が、患者に対して聞き取り調査等を実施したところ、7 例中 3 例にカキ等魚介類の喫食歴はあったが、いずれも喫食地域は異なっていた。また、共通食材や共通行動、渡航歴は確認できなかった。

A 型肝炎は、潜伏期間が長く、感染経路も多岐にわたることから、疫学調査では共通の感染源の存在を探知することは困難である。しかし、今回、提供された検体につ

いて遺伝子解析を行った結果、共通の感染源の存在が示唆された。これらのことから、患者発生時には検体を確保して、分子疫学的解析を行うことが重要と考えられた。

第 37 回日本食品微生物学会学術総会
(2016.9. 東京)

愛媛県の患者から分離されたペニシリン耐性肺炎球菌株の血清型及び薬剤耐性遺伝子について

愛媛県立衛生環境研究所

○園部祥代, 仙波敬子, 木村俊也
井上智, 四宮博人

肺炎球菌は市中肺炎の主要な原因菌である。また、重篤な疾患である侵襲性肺炎球菌感染症 (IPD) を引き起こすことが知られている。近年のワクチンの導入により IPD 症例は減少したが、原因菌の血清型置換が問題となっている。また、ペニシリン耐性肺炎球菌 (PRSP) の増加、多剤耐性化が世界的な問題となっている。そこで、今回、愛媛県で分離された肺炎球菌株の血清型と薬剤耐性について PCR 法による検討を行った。

平成 26 年 4 月から平成 28 年 4 月に PRSP として県内の医療機関より収集し、肺炎球菌の莢膜多糖体遺伝子 (*cpsA*) および自己融解酵素遺伝子 (*lytA*) の保有を PCR 法により確認した株 (43 株) を用いた。血清型別は Multiplex PCR 法によって行った。また、市販のペニシリン耐性肺炎球菌遺伝子検出試薬を用いてペニシリン耐性に関わる遺伝子 (*pbp1a*, *pbp2b*, *pbp2x*) およびマクロライド耐性遺伝子 (*mefA*, *ermB*) の検出を行った。

Multiplex PCR 法の結果、血清型は 10 種類に分類された。最も多く検出された血清型は 15A/15F であり、全体の 28% を占めた。年齢別では、0~3 歳 (総株数 17) での 15A/15F (7 株) の割合が最も多く、41% であった。また、*pbp1a*, *pbp2b*, *pbp2x* の検出の結果、全ての株で 2 つ以上の *pbp* 遺伝子に変異し、3 つの *pbp* 遺伝子に変異しているものも 33 株 (77%) 認められた。マクロライド耐性遺伝子についても全ての株で検出され、*mefA* と *ermB* の両遺伝子を保有しているものは 26% であった。血清型について、15A/15F はペニシリン耐性率の高い血清型として知られており、ワクチン

に含まれていない血清型である。2013 年の定期接種化によりワクチンが接種された可能性がある 0~3 歳でこの割合が高くなっていることから、ワクチンにより血清型置換が起こっている可能性がある。また、薬剤耐性について、今回は PRSP として収集した株であったので、全ての株で 2 つ以上の *pbp* 遺伝子に変異していた。一方、全ての株でマクロライド耐性遺伝子も検出された。以上のことから、愛媛県でも国内外の状況と同様に、血清型置換および多剤耐性化が進んでいることが示唆され、今後も注視が必要であると考えられた。

平成 28 年度獣医学術四国地区学会

(2016.9. 松山市)

第 69 回日本細菌学会中国・四国支部総会
(2016.10. 高松市)

県内で分離されたペニシリン耐性肺炎球菌 (PRSP) 臨床株の血清型および薬剤耐性遺伝子の解析

愛媛県立衛生環境研究所

○園部祥代, 仙波敬子, 木村俊也
井上智, 四宮博人

肺炎球菌は、肺炎、中耳炎などの呼吸器・耳鼻科領域感染症、髄膜炎などの侵襲性感染症などの主要起炎菌である。近年のワクチンの導入により侵襲性感染症の減少が報告されているが、その血清型置換が問題となっている。加えて、PRSP の増加、多剤耐性化も世界的な問題となっている。そこで、今回、愛媛県で分離された肺炎球菌株の血清型と薬剤耐性について PCR 法による検討を行った。

