

1 学会誌への投稿

Iijima A, Kumagai K. Changes in Fine PM Pollution Levels with Tightening of Regulations on Vehicle Emissions. World Academy of Science, Engineering and Technology. 2012;72:1200-3.

A long-term campaign for monitoring the concentration of atmospheric Particulate Matter (PM) was conducted at multiple sites located in the center and suburbs of the Tokyo Metropolitan Area in Japan. The concentration of fine PM has shown a declining trend over the last two decades. A positive matrix factorization model elucidated that the contribution of combustion sources was drastically reduced. In Japan, the regulations on vehicle exhaust emissions were phased in and gradually tightened over the last two decades, which has triggered a notable reduction in PM emissions from automobiles and has contributed to the mitigation of the problem of fine PM pollution.

Okazaki K, Kusaka T, Kondo M, Kozawa K, Yoshizumi M, Kimura H. Temporal alteration of serum G-CSF and VEGF levels in perinatal asphyxia treated with head cooling. Cytokine. 2012;60(3):812-4.

OBJECTIVE: Granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) and vascular endothelial growth factor (VEGF) are thought to be associated with the pathophysiology of perinatal asphyxia. To clarify any such association, we analyzed the serum levels in neonates with perinatal asphyxia treated with head cooling.

STUDY DESIGN: Temporal alterations of serum G-CSF and VEGF levels were measured within 24h of birth in five neonatal cases of severe asphyxia treated with head cooling, five neonatal cases without head cooling, and four healthy neonatal cases.

RESULTS: G-CSF in sera markedly increased and sustained in severely asphyxiated neonates treated with head cooling, while VEGF decreased and remained low.

CONCLUSION: G-CSF and VEGF levels in sera might be associated with an early phase of brain protection after birth in severe asphyxia treated with head cooling.

Saitoh M, Takeda M, Gotoh K, Takeuchi F, Sekizuka T, Kuroda M, Mizuta K, Ryo A, Tanaka R, Ishii H, Takada H, Kozawa K, Yoshida A, Noda M, Okabe N, Kimura H. Molecular evolution of hemagglutinin (H) gene in measles virus genotypes D3, D5, D9, and H1. PLoS One. 2012;7(11):e50660.

We studied the molecular evolution of *H* gene in four prevalent Asian genotypes (D3, D5, D9, and H1) of measles virus (MeV). We estimated the evolutionary time scale of the gene by the Bayesian Markov Chain Monte Carlo (MCMC) method. In addition, we predicted the changes in structure of H protein due to selective pressures. The phylogenetic tree showed that the first division of these genotypes occurred around 1931, and further division of each type in the 1960–1970s resulted in four genotypes. The rate of molecular evolution was relatively slow (5.57×10^{-4} substitutions per site per year). Only two positively selected sites (F476L and Q575K) were identified in H protein, although these substitutions might not have imparted significant changes to the structure of the protein or the epitopes for phylactic antibodies. The results suggested that the prevalent Asian MeV genotypes were generated over approximately 30–40 years and H protein was well conserved.

Yoshida A, Kiyota N, Kobayashi M, Nishimura K, Tsutsui R, Tsukagoshi H, Hirano E, Yamamoto N, Ryo A, Saitoh M, Harada S, Inoue O, Kozawa K, Tanaka R, Noda M, Okabe N, Tashiro M, Mizuta K, Kimura H. Molecular epidemiology of the attachment glycoprotein (G) gene in respiratory syncytial virus in children with acute respiratory infection in Japan in 2009/2010. J Med Microbiol. 2012;61(Pt6):820–9.

This study performed a detailed genetic analysis

of the glycoprotein (G) gene of respiratory syncytial virus (RSV) detected in 50 Japanese children with acute respiratory infection (ARI) in the 2009/2010 season. A phylogenetic tree constructed by the neighbour-joining method showed that 34 and 16 of the RSV strains could be classified into subgroups A and B, respectively. Strains belonging to subgroups A and B were further subdivided into GA2 and BA, respectively. The nucleotide and deduced amino acid sequence identities were relatively high among these strains (>90%). The deduced amino acid sequences implied that a relatively high frequency of amino acid substitutions occurred in the C-terminal 3rd hypervariable region of the G protein in these strains. In addition, some positively selected sites were estimated. The results suggest that RSV with genotypes GA2 and BA was associated with ARI in Japanese children in 2009/2010.

Kon M, Watanabe K, Tazawa T, Watanabe K, Tamura T, Tsukagoshi H, Noda M, Kimura H, Mizuta K. Detection of human coronavirus NL63 and OC43 in children with acute respiratory infections in Niigata, Japan, between 2010 and 2011. *Jpn J Infect Dis.* 2012;65(3):270-2.

