

3・3 誌上発表論文抄録

Multiplex PCR assay for identification of three major pathogenic *Vibrio* spp., *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and *Vibrio vulnificus*
Hidemasa Izumiya ^{*1}, Kazutoshi Matsumoto ^{*2}, Shunsuke Yahiro ^{*3}, Jiyoung Lee ^{*1},
Masatomo Morita ^{*1}, Shouji Yamamoto ^{*1}, Eiji Arakawa ^{*1}, Makoto Ohnishi ^{*1}

Molecular and Cellular Probes, 25, 174–176 (2011)

A multiplex PCR assay was developed based on *atpA*-sequence diversification for molecular identification of 3 major pathogenic *Vibrio* species: *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and *Vibrio vulnificus*. It specifically identified them from among 133 strains of various *Vibrio* species and other genera, and was applicable for testing seawater, suggesting its usefulness

^{*1}Department of Bacteriology I, National Institute of Infectious Diseases, ^{*2}Present Address : Kikuchi Public-Health Center, Department of Health and Social Services, Kumamoto Prefectural Government, ^{*3}Present Address : Division of Pharmacology, Department of Health and Social Services, Kumamoto Prefectural Government.

Human sapovirus classification based on entire capsid nucleotide sequences

Tomoichiro Oka ^{*1}, Kohji Mori ^{*2}, Nobuhiro Iritani ^{*3}, Seiya Harada You Ueki ^{*4},
Setsuko Iizuka ^{*5}, Keiji Mise ^{*6}, Kosuke Murakami ^{*1}, Takaji Wakita ^{*1}, Kazuhiko
Katayama ^{*1}

Archives of Virology, 157, 349-352 (2012)

The genetically diverse sapoviruses (SaVs) are a significant cause of acute human gastroenteritis. Human SaV surveillance is becoming more critical, and a better understanding of the diversity and distribution of the viral genotypes is needed. In this study, we analyzed 106 complete human SaV capsid nucleotide sequences to provide a better understanding of their diversity. Based on those results, we propose a novel standardized classification scheme that meets the requirements of the International Calicivirus Scientific Committee. We believe the classification scheme and strains described here will be of value for the molecular characterization and classification of newly detected SaV genotypes and for comparing data worldwide.

^{*1}Department of Virology II, National Institute of Infectious Diseases, ^{*2}Tokyo Metropolitan Institute of Public Health, ^{*3}Osaka City Institute of Public Health and Environmental Sciences, ^{*4}Miyagi Prefectural Institute of Public Health and Environment, ^{*5}Shimane Prefectural Institute of Public Health and Environmental Science, ^{*6}Sapporo Medical University Center for Medical Education,

Identification and characterization of the short variable region of the Japanese encephalitis virus 3' NTR

Fumihiko Kato ^{*1} ^{*2}, Akira Kotaki ^{*1}, Yukie Yamaguchi ^{*1}, Hajime Shiba ^{*2}, Kuniaki Hosono ^{*2}, Seiya Harada, Masayuki Saijo ^{*1}, Ichiro Kurane ^{*1}, Tomohiko Takasaki ^{*1}
and Shigeru Tajima ^{*1}

Virus Genes, 44, 191-197 (2012)

Since the 1980s, the Japanese encephalitis virus (JEV) variants with slightly short variable regions (VR) of the 3' non-translated region (NTR) have been found; however, the implications of these short VR remain unclear. We recently identified two novel types of short VR (5 and 9 nt shorter than that of major group of genotype I JEV strains) of genotype I JEV isolates. To elucidate the impact of these short VR on the replication and virulence of JEV, we generated five recombinant JEV viruses: M41-d5 and M41-d9 have deletions in the VR that correspond to those observed in some recent JEV isolates, M41-d5d9 has both the 5- and 9-nt deletions in the VR, M41-d27 has a large deletion that encompasses both the 5- and 9-nt deletion regions, and M41-a13 has a 13-nt sequence insertion of the genotype III JEV strain Beijing-1 into the parent genotype I JEV strain Mie/41/2002 genome.

The recombinant viruses and the parent virus, except for the M41-d27 mutant, showed similar growth properties in mammalian and mosquito cell lines. Mouse challenge experiments indicated that no significant differences among the recombinant viruses M41-d5d9, M41-d27, M41-a13, and the parent virus. Our results suggest that the short VR in JEV 3' NTR do not affect its growth in vitro or its pathogenicity in mice.

^{*1} Department of Virology 1, National Institute of Infectious Diseases, ^{*2} Graduate School of Bioresource Sciences, Nihon University

Determination of Histamine in Seafood by Hydrophilic Interaction Chromatography/Tandem Mass Spectrometry

Tatsuo Yoshida, Hirotohi Hamada, Hiroshi Murakawa, Hidekazu Yoshimoto ^{*1},
Toshiaki Tobino and Kei Toda ^{*2}

Analytical Sciences, 28 , 179-182 (2012)

A simple method was developed to determine histamine, an important compound in chemical food poisoning, by extraction followed by hydrophilic interaction chromatography-tandem mass spectrometry using a hydrophilic column with sulfobetaine-type zwitterion groups. The quantitation range in seafood products was from 0.4 to 200 mg kg⁻¹ for 5 g food samples. Quantitative recoveries were obtained with four types of seafood product. These results agreed well with those from the more complex, conventional HPLC method, which requires sample derivatization with dansyl chloride.