2014 年 4 月~2016 年 4 月に PRSP として県内の医療機関より収集し、肺炎球菌の莢膜多糖体遺伝子 (*cpsA*) および自己融解酵素遺伝子 (*lytA*) の保有を確認した 43 株を用いた。血清型別は Multiplex PCR 法によって行った。また、市販の遺伝子検出試薬を用いてペニシリン耐性に関わる遺伝子 (*pbp1a*, *pbp2b*, *pbp2x*) およびマクロライド耐性遺伝子 (*mefA*, *ermB*) の検出を行った。

Multiplex PCR 法の結果、血清型は 10 種類に分類された。最も多く検出されたのは 15A/15F であり、全体の 28% を占めた。年齢別では、0~3 歳 (総株数 17) で 15A/15F の割合が最も多く、41% であった。15A/15F はワクチンに含まれていない血清型である。2013 年からの定期接種化

により、多くの 0～3 歳児がワクチンを接種されたと考えられるため、ワクチン接種により血清型置換が起こっている可能性が示唆された。また、*pbp1a*, *pbp2b*, *pbp2x* の検出の結果、全ての株で 2 つ以上の *pbp* 遺伝子に変異し、3 つの *pbp* 遺伝子に変異しているものも 33 株 (77%) 認められた。マクロライド耐性遺伝子についても全ての株で検出され、*mefA* と *ermB* の両遺伝子を保有しているものは 11 株 (26%) であった。以上のことから、愛媛県でも国内外の状況と同様に、血清型置換および多剤耐性化が進んでいることが示唆され、今後も注視が必要であると考えられた。

第 7 回愛媛微生物学ネットワークフォーラム
(2016.10. 松山市)

医療施設で分離された GES-24 β -ラクタマーゼ産生菌株由来プラスミドのゲノム情報解析

愛媛県立衛生環境研究所

○仙波敬子, 園部祥代, 木村俊也, 四宮博人
国立感染症研究所

松井真理, 鈴木里和, 柴山恵吾
関塚剛史, 黒田誠

2004 年に日本やギリシャで分離された肺炎桿菌から新規に同定された GES β -ラクタマーゼは、現在世界各地から検出されており、今後の広がりが警戒されている。今回、医療施設において分離された GES-24 β -ラクタマーゼ産生菌株のプラスミド DNA を次世代シーケンサー(NGS)により詳細に解析したので報告する。

2008～2015 年に愛媛県の医療施設 A において、患者検体から分離されたカルバペネム耐性腸内細菌科細菌のうち、GES 特異的 PCR 反応が陽性の 4 菌種(*K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *S. marcescens*, *E. cloacae* complex)12 株を用いた。菌株から抽出したプラスミド DNA の全塩基配列を NGS(Illumina)により解読し、Global Plasmidome Analyzing Tool (感染研)を用いて解析した。

12 株の全てにおいて、GES β -ラクタマーゼ遺伝子 *bla*_{GES-24} が約 80 kb の IncL/M プラスミド上の約 5 kb のクラス I インテグロン中に検出された。12 株由来の各プラスミド間の相同性は 86%～100%で、部分的な挿入や欠失が認められるが全体的に高い相同性を示したことから、これらのプラスミドは共通の *bla*_{GES-24} 保有 IncL/M プラスミドから派生し、複数菌種を含む菌株間で水平伝達したものであることが示唆された。

第 28 回日本臨床微生物学会
(2017.1. 長崎市)

近年増加している梅毒の動向 ～愛媛県感染症情報センター2006年～2016年のまとめ～

愛媛県立衛生環境研究所

○菅 美樹, 大塚有加, 木村俊也
井上 智, 四宮博人

はじめに:愛媛県感染症情報センターでは、感染症の予防、医療、研究などに役立て、有効かつ確な感染症対策の確立に資することも目的とし、「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)に基づき策定された「愛媛県感染症発生動向調査事業実施要綱」により、医師、医療機関、保健所の協力のもと感染症に関する患者発生や病原体の情報を収集・分析し、これらの結果を速やかに地域に公表している。近年、全国及び愛媛県で増加している梅毒について発生の動向の解析を行ったので報告する。

方法:調査対象は、2006年1月1日～2016年8月31日に、全国で届出のあった13659人(男性10161人, 女性3498人)、愛媛県で届出のあった54人(男性45人, 女性9人)である。

結果:(1)全国での発生状況:2014年～2016年の3年間の報告数を性別で比較すると、男性は、1284人, 1934人, 2011人と1.6倍, 女性は、377人, 763人, 865人と2.3倍に増加していた。男性では、10歳代以上の全年齢層での早期顕症梅毒 I 期, II 期, 無症候が多く, 女性では、20歳代の早期顕症梅毒 I 期, II 期, 無症候が多かった。(2)愛媛県での発生状況:2016年8月31日での2016年累計報告数は14人となり、2015年6人の2.3倍となっている。男性では、20歳代～40歳代の早期顕症梅毒 II 期が多く, 女性では、20歳代及び30歳代の早期顕症梅毒 II 期が多かった。