Human coronavirus (HCoV) is a member of the respiratory viruses that includes HCoV-229E, HCoV-OC43 and the severe acute respiratory syndrome (SARS) CoV. Recently, new types of HCoV, such as NL63 and HKU-1, have also been described. Poor growth and a lack of cytopathic effect in cell cultures were major deterrents to research on HCoV in the past. However, with the development of polymerase chain reaction (PCR) technology, the field of coronavirology has developed widely and rapidly. However, according to the Infectious Agents Surveillance Report, only 54 and 59 HCoV-positive cases, including 18 cases from Niigata, were reported in 2010 and 2011, respectively, in Japan. Although, we succeeded in isolating HCoV-229E viruses from children suffering nasopharyngitis using CaCo-2 cells in March 2008 and April 2010, we failed to isolate

any further HCoVs thereafter. Thus, we carried out a screening analysis targeting for HCoV using RT-PCR methods to clarify the epidemiology of this virus in Niigata, Japan. Between August 2010 and July 2011, 507 throat and nasal swab specimens were collected from patients with upper or lower acute respiratory infections at pediatric clinics working in collaboration with the Niigata Prefectural Health authorities as part of the national surveillance of viral diseases in Japan. Since we were able to isolate respiratory viruses from 376 specimens, we next investigated the presence of HCoV in the 131 specimens from which no other respiratory virus was isolated. Viral nucleic acid was extracted from the specimens. Then, we screened for the amplification of four HCoVs by multiplex PCR using outer sense and antisense primers and by heminested PCR, as reported previously with some modifications, using inner sense and outer antisense primers. Direct sequencing was used to determine the sequence of PCR products of 443bps and 328 bps for HCoV-OC43 and NL63, respectively. When the screening identified a HCoV-positive sample, we also amplified a part of the spike glycoprotein region by PCR using our original primers to construct a phylogenetic tree. As a result, we succeeded in detecting HCoV-OC43 in 10 and NL63 in 7 of the 131 specimens. Neither HCoV-229E nor HKU-1 was detected. The sequence data for the spike protein was available for all 17 HCoV-OC43- or NL63-positive specimens. The age distribution of the HCoV-positive patients was between 2 months and 9 years (average 2.3 years) and most of the patients (14/17: 82%) were less than 4 years old. Clinically, 15 patients presented with fever and 13 had upper respiratory infections. We found 5 and 2 NL63-positive cases in December 2010 and January 2011, respectively. Interestingly, the NL63-positive cases were all observed in winter, with the HCoV-OC43-positive cases observed thereafter. According to national surveillance in Japan, HCoV detection has been reported from only 8 prefectures

including Niigata, Osaka City and Mie. Therefore, the epidemiology of HCoV in Japan is not well clarified and HCoV surveillance may have been ineffective. We should continue to clarify the etiology and epidemiology of HCoV using a combination of virus isolation and molecular methods such as RT-PCR.

Nidaira M, Taira K, Hamabata H, Kawaki T, Gushi K, Mahoe Y, Maeshiro N, Azama Y, Okano S, Kyan H, Kudaka J, Tsukagoshi H, Noda M, Kimura H. Molecular epidemiology of human metapneumovirus from 2009 to 2011 in Okinawa, Japan. Jpn J Infect Dis. 2012;65(4):337-40.

To clarify the molecular epidemiology of human metapneumovirus (HMPV) in Okinawa Prefecture, located in a subtropical region of Japan, we performed genetic analysis of the *F* gene in HMPV from patients with acute respiratory infection from January 2009 to December 2011. HMPV was detected in 18 of 485 throat swabs (3.7%). Phylogenetic analysis showed that 17 strains belonged to subgroup A2 and 1 strain belonged to subgroup B1. We did not observe seasonal prevalence of HMPV during the investigation period. A high level of sequence identity was observed in the strains belonging to subgroup A2 (>95%), and no amino acid substitution was found compared with other strains detected in Japan and other countries. The pairwise distance values among the present strains belonging to subgroup A2 were short. Our results suggest that the predominant HMPV strains belonging to A2 are highly homologous and seasonal epidemics were not seen in Okinawa during the investigation period.

Obuchi M, Toda S, Tsukagoshi H, Oogane T, Abiko C, Funatogawa K, Mizuta K, Shirabe K, Kozawa K, Noda M, Kimura H, Tashiro M. Molecular analysis of genome of the pandemic influenza A(H1N1) 2009 virus associated with fatal infections in Gunma, Tochigi, Yamagata,

and Yamaguchi prefectures in Japan during the first pandemic wave. Jpn J Infect Dis. 2012; 65(4):363-7.