^{*1} Present Address : Public Health Emergencies Management Division, Kumamoto Prefectural Government, ^{*2} Department of Chemistry, Kumamoto University

3・4 調査，研究報告抄録

熊本県におけるイノシシ，シカ及びブタの E 型肝炎保有状況等調査

原田誠也，西村浩一，田中智之^{*1}，石井孝司^{*2}，李天成^{*2}

厚生労働科学研究費補助金(食品の安心・安全確保推進研究事業)「食品中の病原ウイルスのリスク管理に関する研究」研究分担報告書

イノシシ，シカ及びブタの E 型肝炎ウイルス(HEV)保有状況及びブタ血清中の IgG 抗体保有率を調査した。これまでの調査で，HEV 遺伝子はシカからは全く検出されなかったが，イノシシの 9.2%から検出された。一方，ブタでは血清から 0.09%であったが，廃棄肝臓の 6%から検出された。また，ブタ血清の 72%が HEV に対する IgG 抗体陽性であり，養豚場間で抗体保有率に大きな差がみられたことから，ブタへの HEV 感染は飼育環境等に影響されていることが推察された。

^{*1}堺市衛生研究所，^{*2}国立感染症研究所

熊本県におけるヒトライノウイルス(HRV)の分子疫学

清田直子，西村浩一^{*1}，原田誠也，野田雅博^{*2}，木村博一^{*2}

厚生労働科学研究費補助金(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)
「重症呼吸器ウイルス感染症のサーベイランス・病態解明及び制御に関する研究」
総括・分担研究報告書

熊本県における急性呼吸器感染症(ARIs)ウイルスの実態を明らかにするため，2009年4月～2011年12月の間に ARIs 患者から採取された咽頭ぬぐい液および鼻腔ぬぐい液 239 検体のウイルス検索を実施した。その結果，100 検体(41.8%)から ARIs ウイルスが検出された。内訳は，ヒトライノウイルス(HRV)が 38 件，Respiratory syncytial ウイルスが 26 件，パラインフルエンザウイルスが 12 件，ヒトメタニューモウイルスが 7 件，ヒトコロナウイルスが 3 件，ボカウイルスが 3 件，エンテロウイルスが 22 件，アデノウイルスが 3 件検出された。また，検出された HRV について系統樹解析を行ったところ，主に species A および C が検出され，それらは多くの type に分類されたことから，様々な type の HRV が流行していた可能性が考えられた。

^{*1}熊本県健康福祉部薬務衛生課，^{*2}国立感染症研究所

九州地区における食品由来感染症調査における分子疫学的手法に関する研究

-IS-printing System の精度管理-

江藤良樹^{*1}，市原祥子^{*1}，堀川和美^{*1}，麻生嶋七美^{*2}，寺西泰司^{*3}，西桂子^{*4}，
右田雄二^{*5}，江原裕子^{*6}，緒方喜久代^{*7}，徳岡英亮，杉谷和加奈^{*8}，吉野修司^{*9}，
田まどか^{*10}，久高潤^{*11}

厚生労働科学研究費補助金(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)
「食品由来感染症調査における分子疫学手法に関する研究」

総括・分担研究報告書

IS-printing system(ISPS)の精度管理を，九州ブロック 12 施設を対象に実施した。今回は，判定困難な「明瞭なエクストラバンド」をもつ 7 株の DNA を使用した。その結果，精度管理に使用した 7 株の ISPS 型別は，12 施設のうち 8 施設が期待される結果と異なっていた。原因は，明瞭なエクストラバンドの誤判定，PCR エラー，薄いエクストラバンドの誤判定，アガロースゲル電気泳動におけるバンドの出現位置のズレ，及び単純入力ミスの 5 項目であった。

^{*1}福岡県保健環境研究所，^{*2}福岡市保健環境研究所，^{*3}北九州市環境科学研究所，^{*4}佐賀県衛生薬業センター，^{*5}長崎県環境保健研究センター，^{*6}長崎市保健環境試験所，^{*7}大分県衛生環境研究センター，^{*8}熊本市環境総合研究所，^{*9}宮崎県衛生環境研究所，^{*10}鹿

児島県環境保健センター，^{*11} 沖縄県衛生環境研究所

熊本県における放射能調査

豊永悟史，上野一憲，北岡宏道

文部科学省：第53回環境放射能調査研究成果論文抄録集（平成22年度）

文部科学省委託として平成22年度に実施した環境放射能水準調査結果について報告した。降水，大気浮遊じん，降下物，降水（蛇口水），土壌，精米，茶，牛乳，野菜（大根及びホウレン草）及び空間放射線量率について調査した結果，平成23年3月に採取した降下物において，¹³¹Iが平成元年の調査開始以来初めて検出された。その他の環境試料中の放射能及び空間線量率については，ともに前年度と同程度のレベル内にあり，特に異常値は認められなかった。

3・5 学会，研究会発表抄録

3・5・1 所外における学会・研究会

熊本県における日本脳炎ウイルスの活動状況調査と分離株の分子系統樹解析

清田直子，西村浩一^{*1}，小滝徹^{*2}，高崎智彦^{*2}，原田誠也

第46回日本脳炎ウイルス生態学研究会 平成23年5月20～21日 石川県

ブタ血清中のJEV抗体調査（流行予測感染源調査），JEV遺伝子検査，JEV分離，分離ウイルスの遺伝子解析を行った。抗体調査では，飼育地域によってJEV感染率に違いが見られ，飼育地域の選択の必要性，JE注意喚起基準見直しの必要性が示唆された。また，遺伝子検査では，JEV遺伝子の検出期間は7月下旬～9月上旬の約1ヶ月間であり，熊本県ではこの期間にブタで流行することが示唆された。2005～2010年に分離されたJEV25株の系統樹解析により，全株が遺伝子型I型であり，3'NCRには，ストップコドンの少し下流に13塩基と2塩基の欠失が認められることがわかった。