まとめ:愛媛県において、2016年8月31日現在での累計報告数は、全国と同様、感染症法が施行された1999年以降最多となっている。愛媛県における届出時の病型は、早期顕症梅毒 II 期が大多数を占めることから、感染から診断までの数か月間に気付かないうちにパートナーなどを感染させていることが、報告数増加の要因の一つと考えられた。そのため、感染予防対策を中心として広域的な啓発活動が急務であるとする。

第 7 回愛媛微生物学ネットワークフォーラム
(2016.10. 松山市)

増加している梅毒 ～感染症発生動向調査による最近の動向～

愛媛県立衛生環境研究所

○菅 美樹, 大塚有加, 木村俊也
井上 智, 四宮博人

はじめに:近年,全国的に梅毒の届出が急増していることから愛媛県における発生動向の解析を行い全国の状況と比較したので報告する。

方法:調査対象は,2006年1月1日~2016年10月16日に,全国で届出のあった14265人(男性10588人,女性3677人),愛媛県で届出のあった58人(男性48人,女性10人)である。

結果:1)全国の状況:都道府県別では,東京都,大阪府,愛知県,神奈川県,福岡県からの報告が多く,全体の60%(8609人/14265人)を占めた。2014年~2016年の3年間の報告数を性別で比較すると,男性は,1284人,1930人,2442人と1.9倍,女性は,377人,760人,1047人と2.8倍に増加していた。届出時の病期は,男性では,早期顕症梅毒Ⅰ期3051人,早期顕症梅毒Ⅱ期3846人,晩期顕性梅毒560人,先天梅毒40人,無症候3091人で,女性では,早期顕症梅毒Ⅰ期520人,早期顕症梅毒Ⅱ期1332人,晩期顕性梅毒123人,先天梅毒42人,無症候1660人であった。届出時の病期と年齢を比較すると,男性では,10歳代以上の全年齢層での早期顕症梅毒Ⅰ期,Ⅱ期が増加し,女性では,20歳代の早期顕症梅毒Ⅰ期,Ⅱ期,無症候の増加が顕著であった。感染経路は,男性では異性間・同性間性的接触は同割合で多く,女性では異性間性的接触が多かった。2)愛媛県の状況:2016年10月16日での2016年累計報告数は18人となり,2015年6人の3倍となっている。対象期間において,届出される保健所は,松山市保健所の16人が最も多かったが,全保健所からの届出が確認された。届出時の病期は,男性では,早期顕症梅毒Ⅰ期14人,早期顕症梅毒Ⅱ期20人,晩期顕性梅毒4人,無症候10人で,女性では,早期顕症梅毒Ⅱ期6人,晩期顕性梅毒1人,無症候3人であった。届出される病期と年齢を比較すると,男性では,早期顕症梅毒Ⅱ期で届出される20歳代から40歳代,女性では,早期顕症梅毒Ⅱ期で届出される20歳代の割合が多かった。感染経路は,男女ともに異性間性的接触が多かった。

まとめ:愛媛県において,2016年10月16日まででの累計報告者数は,全国と同様,感染症法が施された1999年以降最多となっている。愛媛県における届出時の病期は,早期顕症梅毒Ⅱ期が大多数であったことから,感染から診断までの数か月間に,気付かないうちにパート

ナーなどを感染させていることが,報告数増加の要因の一つと考えられた。そのため,感染予防対策を中心とした広域的な啓発活動が急務であると考える。

平成28年度四国公衆衛生研究発表会
(2017.2.松山市)

水中農薬の塩素処理過程における分解性及び分解物の推定について

愛媛県立衛生環境研究所

○宮本紫織,田坂由里,白石泰郎
服部智子,井上智

農薬は,水道水において水質管理上留意すべき項目として,現在120種類が水質管理目標設定項目に位置付けられている。

これら農薬は家庭や農家で広く使用されるため,開発段階で様々な試験が実施されており,農薬原体の毒性については明らかとなっている。

しかし近年,多くの農薬が浄水場における塩素処理過程において生物学的分解とは異なる変化体を生成する可能性があることが示唆されているが,その毒性や変化体に関する研究は十分なされていない。