In May 2009, a novel swine-origin pandemic influenza A (H1N1) 2009 [A(H1N1)pdm09] virus was first identified in Osaka and Hyogo Prefectures, Japan, and then spread to other prefectures in the following several weeks. During the summer, pandemic influenza activity remained low, but it then increased and reached a peak in November 2009. In most cases, infection with A(H1N1)pdm09 virus has caused mild disease, but there have been sporadic cases with severe or fatal outcomes. An amino acid substitution of aspartic acid to glycine at position 222 (D222G) in hemagglutinin (HA) has been reported to be associated with severity in several countries; however, many A(H1N1)pdm09 virus isolates without this mutation have been identified in severe and fatal cases. To further explore the molecular determinants of pandemic influenza A (H1N1) virus associated with severity, we performed whole genome analysis of the virus isolates obtained from fatal cases in Gunma, Tochigi, Yamagata, and Yamaguchi prefectures between May 2009 and March 2010. Nasal swabs were collected from hospitalized influenza patients and sent to the district prefectural public health institute for diagnosis and viral strain surveillance. Clinical specimens were inoculated onto Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells for virus isolation. Viral RNA was extracted from the virus culture supernatant. RT-PCR was carried out using virus-specific primers established by the National Institute of Technology and Evaluation and the National Institute of Infectious Diseases, Japan. Amplicons were purified and sequenced. In Gunma, Tochigi, Yamagata, and Yamaguchi prefectures, a total of 12 fatal cases were reported to the Ministry of Health, Labour, and Welfare of Japan during the first pandemic wave. A(H1N1)pdm09 virus isolates were successfully obtained from 9 fatal case-patients aged 4 to 85 years. Of these patients, two developed pneumonia (Patients 6 and 9) and one developed multiple organ

failure (Patient 2). Patient 8 had a comorbidity, namely subarachnoid hemorrhage. Five patients had underlying diseases: chronic obstructive pulmonary disease in 3; multiple myeloma and diabetes mellitus in 1; and lung cancer in 1. Six patients were taking medication: oseltamivir in 4 and zanamivir in 2. In this study, no pandemic influenza-related deaths were reported in pregnant women. For comparison, we obtained 6 isolates from influenza patients with mild conditions (Patients 10 to 15). Nucleotide sequencing of viral whole genome segments, i.e., the polymerase basic 2 (PB2), polymerase basic 1 (PB1), polymerase acidic (PA), HA, nucleoprotein (NP), neuraminidase (NA), matrix (M) protein, and nonstructural (NS) protein genes, was conducted for all 15 viral isolates. The amino acid sequences of viral proteins were deduced from the nucleotide sequences. The consensus sequences of each segment consist of 2728 (PB2), 2312 (PB1), 2366 (PA), 4733 (HA), 2440 (NP), 4401 (NA), 3449 (MP), and 2376 (NS) nucleotide sequences, which were downloaded from the Global Initiative on Sharing All Influenza Data EpiFlu database (<http://platform.gisaid.org/dante-cms/struktur.jdante?aid=1131>). Amino acid substitutions, namely S203T in HA, V100I in NP, V106I and N248D in NA, and I123V in NS1, known as specific markers for cluster 2, were present in all analyzed sequences, indicating that these viral isolates belong to the cluster containing a large majority of circulating A(H1N1)pdm09 strains in Japan during the peak phase of the pandemic. No reassortment with other seasonal (either H1N1 or H3N2), swine, or avian influenza A viruses was detected. A total of 39 unique amino acid differences were shown in 9 isolates obtained from fatal cases: 5 in PB2, 4 in PB1, 9 in PA, 6 in HA, 2 in NP, 6 in NA, 3 in M2, 2 in NS1, and 2 in nuclear export protein (NEP). Of these differences, only V19I in HA was common to 2 isolates, A/Yamaguchi/217/2009 and A/Yamaguchi/248/2009. A marker for oseltamivir resistance, H275Y in NA, was identified in A/Yamaguchi/248/2009 derived from an

oseltamivir-treated patient. No D222G substitution in the HA was observed in any isolates analyzed in this study. Alternatively, a D222E substitution was found in an isolate, A/Yamaguchi/247/2009, derived from a fatal infection. This substitution, however, seems to be unrelated to the disease severity of the A(H1N1)pdm09 virus as reported previously. Another mutation in the receptor binding site, V132E, was found in both the isolates A/Tochigi/2/2010 (fatal case-strain) and A/Yamaguchi/273/2009 (mild case-strain), but the impact of this mutation is unclear. A mixed population of viruses possessing 163K/E in an antigenic site was found in an isolate, A/Yamaguchi/217/2009, derived from a fatal infection. The virus isolates derived from fatal cases had sporadic amino acid changes in the PB2 and PA proteins more frequently than did those from mild cases. Notably, 6 of 9 isolates from fatal cases had one or two amino acid substitutions in the PA, e.g., E2K, A70V, P325L, V387I, S405A, V432F, L589I, S594G. A limitation of this study is the relatively small set of data analyzed. The pathogenetic role of the virus mutations observed remains to be investigated further.