^{*1} 現熊本県健康福祉部薬務衛生課，^{*2} 国立感染症研究所

生食用馬肉を共通食とする原因物質不明有症事例の原因究明と予防対策の検討

古川真斗，徳岡英亮，原田誠也，松本一俊^{*1}，八尋俊輔^{*2}，宮坂次郎^{*3}，斉藤守弘^{*4}，鎌田陽一^{*5}，入倉大祐^{*5}，松本博

平成23年度九州地区食品衛生監視員協議会研修会 平成23年9月2日 熊本市

平成23年度全国食品衛生監視員協議会研究大会 平成23年10月20～21日 東京都

近年，食後数時間程度で嘔吐や下痢を呈する一過性の原因物質不明有症事例が多数発生しており，対応に苦慮してきた。そのような中，国が全国の自治体に情報と検体の提供を依頼し，本格的な原因究明に着手した。*Sarcocystis fayeri*（以下「*S. fayeri*」という。）シスト/ブラディゾイト抽出液のウサギ毒性試験やループ試験による下痢原性の確認を実施したところ，*S. fayeri*がウサギ毒性や下痢原性を有することがわかった。馬肉の冷凍処理による*S. fayeri*シスト/ブラディゾイトの殺滅試験を実施したところ，一定の冷凍処理により*S. fayeri*が死滅し，人工胃液により毒性を担うと推定される15KDaタンパク質も消失することがわかった。

^{*1} 現熊本県菊池振興局保健福祉環境部，^{*2} 現熊本県健康福祉部健康局薬務衛生課，^{*3} 熊本県食肉衛生検査所，^{*4} 埼玉県食肉衛生検査センター，^{*5} 国立医薬品食品衛生研究所

Serological and molecular investigation of canine leptospirosis in Japan

Nobuo Koizumi^{*1}，Maki Muto^{*1}，Shigehiro Akachi^{*2}，Kazumi Horikawa^{*3}，Seiya Harada，Makoto Ohnishi^{*1}

International Union of Microbiological Societies 2011 Congress (IUMS 2011 Congress)，10 September，Sapporo.

Since 2007 we have been conducting surveillance of canine leptospirosis in ten prefectures in Japan. From 2007 to 2010, 152 of the 277 clinically suspected cases were found to be positive for leptospirosis. Mortality rate was 57% (81/141). Anti-*Leptospira* antibodies were detected in 43% of the serum samples (115/269). The predominant reactive serogroups were Hebdomadis (57%) and Autumnalis (19%). *Leptospira* were isolated from 45 dogs. All of the isolates were deduced to be *L. interrogans* by partial *flaB* nucleotide sequencing. The serogroups of the isolates were identified as Australis (15), Autumnalis (5), Canicola (1), Hebdomadis (22), Icterohaemorrhagiae (1), and an unidentified serogroup (1). This study revealed that canine leptospirosis occurs in broad area of Japan.

^{*1} Department of Bacteriology, National Institute of Infectious Diseases, ^{*2} Mie Prefecture Health

and Environment Research Institute, ^{*3} Fukuoka Institute of Health and Environmental Sciences,

Surveillance of pathogens in outpatients with gastroenteritis and genetic analysis of Sapovirus strains between 2002 and 2010 in Kumamoto prefecture, Japan

Seiya Harada, Koichi Nishimura ^{*1}, Mineyuki Okada ^{*2}, Kazuhiko Katayama ^{*3}, Tomoichiro Oka ^{*3}

IUMS 2011 Congress, 13 September, Sapporo.

A Total of 1326 stool specimens were tested for the presence of diarrhea pathogens by reverse transcription-PCR and bacterial culture. The specimens were from outpatients with acute gastroenteritis who consulted four pediatric clinics in Kumamoto Prefecture, Japan, from June 2002 to December 2010. Of these, 828 (62.4%) were positive for diarrhea pathogens. Among them were norovirus (NoV) in 453 (54.7%), sapovirus (SaV) in 139 (16.8%), rotavirus in 121 (14.6%), adenovirus in 65(7.9%), enterovirus 58 (6.8%), astrovirus in 26 (3.1%), aichivirus in 1 (0.1%), and bacterial pathogens in 32 (3.9%). Mixed infection (co-infection of viruses and/or bacteria) was found in 64 (7.7%) of the 828 pathogen positive stool samples. NoV was the most prevalent pathogen throughout the study period, however, the SaV showed unexpectedly high detection rate and was found to be the secondary pathogen in 2005, 2007 and 2009. Genetic analysis of SaV with 139 strains demonstrated that SaV strains belonging to genogroup IV suddenly emerged to become the leading genogroup in 2007 and dynamic genogroup changes occurred in a restricted geographic area. This study showed that infectious acute gastroenteritis caused by SaV is not as rare as thought previously.

^{*1} Present Address : Division of Pharmacology, Department of Health and Social Services, Kumamoto Prefectural Government, ^{*2}Chiba Prefectural Toso Meat Inspection Office, ^{*3} Department of Virology II, National Institute of Infectious Diseases

Newly Developed a Multiplex real-time RT-PCR Method to Detect Norovirus and Sapovirus

Shinichiro Shibata ^{*1}, Akari Kodaira ^{*1}, Kohji Mori ^{*2}, Seiya Harada, Tomoichiro Oka ^{*3}, Kazuhiko Katayama ^{*3}

IUMS 2011 Congress, 13 September, Sapporo.