今回,当所で開発したガスクロマトグラフ質量分析法(GC/MS),液体クロマトグラフ質量分析法(LC/MS)及び液体クロマトグラフ誘導結合プラズマ質量分析法(LC/ICP/MS)による一斉分析法により,201農薬について塩素処理過程における分解性試験を実施した。その結果,農薬により分解性に差があることが明らかとなり,反応速度論による解析を実施することにより半減期を求め,分解性により10分類に分類した。

さらに,分解性が確認された79農薬については,塩素処理後の農薬をLC/MSに導入し,農薬変化体の構造推定を実施した。その結果,化学構造中に(P=S)を含む農薬は(P=O)となることで質量数が16減少,(-S-)を含む農薬は酸素が付加することで質量数が16増加することを確認した。また,グアニジル基を含有する農薬は質量数が34増加するとともに塩素の同位体スペクトルを確認したことから,塩素が付加することが示唆された。さらに,塩素処理により親水性が高まる,あるいは,似た構造を含んでいれば同じ変化体を生成する農薬があることを確認した。

第53回全国衛生化学技術協議会年会
(2016.11.青森市)

水中農薬の塩素処理過程における分解生成物の細胞毒性について

愛媛県立衛生環境研究所

○白石泰郎, 田坂由里, 宮本紫織
服部智子, 井上智, 四宮博人

農薬は、水質管理上留意すべき項目として水質管理目標設定項目に位置付けられており、現在 120 種類が対象となっている。農業用等として使用された農薬は、河川などから水道原水に混入し、浄水場での塩素処理によりオキソン体等の変化体を生成することが報告されているが、その毒性等は十分な研究がされておらず、安全な水道水の供給のために毒性評価を実施する必要がある。

今回、農薬(9 種)の原体、オキソン体及び塩素処理過程における分解生成物について、ヒト由来細胞を用いた毒性試験を実施した。原体とオキソン体の細胞毒性を比較したところ、ピペロホス等 3 農薬では原体、フェントロチオン等 2 農薬でオキソン体が強い毒性を示した。また、塩素処理による分解生成物の細胞毒性を確認した結果、原体より強い毒性を示すものが確認されたことから、農薬混入事故等の健康危機発生時においては農薬の塩素処理過程における分解生成物の毒性を考慮し、安全対策を講じる必要が示唆された。

第 14 回愛媛県薬剤師会学術大会
(2017.2. 松山市)

LC/MS/MS による魚類におけるマラカイトグリーン分析法の検討及び妥当性評価について

愛媛県立衛生環境研究所

○大西美知代, 大谷友香, 宇川夕子
服部智子, 井上智, 四宮博人

合成抗菌剤マラカイトグリーン(MG)は、「食品、添加物等の規格基準(昭和 34 年厚生省告示第 370 号)」で食品において不検出とされている物質であり、MG とともに代謝物であるロイコマラカイトグリーン(LMG)も分析対象とされている。

当所の従来からの検査法は、添加回収試験において良好な回収率を得ることが難しく、抽出操作も煩雑であったため、STQ 法(Solid Phase Extraction Technique with QuEChERS method)を使ったより簡便な分析方法を検討し、その分析法の妥当性評価を行った。

養殖ハマチを試料とし、妥当性評価においては選択性、

真度、並行精度、室内精度の各性能パラメータを評価した。

今回検討した分析法は従来法より MG, LMG とともに回収率が向上し、操作が簡便になり、短時間での抽出精製が可能になった。妥当性評価においても良好な結果が得られた。

今後は魚の加工品についてもこの方法を検討していきたい。

第 53 回全国衛生化学技術協議会年会
(2016.11. 青森市)
第 14 回愛媛県薬剤師会学術大会
(2017.2. 松山市)

トウキ中リグスチリド定量法の検討

愛媛県立衛生環境研究所

○福田裕子, 橘真希, 服部智子
井上智, 四宮博人

現在、国内で使用されている医薬品原料薬用植物は、8 割以上中国からの輸入に依存しているが、中国国内での需要増加などにより、日本への供給量が不安定な状況となっている。このため、国内産薬用植物供給が急務であり、愛媛県内でも産地化に向けた動きが進んでいる。一方、製品の有効性安全性を確保するため有効成分含有量を把握する必要があり、そのためには定量方法の確立が重要であるが、薬用植物中には様々な成分が含有されているため、日本薬局方収載品であっても定量法が規定されていないものが数多くある。