Kiyota N, Kushibuchi I, Kobayashi M, Tsukagoshi H, Ryo A, Nishimura K, Hirata-Saito A, Harada S, Arakawa M, Kozawa K, Noda M, Kimura H. Genetic analysis of the VP4/VP2 coding region in human rhinovirus species C in patients with acute respiratory infection in Japan. J. Med. Microbiol. 2013; 62(Pt4):610–7.

Detailed genetic analysis was carried out of the VP4/VP2 coding region in human rhinovirus species C (HRV-C) strains detected in patients with acute respiratory infection in Japan. Phylogenetic trees were constructed by the neighbour-joining (NJ) and maximum-likelihood (ML) methods. The NJ phylogenetic tree assigned 11 genotypes to the present strains, whilst the ML tree showed that the strains diversified sometime in the early 1870 s. Moreover, the pairwise distance among the present

strains was relatively long, and the rate of molecular evolution of the coding region was rapid (3.07×10^{-3} substitutions per site per year). The results suggest that the present HRV-C strains have a wide genetic divergence and a unique evolutionary timescale.

Kobayashi M, Tsukagoshi H, Ishioka T, Mizuta K, Noda M, Morita Y, Ryo A, Kozawa K, Kimura H. Seroepidemiology of Saffold cardiovirus (SAFV) genotype 3 in Japan. J Infect. 2013;66(2):191-3

A new virus, Saffold cardiovirus (SAFV) belonging to genus *Cardiovirus* of family *Picornaviridae* has been identified and characterized, but its pathogenesis is not yet fully understood. SAFV type 3 (SAFV3) is thought to be the major genotype and is relatively frequently detected in patients with acute gastroenteritis and respiratory illness. In attempts to elucidate the pathogenesis, we conducted a seroepidemiological study of SAFV3 in Japanese people. A total of 114 serum samples from subjects aged 0-66 years were collected in Gunma prefecture, Japan, in 2010. Subjects aged \leq years showed no evidence of infectious disease with minor congenital cardiac defect or inguinal hernia. Other subjects were healthy volunteers. All samples were collected after obtaining informed consent from subjects or their parents/guardians. We measured neutralization antibodies in the serum using a representative SAFV3 isolate from a child with upper respiratory infection. The neutralization antibody titer was measured using MRC-5 cells and results greater than or equal to 1:4 were considered positive. Antibodies against SAFV3 were found in 95.6% of samples. Notably, 100% of subjects aged <5 years had SAFV3 specific antibodies. The geometric mean titers (GMT) of neutralization antibodies to SAFV in subjects aged 0-1, 2-4, 5-10, 11-19, and <20 years were 30.7, 36.3, 72.9, 80.6, and 79.1, respectively. Subjects aged ≤ 5 years had significantly higher GMT of neutralizing antibodies to SAFV than those ≤ 4 years ($p < 0.05$). These

results suggest that SAFV3 is a common agent in our population. Indeed, more than 90% of individuals of 5 years of age showed evidence of exposure to SAFV3. To date, at least 8 genotypes of SAFV have been confirmed, but the pathogenicity and antigenicity of these viruses remain obscure. However, cases of severe SAFV infection have been reported. Thus, additional detailed epidemiological studies are needed to ascertain both the characteristics of each genotype of SAFV and the relationships between genotypes.

Sakano C, Kuroda M, Sekizuka T, Ishioka T, Morita Y, Ryo A, Tsukagoshi H, Kawai Y, Inoue N, Takada H, Ogaswara Y, Nishina A, Shimoda MA, Kozawa K, Oishi K, Kimura H. Genetic analysis of non-hydrogen sulfide-producing *Salmonella enterica* serovar typhimurium and *S. enterica* serovar infantis isolates in Japan. J Clin Microbiol. 2013;51(1):328-30.

Whole-genome sequencing of non- H_2S -producing *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *S. enterica* serovar Infantis isolates from poultry meat revealed a nonsense mutation in the *phsA* thiosulfate reductase gene and carriage of a CMY-2 β -lactamase. The lack of production of H_2S might lead to the incorrect identification of *S. enterica* isolates carrying antimicrobial resistance genes.

Wakai K, Sano H, Shimada A, Shiozawa Y, Park MJ, Sotomatsu M, Yanagisawa R, Koike K, Kozawa K, Ryo A, Tsukagoshi H, Kimura H, Hayashi Y. Cytomegalovirus retinitis during maintenance therapy for T-cell acute lymphoblastic leukemia. J Pediatr Hematol Oncol. 2013;35(2):162-3.