To detect multiple genogroups and genotypes of norovirus (NoV) and sapovirus (SaV) in a single tube, we newly developed a multiplex real-time RT-PCR method to detect NoV and SaV from stool specimen. We designated NoV and SaV detection primers and probes based on Kageyama et al JCM 41:1548-57, 2003, JCM 42, 2988-2995, 2004 and Oka et al JMV 78, 1347-53, 2006. NoV GI probe was labeled with Cy5 and BHQ®, GII was labeled with Yakima Yellow TM and Eclipse®. SaV probe was labeled with FAM and MGB. These probes and primers were used in single test well to amplify and detect NoV and/or SaV amplicons produced from random primed cDNA. Multiplex RT-PCR was performed with QuantiTect Multiplex PCR kit (QIAGEN) and LightCycler 480 II (Roche). Our multiplex method showed the same sensitivity and specificity for each virus specific real-time RT-PCR. We succeeded to detect and quantitate not only several NoV GI and GII genotypes but also GI and GII in mixed infection. Furthermore, we also detected and quantitated double infection of NoV and SaV. This method is quite useful to screen viral gastroenteritis cases.

^{*1} Nagoya City Public Health Research Institute, ^{*2} Tokyo Metropolitan Institute of Public Health, ^{*3} Department of Virology II, National Institute of Infectious Diseases

Natural Infection with Japanese encephalitis virus in Inhabitants of Kumamoto prefecture, Japan, from 2004 through 2010

Eiji Konishi ^{*1} ^{*2}, Yoko Kitai ^{*1}, Koichi Nishimura ^{*3}, Seiya Harada

IUMS 2011 Congress, 15 September, Sapporo.

To survey recent status of natural infection with Japanese encephalitis (JE) virus in Kumamoto, we used sera collected as a part of a national JE surveillance program in 2004-2010 and examined them for antibodies to nonstructural 1 (NS1) protein of JE virus. Detection of NS1 antibodies in an individual implements acquisition of the individual with natural infection with JE virus, but not vaccination with inactivated JE vaccine, thus differentiating infected from uninfected individuals among a vaccinated population. Annual infection rates ranged from 0.8% to 2.7% during the survey period. In addition to the NS1 antibody strategy, we used neutralizing antibodies to estimate natural infection rates. The mean annual infection rates calculated from percentages of populations with detectable neutralizing antibodies but with no vaccination history was 2.3% in 2004-2010. These results indicated that Kumamoto inhabitants are still exposed to natural infection with JEV, suggesting that JE virus remains present and active in nature in south and west Japan. Therefore, continuing a vaccination program is indispensable to prevent JE in humans.

^{*1} Department of International Health, Kobe University Graduate School of Health Sciences, ^{*2} Center for Infectious Diseases, Kobe University Graduate School of Medicine, ^{*3} Present Address : Division of Pharmacology, Department of Health and Social Services, Kumamoto Prefectural Government

***eaeA* 保有大腸菌が主因と推定された食中毒事例について**

古川真斗, 徳岡英亮, 浴永圭吾^{*1}, 東竜生^{*1}, 原田誠也

第 32 回日本食品微生物学会学術総会 平成 23 年 10 月 6~7 日 東京都

平成 23 年 5 月に, 飲食店を原因施設とする摂食者 94 名中, 有症者 48 名 (発症率: 51%) の食中毒が発生した。潜伏期間は平均 19 時間, 主要症状は腹痛, 下痢, 頭痛及び発熱であった。検査の結果, 大部分の有症者及び一部の従業員から *eaeA* のみを保有する大腸菌が検出された。さらに, 検出数は少ないものの, VT2 及び *astA* を保有する EHEC も検出された。そこで, 生化学性状, 薬剤感受性試験, パルスフィールド・ゲル電気泳動 (PFGE) 分析を実施した。生化学性状は, 各々の大腸菌で全て一致し, *eaeA* 保有大腸菌のみテトラサイクリンに耐性を示した。PFGE 分析では各々の分離株でほぼ同様の泳動パターンを示した。*eaeA* 保有大腸菌が主因と推定された事例ではあるが, 原因食品を特定することはできなかった。

^{*1} 熊本県天草地域振興局保健福祉環境部

熊本県におけるイノシシ, ブタ及びシカの E 型肝炎ウイルス保有状況に関する実態調査

西村浩一^{*1}, 原田誠也, 李天成^{*2}, 石井孝司^{*2}, 田中智之^{*3}, 野田衛^{*4}

第 32 回日本食品微生物学会学術総会 平成 23 年 10 月 6~7 日 東京都

イノシシ 127 頭 206 検体のうち, 約 10%にあたる 12 頭 17 検体 (筋肉 2, 肝臓 11, 血液 4) から HEV 遺伝子が検出された。また, ブタの放血液 822 検体のうち, 2 検体(0.2%)から HEV 遺伝子が検出された。一方, シカ肉等からは HEV 遺伝子は検出されなかった。イノシシから検出された HEV 遺伝子の RFLP 解析では, *HhaI*, *SacI* 及び *StyI* による切断パターンの組合せにより 3 種類に分類された。ブタから検出された HEV 遺伝子の切断パターンはイノシシ由来 HEV 遺伝子の 3 種類の切断パターンと異なっていた。