そこで、愛媛県が栽培の実証試験を行っている薬用植物の一つであり、局方で定量法が規定されていないトウキについてリグスチリドを指標とした高感度定量法の検討を行った。その結果、精油成分であるリグスチリドを指標とした高感度定量法を開発することができ、今後トウキを使用した医薬関連製品開発の際に含量均一性試験等に用いることが可能であり、県内産トウキの需要促進につながると考えられる。

第 14 回愛媛県薬剤師会学術大会
(2017.2. 松山市)

ため池管理が希少トンボを育む

愛媛県立衛生環境研究所

久松定智

オオキトンボとは、平地から丘陵地の水面の開けた、秋に池干しをする灌漑用のため池に生息するアカトンボの仲間である。成虫は6月中旬～12月上旬に見られるが、環境省レッドリスト絶滅危惧IB類、愛媛県レッドリスト絶滅危惧II類に指定されており、全国各地で絶滅が危惧されている。減少要因として、本種は主に水際の水面や泥に産卵するが、コンクリート護岸で産卵が難しくなったこと、また、農業形態の変化等により池干しをする池が減ったこと等が挙げられる(久松・武智, 2013)。本発表では、オオキトンボの発生消長、羽化場所等の基礎的な生態を明らかにし、今後の保全活動に生かすことを目的とし、愛媛県内で本種の産卵が確認されている二つの池(A池、B池)で2016年5月28日～12月25日まで、週1回、合計31日間調査を行った結果を報告する。羽化殻と未熟成虫の調査から、オオキの羽化は6月初旬から8月下旬まで約3か月間継続するが、大部分は6月中旬～7月上旬に羽化すること、未熟個体のマーキング調査から、未熟成虫は1週間以内には発生地であるため池から移動すること、成熟個体のカウントから、成熟成虫は、9月中旬以降にため池に戻って来て、12月初旬には死没すること、等の基礎的な生活史の一端が判明した。B池の産卵は、A池と同程度確認されたが、羽化殻、未熟成虫の発生は極端に少なく、発生のコアにはなっていない池があること等が判明した。また、未熟成虫は堤体の草地で多数が休息しているのを確認したことから、未熟成虫の一時的な休息・採餌場所として堤体の草地は必要だと考えられた。当該地域で慣習的に行われてきた、ため池の水管理、堤体の適当な時期での草刈りなどが、本種の生息に有効に働いてきたことが示唆された。

第18回サイエンスカフェ★えひめ
(2017.2. 松山市)

【学会発表(所員が First Author 以外)】

日本各地におけるPMF解析結果の比較

神奈川県環境科学センター	武田麻由子
札幌市衛生研究所	吉田勤
山形県環境科学研究センター	遠藤昌樹
仙台市衛生研究所	多田有佑
山梨県衛生環境研究所	大橋泰浩
静岡県環境衛生科学研究所	三宅健司
名古屋環境科学調査センター	池盛文数, 山神真紀子
三重県保健環境研究所	寺本佳宏
大阪府立環境農林水産総合研究所	西村理恵
兵庫県環境研究センター	中坪良平
奈良県環境政策課	菊谷有希
愛媛県立衛生環境研究所	<u>山内正信</u> , 大内伸保
熊本県保健環境科学研究所	豊永悟史
長崎県環境保健研究センター	土肥正敬
国立環境研究所	菅田誠治

地方自治体では、微小粒子状物質(PM_{2.5})の成分測定を行っている。今回、札幌市から長崎県までの16自治体において、各自治体が測定した2013年度の測定結果を含むPM_{2.5}の成分測定結果を用いてPMF解析を実施し、解析結果について、抽出された因子や推定結果の地域的・季節的な特徴について考察した。

抽出された因子数は自治体により異なり4～10であった。多くの自治体で共通して抽出された因子は二次生成粒子の硫酸塩及び半揮発性粒子、一次粒子の海塩粒子、バイオマス燃焼及び道路交通であった。

硫酸塩は、硫酸塩(重油)、硫酸塩(石炭)、硫酸塩(unknown)の3因子があり、硫酸塩(重油)、硫酸塩(石炭)の2因子が抽出された場合がほとんどであった。いずれの自治体においてもPM_{2.5}質量濃度に対して硫酸塩の占める割合が最も大きく、夏季を除き西日本で寄与が大きく東日本で小さい明確な地域差がみられた。

半揮発性粒子には硝酸塩及び塩化物があり、自治体により2因子とも抽出された場合、合わせて1因子しかない場合、硝酸塩のみで塩化物がない場合の3パターンがあった。半揮発性粒子は大都市域で寄与濃度が大きい傾向が見られた。