Children with acute lymphoblastic leukemia (ALL) may accompany with viral infection or reactivation such as cytomegalovirus (CMV) under stem cell transplantation (SCT). However, hemophagocytic lymphohistiocytosis (HLH) or retinitis due to CMV infection under chemotherapy has been rarely reported. Furthermore, primary CMV infection tended to occur in infancy in the

Japanese pediatric population, but now tends to occur later in childhood. Here, we describe a first ALL patient with retinitis and HLH due to CMV infection that occurred during maintenance therapy for T-cell ALL (T-ALL). The patient was a 7-year-old boy diagnosed with T-ALL at 5 years of age. He had no increased susceptibility to various infections on his past history and had no hypogammaglobulinemia at presentation. He was treated under Tokyo Children's Cancer Study Group (TCCSG) L04-16 HEX/BFM95 protocols followed by consolidation therapy for 10 months. He responded well to the induction therapy and obtained complete remission. After consolidation therapy for 10 months, maintenance therapy consisting of 6-mercaptopurine (6MP) and methotrexate (MTX) was started. At the 7 months of maintenance therapy, the dosages of 6MP and MTX were reduced because of occurrence of leukocytopenia. The leukocytopenia (less than $2 \times 10^3/\mu\text{L}$) gradually worsened and other symptoms such as fever, and hepato-splenomegaly appeared. On the first day of hospitalization, his clinical data were as follows: leukocyte count, $1,000/\mu\text{L}$; platelet count, $7.6 \times 10^4/\mu\text{L}$; hemoglobin concentration, 10.0 g/dL , and C-reactive protein level, 1.7 mg/dL (normal range, $<0.3 \text{ mg/dL}$). A significant decrease in CD4 positive cells was also seen ($33 \text{ cells}/\mu\text{L}$). Ectopic enzymes, alanine aminotransferase [ALT], lactate dehydrogenase [LDH], and γ -glutamyl transpeptidase (γ -GTP) were 55 IU/L , 475 IU/L , and 74 IU/mL , respectively. Serum ferritin concentration was very high ($10,385 \text{ ng/mL}$). A bone marrow smear revealed phagocytosis but no leukemic cells. According to the diagnostic guideline for HLH555, he was diagnosed with HLH from these clinical data, such as fever, hepatosplenomegaly, pancytopenia, hyperferritinemia, and phagocytosis. Cells containing inclusion bodies were found in urinary sediments ($5\text{--}10 \text{ cells/field}$ by microscopy). CMV genomes were found to be positive in white blood cells and serum by PCR. ELISA showed significant elevation of serum IgM against CMV, although this

was not detected in a serum sample before onset of fever. In addition, there was an increase in CMV p66 antigen (C7-HRP)-expressing leukocytes (12 of $47,000$ cells). However, Varicella-zoster virus (VZV) and Epstein-Barr virus (EBV) genomes were not detected in serum and leukocytes (<10 copies/ μg of purified DNA). From these clinical data, the patient was diagnosed with HLH due to primary CMV infection and treated with a steroid and γ -globulin. When the serum ferritin level decreased and the platelet count recovered, 6MP and MTX treatment was restarted. Although CMV antigenemia persisted, he had no treatment for CMV infection because of no clinical symptoms of CMV infection. Thereafter, retinitis (left eye) was observed by funduscopy. Ganciclovir was administered ($10 \text{ mg/kg/day} \times 7 \text{ days}$), followed by oral administration of valganciclovir ($900 \text{ mg/day} \times 21 \text{ days}$, followed by 450 mg/day), resulting in negative CMV antigenemia and improvement of retinitis. In the present case, we considered that the causative agent of HLH and retinitis was the primary CMV infection during maintenance chemotherapy. CMV retinitis is reported in $15\text{--}36\%$ of human immunodeficiency virus (HIV) infected patients and $0.2\text{--}8\%$ of patients who receive allogeneic SCT. Thus, both diseases might be associated with extremely low levels of CD4-positive cells during maintenance therapy. Indeed, a decrease in CD4-positive cells due to infections such as HIV may frequently be accompanied by retinitis due to CMV. Furthermore, there remains the possibility that steroid therapy for HLH sustained CMV antigenemia and caused retinitis. Therefore, anti-CMV drugs might be required at an earlier phase. In conclusion, CMV infection should be considered not only during allogeneic SCT, but also during chemotherapy. It has been reported that primary CMV infection tended to occur in infancy in the Japanese pediatric population, but nowadays tends to occur later in childhood. Thus, the number of pediatric ALL patients with primary CMV infection during chemotherapy is expected to increase in future.

Nakamura M, Hirano E, Ishiguro F, Mizuta K, Noda M, Tanaka R, Tsukagoshi H, Kimura H. Molecular epidemiology of human metapneumovirus from 2005 to 2011 in Fukui, Japan. Jpn J Infect Dis. 2013;66(1):56-9.