^{*1} 現熊本県健康福祉部健康局薬務衛生課, ^{*2} 国立感染症研究所, ^{*3} 堺市衛生研究所, ^{*4} 国立医薬品食品衛生研究所

免疫磁気ビーズ法による標的細菌の効果的な分離について

原田誠也

第 4 回微生物検査を考える研究会 平成 23 年 10 月 29 日 福岡市

免疫磁気ビーズ法（ビーズ法）は、標的物質に対する抗体を感作した微細磁気ビーズを用いて、抗原抗体反応により標的物質を捕捉・濃縮し、効果的に分離する方法である。細菌検査の分野では、1996年に発生したEHEC O157食中毒多発事例を受け、食品からわずかな汚染 O157 を効果的に検出する方法として、1997年に厚生労働省が通知した EHEC O157 の検査法に採用された。ビーズ法は操作上の注意さえ守れば大変有効な検査法であり、現在、数社から EHEC O157, O26 及び O111 の集菌用ビーズが販売されている。

熊本県における日本紅斑熱の疫学調査

大迫英夫, 古川真斗, 徳岡英亮, 松尾 繁^{*1}, 松本一俊^{*2}, 八尋俊輔^{*3},
本田俊郎^{*4}, 山本正悟^{*5}, 安藤秀二^{*6}, 猪熊 壽^{*7}, 和田正文^{*8}, 原田誠也
獣医学術九州地区学会 平成 23 年 10 月 30 日 長崎
獣医学術学会年次大会 平成 24 年 2 月 3 日 北海道

熊本県では日本紅斑熱(JSF)が 2007 年以降、天草地域を中心に患者が増加した。そこで我々は、患者及び患者発生地域のマダニ、野鼠類及びイノシシの調査に取り組んだ。

その結果、痲皮 5 検体及び血液 3 検体が PCR 法で Rj 陽性となり、血液 2 検体から Rj が分離された。アカネズミ 1 匹の肝臓と脾臓が PCR 陽性を示し、シーケンス解析で Rj と確認された。イノシシは全頭が 40~640 倍以上の抗体価を示したが、血液は全て PCR 陰性であった。野外捕獲マダニは 2 属 4 種 47 匹がリケッチア属陽性、ヤマアラシチマダニ (Hh) 4 匹が Rj 陽性と判定され、Hh の若虫と成虫雌各 1 匹から Rj が分離された。イノシシ付着マダニは、PCR 検査で 3 種 11 検体がリケッチア属陽性で、シーケンス解析で Rj 遺伝子と同一と判定された。以上の結果から、熊本県の日本紅斑熱はアカネズミを感染巣、Hh を主な媒介マダニとする感染経路が考えられた。また、イノシシは Rj 保有マダニの生息域拡大に関与していると考えられた。なお、マダニから Rj 以外のリケッチア属遺伝子も複数検出されており、今後も調査を継続する予定である。

^{*1} 現熊本県芦北地域振興局保健福祉環境部, ^{*2} 現熊本県菊池振興局保健福祉環境部,

^{*3} 現熊本県健康福祉部薬務衛生課, ^{*4} 鹿児島県立大島病院, ^{*5} 宮崎大学,

^{*6} 国立感染症研究所, ^{*7} 帯広畜産大学, ^{*8} 上天草総合病院

Rapid Detection kit for Norovirus and Sapovirus with Virus Specific Monoclonal Antibodies

Tomoyuki Tanaka^{*1}, Noritoshi Kitamoto^{*2}, Tomoichiro Oka^{*3}, Tomoko Nishiguchi^{*1},
^{*1} Tatsuya Miyoshi^{*1}, Kiyoko Uchino^{*1}, Hisaaki Yoshida^{*1}, Setsuko Iizuka^{*4},
Yoshiharu Morino^{*5}, Yasutaka Yamashita^{*6}, Seiya Harada, Naokazu Takeda^{*7} and
Kazuhiko Katayama^{*7}

The 5th Medical Biotech Forum, November 7-9 Beijing, China

Past four years surveillance studies of acute gastroenteritis in Japan revealed that NoV genogroup II (GII) is the most causative agent then follow Sapovirus (SaV) and NoV GI. Virus-like particles (VLPs) which produced by Baculovirus expression system of NoV capsid genome contributed so much progression for NoV diagnosis. We produced monoclonal antibodies (MAbs) which react with many genotypes of NoV. With these MAbs two rapid antigen detection methods were constructed, in which ELISA is able to detect many field samples within three hours and immunochromatography (IC) requires only 15 minutes for the results with more than 80% sensitivity and specificity. On the other hand, SaV is the second pathogen of viral gastroenteritis. MAbs against SaV were also produced with SaV VLPs and opened to constructed for IC MAbs against SaV is the most emergent strategy for complete SaV antigen detection kit. IC detection kit is simple, not time consuming for diagnosis and no need for specific equipments etc which bring to cost benefit for the viral gastroenteritis burden.

^{*1}Sakai Institute of Public Health, ^{*2}School of Human Science and Environment, University of

Hyogo, ^{*3}National Institute of Infectious Diseases, ^{*4} Shimane prefectural institute of Public Health and Environmental Science, ^{*5} Wakayama City institute of Public Health, ^{*6} Ehime prefectural institute of Public Health and Environmental Science, ^{*7} Department of Molecular Virology, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University

熊本県における日本紅斑熱の発生状況と媒介ダニの調査

大迫英夫, 松本一俊 ^{*1}, 松尾繁 ^{*2}, 八尋俊輔 ^{*3}, 和田正文 ^{*4}, 本田俊郎 ^{*5}, 猪熊壽 ^{*6}, 山本正悟 ^{*7}, 安藤秀二 ^{*8}, 原田誠也