一次粒子のうち、多くの自治体で単独因子として抽出された海塩粒子は、札幌市～愛媛県の7自治体で0.2～

0.7 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ の範囲にあり、地域によらず0.5 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 程度の寄与が示唆された。同じくバイオマス燃焼は概ね3~4 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 程度の寄与が見られた。土壌、道路交通、工業粉じん、廃棄物燃焼はそれぞれの自治体により様々な組み合わせで混合していた。これらは、地域的汚染の要素が強く、分離し評価することが必要である。

なお、本研究は国立環境研究所と地方環境研究所によるII型共同研究として実施した。

第 57 回大気環境学会年会
(2016.9. 札幌市)

行政の生態学～生物多様性の主流化とその課題～

千葉県生物多様性センター
愛媛県立衛生環境研究所

鈴木規慈
村上裕

2010年に生物多様性条約第10回締約国会議(COP10)が開催され、愛知目標が定められてからはや7年が経とうとしている。「2020年までに生物多様性の損失を食い止める。」との合言葉のもと、近年では、国だけでなく都道府県や市町村に至るまで「生物多様性地域戦略」が策定され、「生物多様性の主流化」を目指し、事業が進められてきた。特に、都道府県では、47都道府県のうち約85%が戦略を策定し(平成28年9月現在)、「多様な主体の協働」の合言葉の下に、部局を横断した取組が進められつつある。しかしながら、各自治体の戦略において、多様な主体の協働や情報の一元化等の拠点機能を有する体制整備まで言及したものは45%程度であり、生物多様性センター等(地域連携保全活動支援センター)が設置されている都道府県は茨城、千葉、滋賀、徳島、愛媛の5県、市町村では名古屋市および堺市の2市に留まる。今後は、生物多様性地域連携促進法に基づき、拠点機能を有した生物多様性センター等の設置が見込まれるが、組織の人員や地域課題等により、体制や業務内容は各自治体によって異なることが推察される。国を挙げて生物多様性の主流化を推進していく上では、「生態学の心得」のある人材の確保と活躍できる場づくりが不可欠となる。

本集会では、すでに生物多様性地域戦略に基づいて地方公共団体に設置された拠点施設で実務を担当する方々を中心として、各組織の機能や役割について情報提供をするとともに、各々の課題をもとに、わが国における生物多様性保全の主流化に向けた今後の方向性について、生態学者の皆さんと議論をしたい。

日本生態学会第64回全国大会
(2017.3. 東京)

【第31回公衆衛生技術研究会】

<シンポジウム> 「薬剤耐性菌」

シンポジウム I

愛媛県における薬剤耐性菌の検査体制整備と検出状況について

愛媛県立衛生環境研究所

仙波敬子

薬剤耐性菌(耐性菌)の問題は、医療機関のみの問題ではなく、公衆衛生上の重要課題となっており、監視と対策の取り組みが急務である。当所でも平成26年度から検査体制を整備し、当県における検出状況を把握するため760株の耐性菌株を収集し解析を行った。そのうちカルバペネム耐性腸内細菌科細菌(CRE)62株中17株がカルバペネマーゼ産生菌(CPE)であった。CPEは腸内細菌科の他の菌種に耐性遺伝子が存在するプラスミドが水平伝達することにより、カルバペネム感性菌が耐性菌となることから特に注意が必要である。検出されたCPEの遺伝子型はIMP-6とGES-24であり、12株のGES-24について詳細に解析したところ、複数菌種を含む菌株間でblaGES-24を含むプラスミドが水平伝達したことが示唆された。また、他の耐性菌についても解析を実施した。これらにより、県内の発生状況を把握することができ、院内感染予防やアウトブレイク発生時の対応に寄与することが可能となった。

シンポジウム II

大阪府における薬剤耐性菌の現状と対策

大阪府立公衆衛生研究所 感染症部 細菌課

主任研究員 河原隆二

近年、薬剤耐性菌の著しい増加が問題となっており、グローバルな課題として各国が連携して取り組んでいくことが求められている。これを受けて、我が国でも2016年4月に「薬剤耐性(AMR)対策アクションプラン」が策定された。このアクションプランでは、薬剤耐性菌のサーベイランスが対策の5つの柱の1つと位置づけられている。いわゆる、感染症発生動向調査(NESID)や院内感染対策サーベイランス(JANIS)の拡充によって実現するとされ、それを担う主要機関として、国の機関に加えて保健所・地方衛生研究所も記載されている。