To investigate the molecular epidemiology of human metapneumovirus (HMPV) infections in acute respiratory infections (ARI), we performed genetic analysis of the *F* gene in HMPV from patients with ARI in Fukui Prefecture from August 2005 to July 2011. HMPV was detected in 53 of 741 nasopharyngeal swabs (7.2%). Phylogenetic analysis helped us assign 31 strains to subgroup A2, 1 strain to subgroup B1, and 21 strains to subgroup B2. The prevalence of HMPV was peaked between January and June. A high degree of nucleotide identity was seen among subgroup A2 strains (95.6-100%) and subgroup B2 strains (97.5-100%). In addition, no positively selected sites (substitutions) were found in the *F* gene in these HMPV strains. The results suggest that the prevalent HMPV strains in Fukui were associated with various ARI in Japan during the investigation period.

2 学会等での発表

小林美保, 吉田綾子, 筒井理華, 塚越博之, 清田直子, 西村浩一, 平野映子, 野田雅博, 岡部信彦, 木村博一. 2009/2010 シーズンに国内で検出されたRSウイルスG遺伝子の分子疫学. 第86回日本感染症学会, 長崎市 (2012年4月)

【はじめに】Respiratory syncytial virus (RSV)は、小児を中心に急性呼吸器感染症 (ARI)を引き起こす主要な病原体である。しかし、本邦におけるRSVの疫学には未だに不明な点が多いと推定される。RSVの主要な構造タンパク質であるglycoprotein (G)は、細胞レセプターへの結合や抗原性に関連があることが示唆されており、RSVの病原性や感染制御等への理解のためにG遺伝子の解析は重要と考えられる。今回、2009/2010 シーズンに国内(青森県及び群馬県、熊本県)で検出されたRSVのG遺伝子に関する分子疫学解析を行った結果、若干の知見を得たので報告する。【材料および方法】上記各県の感染症発生動向調査病原体定点から収集した、ARI患者由来の咽頭ぬぐい液を材料とした。調査期間は2009年9月から2010年4月とした。RSVのG遺伝子増幅は、Parveenらの方法に準じて行った。増幅産物のシークエンス、相同性解析および分子系統樹解析(近隣結合法)は常法に従った。【結果および考察】検出されたRSVの遺伝子型は、subgroup AはすべてGA2型、subgroup BにおいてはすべてBA型であった。検出された株間の相同性は高かったが、C-terminal 3rd hypervariable regionにおいて、数カ所のサイトでアミノ酸置換が見られた。以上のことから、本邦において、2009/2010 シーズンは、ある程度遺伝学的多様性を有するRSVが流行していたことが示唆された。

塚越博之, 石岡大成, 小澤邦壽. 新しい呼吸器ウイルス感染症. 衛生微生物技術協議会第33回研究会, 横浜市 (2012年6月)

種々の呼吸器ウイルス、特にRSウイルス(RSV)やライノウイルス(HRV)などは喘鳴および気管支喘息の増悪に密接に関与していることが示唆されている。しかし、それらに関与する

ウイルスの詳細な分子疫学は不明である。そこで、2007年11月から2009年3月まで、急性下気道感染児115例から、(RT-)PCR法によって、種々の呼吸器ウイルス(RSV、HRVを含め8種類)の検出を試みた。その結果、RSVのみが検出されたのは47例(40.9%)、HRVのみが検出されたのは36例(31.3%)であった。RSVとHRVの両方が検出されたのは14例(12.2%)であった。HMPV単独あるいはHPIV単独での検出はそれぞれ1例(0.9%)のみであった。また、16例の(13.9%)患者からは、RSV、HRV、HPIV、EV、HMPV、InfV、AdV、HBoVはいずれも検出されなかった。RSVとHRVの相同性解析および系統解析の結果から、これらのウイルスは遺伝子学的に多様であった。また、RSVは喘鳴・喘息の既往歴がない患者から多く検出され、HRVは喘鳴の既往歴のある患者から多く検出されていることも明らかとなった。さらに、これまで本邦におけるHRVの分子疫学は不明な点が多かったことから、いろいろな呼吸器感染症から検出されたHRVの詳細な分子疫学解析を行い、遺伝子型の推定を行った。その結果、HRV-AやHRV-CはHRV-Bよりも多く検出され、遺伝的に多様であり様々な遺伝子型に分類された。

一方、近年発見されたSaffold cardiovirus (SAFV)は、小児の胃腸炎や扁桃炎から検出されたという報告があるが、病原性ははっきり分かっていない。さらにSAFVに関する疫学は不明であることから、呼吸器感染症を呈する児から得た咽頭拭い液から423検体からSAFVの検出を試みた。その結果9検体(2.1%)からSAFVが検出され、遺伝子型は、SAFV3が6株、SAFV6が3株であった。さらに、群馬県で分離されたSAFV3を用いて抗体保有率を調べたところ、5歳までに100%抗体を保有することが分かった。以上のことから、SAFVは、呼吸器感染症の原因となり、5歳までに100%のヒトが感染する可能性が示唆された。しかしながら、SAFVに関する知見は少なく今後さらに詳細な研究をしていく必要があると考えられる。