第 18 回リケッチア研究会 平成 24 年 2 月 12 日 大阪

熊本県では 2007 年から日本紅斑熱患者が急増したため、感染実態の把握と発生防止に寄与すべく、患者多発地域におけるマダニ類及び野鼠類、イノシシ及び県内の保健所で抑留された犬付着マダニの調査を行った。

発生地域は天草地域が 61 名と最も多かった。患者の年齢は 70 歳代が最も多く 46% だった。刺し口の痂皮 6 検体、全血 2 検体が PCR 法陽性となり、そのうち血液 2 検体から Rj が分離された。野外採取マダニは、ヤマアラシチマダニ (Hh) の若虫及びメス各 1 匹から Rj が分離された。イノシシ付着マダニは PCR 結果は、Ri 特異的遺伝子陽性が 11 検体だった。イノシシの血液からは、40 倍～640 倍の抗体価を全ての検体に認めたが、リケッチア属遺伝子は認めなかった。犬マダニの PCR 結果は、8 検体がリケッチア属遺伝子陽性だった。野鼠はアカネズミ 1 匹の肝臓と脾臓が PCR 法で Rj 陽性で、シーケンス解析により Rj と同定された。

以上の結果から、アカネズミを感染巣、Hh を媒介マダニとする感染経路が考えられた。患者の多発地域で捕獲したイノシシ付着マダニから、Rj 遺伝子を検出していることから、イノシシが Rj 保有マダニの生息域拡大に関与している可能性が考えられた。犬マダニからリケッチア属遺伝子を検出した。今後これらの遺伝子解析を行う予定である。

^{*1} 現熊本県菊池振興局保健福祉環境部, ^{*2} 熊本県芦北地域振興局保健福祉環境部,

^{*3} 現熊本県健康福祉部薬務衛生課, ^{*4} 上天草総合病院,

^{*5} 鹿児島県立大島病院, ^{*6} 宮崎大学, ^{*7} 帯広畜産大学, ^{*8} 国立感染症研究所

冷凍による馬肉の性状変化と住肉孢子虫殺滅法の検討

原田誠也, 古川真斗, 清水繁樹 ^{*1}, 林田安生 ^{*1}, 福田和光 ^{*1} 他

日本冷凍空調学会「最新の食品冷凍・解凍の技術 熊本セミナー・意見交換・技術相談会及びシンポジウム発表会」平成 24 年 3 月 15 日 熊本市

馬肉を共通食とする原因不明有症事例の原因究明と予防対策の検討を実施した。*Sarcocystis fayeri* (以下「*S. fayeri*」という。) シスト/ブラディゾイト抽出液のウサギ毒性試験やループ試験による下痢原性の確認を実施したところ、*S. fayeri* がウサギ毒性や下痢原性を有することがわかった。馬肉の冷凍処理による *S. fayeri* シスト/ブラディゾイトの殺滅試験を実施したところ、一定の冷凍処理により *S. fayeri* が死滅し、人工胃液により毒性を担うと推定される 15KDa タンパク質も消失することがわかった。また、冷凍による馬肉の性状変化についても検討を実施したが、冷凍によるドリップ生成や色の著しい変化はみられなかった。

^{*1} 熊本県産業技術センター

HILIC-MS/MSによる水産物中ヒスタミン分析法

吉田達雄, 濱田寛尚, 吉元秀和, 飛野敏明, 村川弘

第 37 回九州衛生環境技術協議会 平成 23 年 10 月 6～7 日 熊本市

第 48 回全国衛生化学技術協議会 平成 23 年 11 月 10～11 日 長野県

ヒスタミンは、顔面の紅潮、頭痛、じんま疹、発熱などのアレルギー症状などを引き起こす化学物質性食中毒の原因物質である。ヒスタミンの分析にはダンシル誘導体化、オンカラム蛍光誘導体化やキャピラリー電気泳動を用いる方法など煩雑な前処理を行う必要があり、分析操作に数時間を要する。そこで今回、ヒスタミンを簡易迅速に分析する方法の開発を目的として、煩雑な前処理を必要としない親水性相互作用クロマトグラフィー（HILIC）を用い、さらに化合物の選択性が高い LC/MS/MS を併用する分析方法を検討した。試験方法は、水産物を試料として標準品の添加回収試験により行った。更に、HILIC-MS/MS を用いて、ヒスタミンを含有する試料の定量を行うとともに、衛生試験法に示されているダンシル誘導体化と HPLC-FL を組み合わせた方法による定量を行った。両者の定量値を比較し、実試料への適用性の確認を行い、良好な結果が得られた。

ツキヨタケ中毒成分イルジンSにおける定性条件の設定及び単離分取法の検討

吉元秀和，飛野敏明，濱田寛尚，村川弘

第 37 回九州衛生環境技術協議会 平成 23 年 10 月 6～7 日 熊本市

平成 18 年から平成 22 年までの 5 年間でキノコによる食中毒が全国で 299 件発生しており、自然毒による食中毒の中で最も多い原因食品として挙げられる。そのなかでも、ツキヨタケによる食中毒が比較的、発生頻度が高い。今回、ツキヨタケの有毒成分であり標準品として市販のないイルジン S の確認条件を整えるとともに単離分取法を検討し、試験検査に対応可能な体制を整えたので報告する。

農作物及び土壌中のニテンピラム、CPMA及びCPMF分析法

吉田達雄，飛野敏明

第 34 回農薬残留分析研究会 平成 23 年 11 月 17～18 日 高知県

含水アセトニトリル抽出及び LC/MS/MS 測定を用いてニテンピラム及びその代謝物である CPMA、CPMF を同時に分析する方法を検討した。その中で、CPMA については最終溶液の含水率を上昇させることによりクロマトグラムピークの解離を防ぐことが可能となった。また農作物試料 4 種類（玄米、なす、メロン及びみかん）、土壌試料 1 種類（黒ボク土）に対して添加回収試験を行った結果、農作物試料で平均回収率 99～102%、土壌試料で 72～89%であった。この方法は、通知試験法に示された加水分解、誘導体化や精製カラム操作を必要とせず、簡易で迅速な方法である。

光化学オキシダント高濃度時における地上風の挙動（2010年度事例より）

村岡俊彦，北岡宏道，上野一憲，豊永悟史

第 52 回大気環境学会年会 平成 23 年 9 月 14～16 日 長崎県

大陸越境移流時における県内 Ox 濃度の地域差の要因を明らかにすることを目的として、2010 年 5 月 8 日及び 25 日の広域的 Ox 高濃度事例を、地上風の挙動に着目し、解析した。解析には県内大気汚染常時監視局データ等を使用した。8 日は、局地風が卓越する気象状況であったが、地域生成の影響が小さいと見られたため、日中の鉛直混合が地上 Ox 濃度上昇要因と推測され、一方、25 日は、一般風が地上で卓越する気象状況であったことから、高濃度 Ox を含む気流が夜間地上を通過し、Ox が高濃度となったと考えられた。

多成分同時分析法におけるベンゾイミダゾール系農薬の回収率向上の検討

中堀靖範

第 46 回日本水環境学会年会 平成 24 年 3 月 14～16 日 東京都

ベンゾイミダゾール系農薬のチオファネートメチル(TM)やチオファネート(TE)は分解しやすく、固相抽出カートリッジカラム（固相カラム）を使用した多成分同時分析で回収率が低くなりやすいことから、回収率の向上を目的として、主に固相カラム通水中の分解を抑制する手法について検討した。その結果、溶出液を濃縮せず定容する、固相カラムの塩酸処理、試料への L(+)-アスコルビン酸ナトリウムの添加により TM・TE の分解を抑制することができた。

3・5・2 第12回熊本県保健環境科学研究所研究発表会（平成23年11月24日）

A Study for the Methods of Improving the Level of Drinking Water in the Regions without Tap Water

—Centering at Social Welfare Facilities—

（忠清南道福祉施設の飲み水の実態調査）

韓国忠清南道保健環境研究院 龐恩玉

この研究は、忠清南道にある、社会福祉施設の中で、上水道が普及していない施設を対象とし、地下水及び浄水器の水質を把握するため実施したものである。分析項目は、環境部における「飲み水水質工程試験基準」に従って、微生物項目、健康上影響のある有害無機物質・有機物質項目及び風味に関する物質等、総計46項目を分析した。

分析の結果、微生物項目は浄水器通過水から高く検出され、陰イオン項目と濁度は、地下水から特に高く検出された。地下水についての満足度は92%と非常に高く、最も安全であると考えられる飲用水は水道水であることがわかった。

A Study of Water Quality Monitoring of groundwater in Chung-nam Province

（忠清南道の地下水水質のモニタリング）

韓国忠清南道保健環境研究院 烘顯美

本調査は、忠清南道地域の地下水に関する水質モニタリングを実施し、データベースを構築し、地下水の効率的な利用と管理対策に資する資料として活用するために実施したものである。

対象とした地下水は、2年間で一日の揚水容量が100トン以上で、農村地域から5地点、都市地域から5地点、工業地域から10地点等、合計20地点を選定し分岐別に試料水を採水し、飲み水の水質基準である46項目を分析した。

SPSS 統計プログラムを利用し分析した結果、pH、マンガン、亜鉛に顕著な水質変化があることが示された。また、降水量が多ければpHが低くなり、アンモニア性窒素が高くなっていることがわかった。

生食用馬肉を共通食とする原因物質不明有症事例の原因究明と予防対策の検討

古川真斗、徳岡英亮、原田誠也、松本一俊^{*1}、八尋俊輔^{*2}、宮坂次郎^{*3}、齊藤守弘^{*4}、鎌田陽一^{*5}、入倉大祐^{*5}、松本博

近年、食後数時間程度で嘔吐や下痢を呈する一過性の原因物質不明有症事例が全国的に増加している。これらの事例では、種々の生食用生鮮食品が共通食として報告されているが、本県では馬肉が共通食に含まれる事例が多くを占めている。今回、馬肉が共通食に含まれる有症事例の原因究明と予防対策の検討を行ったので報告する。

^{*1} 現熊本県菊池振興局保健福祉環境部、^{*2} 現熊本県健康福祉部健康局薬務衛生課、^{*3} 熊本県食肉衛生検査所、^{*4} 埼玉県食肉衛生検査センター、^{*5} 国立医薬品食品衛生研究所

熊本県における日本脳炎ウイルス（JEV）の活動状況調査と分離株の分子系統樹解析

清田直子、西村浩一、小滝徹^{*}、高崎智彦^{*}、原田誠也

日本脳炎の流行予測事業では、JEVの増幅動物である飼育ブタのHI抗体を検査し、HI抗体保有率が50%を超え、かつ新鮮感染が確認された時点で注意報を発令している。しかし近年、無作為にブタを検査すると抗体保有率の変動が大きく、時宜を得た注意喚起が難