長谷川就一, 米持真一, 熊谷貴美代, 山口直哉, 萩野浩之, 関口和彦, 飯島明宏, 嶋寺光, 速水洋. 夏季と冬季の関東地方におけるPM2.5

成分の高時間分解同時観測. 第 29 回エアロゾル科学・技術研究討論会, 北九州市 (2012 年 8 月)

Simultaneous high-time resolution observations of PM_{2.5} components were carried out at four sites in Kanto area in summer and winter in order to get data sets for evaluation of air quality models and analyze factors of variation of PM_{2.5}. The variations of PM_{2.5} were generally similar in both summer and winter. However, an increasing trend with higher concentrations of NO₃, SO₄ and NH₄ was observed at Komae on July 28-29. In summer, particulate NO₃ was low concentration whereas gaseous NO₃ obviously increased in daytime and decreased in nighttime. The ratios of gaseous to total NO₃ in nighttime were >0.6 at Komae and almost zero at Maebashi probably due to temperature and humidity. In winter, the ratios of gaseous to total NO₃ were much lower than in summer. SO₄ generally indicated similar variations spatially and temporally in both summer and winter.

萩野浩之, 森川多津子, 長谷川就一, 米持真一, 関口和彦, 森田 諒, 熊谷貴美代, 山口直哉, 飯島明宏, 嶋寺 光, 速水 洋. 2011 年夏季関東都市・郊外におけるエアロゾル質量スペクトルの PMF 解析. 第 29 回エアロゾル科学・技術研究討論会, 北九州市 (2012 年 8 月)

Simultaneous measurement of ambient aerosols was carried out using three aerosol mass spectrometers in the Kanto area during summer of 2011. Organic aerosol (OA) was detected as major component in this sampling campaign. The organic aerosol mass spectra was divided into two types of OA components, oxygenated organic aerosol (OOA) and hydrocarbon-like organic aerosol (HOA), using positive matrix factorization (PMF). The OOA was ubiquitous in various atmospheric environments, on average accounting for 44%, 49% and 55% of the total OA in Saitama (urban), Kazo (rural), and Maebashi (rural), respectively.

熊谷貴美代, 一条美和子. 群馬県における微小粒子状物質中レボグルコサンの季節変動. 第 53

回大気環境学会年会, 横浜市 (2012 年 9 月)

近年、微小粒子の発生源の一つとしてバイオマス燃料が注目されている。バイオマス燃焼の指標成分として、セルロースの熱分解によって生成するレボグルコサン (Lv) が知られている。我々はこれまでに夏季・冬季において微小粒子中の Lv を調査した結果、夏季よりも冬季に高い濃度で検出されることが分かった。しかし、年間を通じた濃度変動は分かっていない。また Lv の国内での観測例は少なく、その挙動や具体的な排出源など不明な点が多い。本研究では、微小粒子に対するバイオマス燃焼の影響を把握するため、2009 年に実施した長期観測から Lv の年間変動について調査した。

長谷川就一, 米持真一, 山田大介, 鈴木義浩, 石井克巳, 齊藤伸治, 鴨志田元喜, 熊谷貴美代. 2011 年 11 月に関東で観測された PM_{2.5} 高濃度の解析. 第 53 回大気環境学会年会, 横浜市 (2012 年 9 月)

2011 年 11 月上旬に関東地方で広範囲にわたって高濃度の PM_{2.5} が観測された。SPM も同様に高濃度となっていたが、SPM と PM_{2.5} の比較から粗大粒子の寄与は小さいと見られる。また、SPM の全国分布を見ると、東海や関西の大都市圏でも上昇が見られているが、全般に関東が顕著であり、特に 6 日は他地域では上昇が見られず、関東のみで非常に高濃度となっていた。そこで、このときの関東の PM_{2.5} の質量濃度や成分の経時変化やその地域分布などを解析し、その特徴や要因を考察した。

米持真一, 長谷川就一, 萩野浩之, 山口直哉, 熊谷貴美代, 関口和彦, 飯島明宏, 速水 洋. 関東地方における PM_{2.5} 無機イオンの高時間分解能同時観測. 第 53 回大気環境学会年会, 横浜市 (2012 年 9 月)

現在開発が進められている大気質予測モデルは、その挙動が複雑な二次生成粒子については必ずしも再現性が良いとはいえず、改良が試みられている。そこで PM_{2.5} の多くを占める二次生成成分の時間・空間分布の把握と、大気質モデルのサブモデル検証を目的とし、4 時間単位のフィルター捕集による高時間分解観測により、

化学組成の挙動把握を試みた。この観測から夏季と冬季の比較について報告した。

熊谷貴美代. 関東内陸部における微小粒子状物質の化学成分の特徴. 全国環境研協議会主催, 第 53 回大気環境学会年会特別集会, 横浜市 (2012 年 9 月)