しくなったことから、ブタの飼育地域と豚舎の影響を検討した。さらに、ブタ血清中の JEV 遺伝子検査、ウイルス分離及び分子系統樹解析を行ったので併せて報告する。

* 国立感染症研究所

水産物中ヒスタミン分析法の開発

吉田達雄，濱田寛尚，吉元秀和，飛野敏明，村川弘

高極性化合物の分析が可能な HILIC-MS/MS を用いることにより，化学物質性食中毒の原因となるヒスタミンを簡易迅速に分析する方法を開発した。この分析法は従来法と比較して，分析時間が 1/4 程度であり，ヒスタミン食中毒における迅速な原因究明に対して非常に有効な手法であると考えられる。

LC/MS/MS を用いたツキヨタケ中毒成分イルジン S 分析のための確認条件の設定及び単離精製法の検討

吉元秀和，飛野敏明，濱田寛尚，村川弘

自然毒食中毒において，比較的発生数の多い原因食品であるツキヨタケの有毒成分イルジン S について，LC/MS/MS による確認条件を設定し，単離精製法を検討した。当該物質の標準品は入手困難であるが，本研究によりツキヨタケ食中毒事件の迅速な検査体制が整備できた。

大気測定車による南阿蘇地域の光化学オキシダント濃度調査結果について

村岡俊彦，林英明，北岡宏道

大気常時監視局が近傍に無い南阿蘇地域の光化学オキシダント濃度挙動を明らかにすることを目的として，大気測定車による光化学オキシダント濃度の調査を H22・23 年度の春季に行った。今回調査より，夜間に比較的高濃度となる場合が見られる等，この地域の特徴が明らかとなった。

熊本県における環境放射能水準調査

豊永悟史，村岡俊彦，上野一憲，林英明，北岡宏道

昭和 61 年のチェルノブイリ原発事故を契機として，環境中の自然及び人工放射能の分布状況の把握を行うべく環境放射能水準調査（文部科学省委託）が全都道府県で行われてきており，熊本県でも平成元年度よりこの調査を実施している。今回は平成元年度以降の調査結果について報告する。

菊池地域における湧水の特徴について

永田武史，小笹康人，廣畑昌章*

菊池地域の 44 地点の湧水について，採水調査を実施し，イオン成分等の分析を行った。ふっ素については全ての地点で環境基準を下回っていた。硝酸性窒素については，2 地点で環境基準を超過する濃度の硝酸性窒素が検出された。また，昭和 62 年に実施した調査結果と比較した結果，大部分の湧水において硝酸性窒素が上昇している傾向がみられた。

*現環境生活部環境保全課

ゴルフ場農薬の一斉分析におけるチオファネートメチルの回収率向上の検討

中堀靖範

ベンゾイミダゾール系農薬のチオファネートメチル(TM)は，固相抽出カートリッジカラ

ム（固相カラム）を使用した多成分同時分析で回収率が低くなりやすいことから、回収率の向上を目的として、主に固相カラム通水中の分解を抑制する手法について検討した。その結果、不活性バイアルの使用、固相カラムの塩酸処理、試料への L(+)-アスコルビン酸ナトリウムの添加により **TM** の分解を抑制することができた。

ダイヤルインシステムによる

各部室への直通電話のご案内

(市外局番 0964)

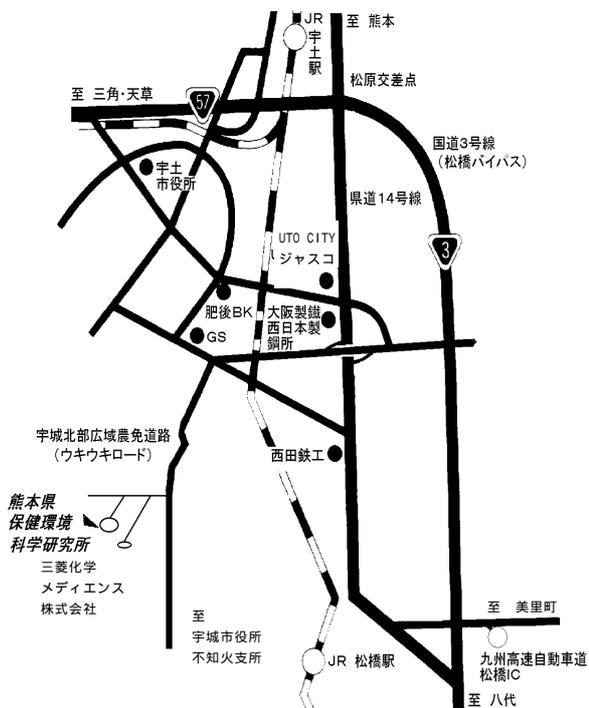
総務課(代) 23-5771

微生物科学部 23-5794

生活化学部 23-5795

大気科学部 23-5924

水質科学部 23-5936



平成 23 年度版 所報編集委員会

委員長	松本 博	
副委員長	菊住 彰一	
委員	徳岡 英亮	吉田 達雄
	村岡 俊彦	永田 武史

熊本県保健環境科学研究所報

平成 23 年度 第 41 号

2011

編集 熊本県保健環境科学研究所
〒869-0425
熊本県宇土市栗崎町 1240-1
T E L (0964) 23-5771 (代)
F A X (0964) 23-5260

熊本県保健環境科学研究所

〒869-0425 熊本県宇土市栗崎町1240-1

TEL (0964)23-5771(代) FAX (0964)23-5260

Kumamoto Prefectural Institute
of Public-Health and Environmental Science
1240-1 Kurisaki-machi, Uto City
Kumamoto 869-0425, Japan

発行者：熊本県

所属：保健環境科学研究所

発行年度：平成24年度