2009 年に環境基準が設定された微小粒子状物質には、一次粒子だけでなく大気中で反応生成する二次粒子が存在する。関東平野では大規模海風により大気汚染物質が内陸へと輸送されるため、大都市部とその郊外地域では微小粒子の化学組成や二次生成の寄与が異なると予想される。また郊外地域においては野焼きのようなバイオマス燃焼が地域特有の微小粒子発生源となっている可能性がある。

群馬県衛生環境研究所では、関東内陸に位置する群馬県において微小粒子の汚染実態を把握するための観測に取り組んでいる。2007 年度からは微小粒子中の有機成分に着目し、水溶性有機炭素成分 (WSOC) や二次有機粒子 (SOA) の指標としてジカルボン酸、バイオマス燃焼の指標としてレボグルコサンといった有機トレーサー成分の調査を行ってきた。これまでの観測結果から関東内陸地域における微小粒子状物質の化学成分の特徴について紹介した。

齊藤由倫, 小澤邦壽, 木村真也, 飯島明宏. 透水係数選択のための地下水中希土類元素の指標性評価に関する研究. 日本陸水学会第 77 回大会, 名古屋市 (2012 年 9 月)

透水係数は、地下水流動を予測計算する数値解析モデルにとって重要なパラメータである。これは、現実の汚濁物質濃度等(トレーサ)の状況がモデル上でよく再現される値を、種々の文献値の中から探索(モデル逆解析)するが、トレーサ情報が不足する場合はその探索に苦心する。我々はこれまで地下水中の希土類元素(REE)の類似性から、地下における井戸同士の繋がりを評価する研究を行ってきた。そこで、REE が透水係数の探索に関してトレーサの代用になるとする研究仮説を立て、これを検証するために、 Cr^{6+} の地下水汚濁地域において調査を行った。

県内の 3 km 四方に囲まれたエリア内の 11 の

井戸に対して、 Cr^{6+} 濃度をトレーサにモデル逆解析を行って井戸間の妥当な透水係数を探索した。一方地下水中 REE の濃度組成パターンをクラスター分析して、その類似性から 11 井戸を識別した。その結果、透水係数が高く繋がりが強いと推定された井戸同士と、REE の類似性が高く繋がりが強いと推測された井戸同士は概ね一致した。これは透水係数の探索に関して、REE の類似性がトレーサの代用となり得るとする本研究の仮説を支持する結果と考えられた。

丹羽祥一, 吉住正和, 塚越博之, 石岡大成, 高田勇人, 小澤邦壽. ノロウイルス検査と検体保存条件の関連性. 第 27 回関東甲信静支部ウイルス研究部会, 甲府市 (2012 年 9 月)

【はじめに】ノロウイルス (NoV) は、カリシウイルス科に属するエンベロープや糖鎖を持たない環境に強いウイルスであり、冬期における主な食中毒の原因となっている。食中毒における NoV の検査は、食安監発第 0514004 号 (以下、公定法とする) による遺伝子検査が主体であるが検体を採取してから検査に供するまでの保存条件が検査の結果に与える影響は不明である。そこで、NoV 検査 (遺伝子検査) と検体保存条件の関連性について検討を行ったので報告する。【材料と方法】検査材料は 2011 年 9 月から 2012 年 3 月にかけて群馬県内で発生した食中毒事例によって採取された NoV が陽性であった糞便を使用した。検体は、PBS で 10% 乳剤化したサンプル (10% 乳剤) と非乳剤化サンプル (生便) について、それぞれ -80°C 保存 (コントロール)、凍結融解を 5 回行い、 4°C で 24 時間、72 時間、168 時間保存、 25°C で 24 時間、72 時間、168 時間保存した。それぞれサンプルについて公定法に準じたリアルタイム PCR 法により検出される NoV 遺伝子量について解析を行った。【結果と考察】10% 乳剤では、コントロールにおける NoV コピー数と比較して 4°C で 72 時間保存したサンプルが最小の 92.0%、 25°C で 24 時間保存したサンプルが最大の 151.3% であった。一方、生便では、コントロールと比較して凍結融解を 5 回行ったサンプルが最小の 38.7%、 4°C で 24 時間保存し

たサンプルが最大の 172.0%であった。これらの結果はいずれも統計学的な有意差が無く、保存条件が NoV 遺伝子検査へ与える影響は少ないことが明らかとなった。一般に、NoV は環境中において非常に強いウイルスであると推測されており、RNA がウイルス粒子中で分解されずに存在できたためと推測される。本研究により、NoV をリアルタイム PCR 法により検出する場合には、1 週間程度であれば、乳剤化の有無や温度条件などの検体の保存条件は測定結果にほとんど影響を与えないことが分かった。

塚越博之, 高田勇人, 小林美保, 石岡大成, 佐藤登紀子, 鈴木 涉, 柘植晴文, 小澤邦壽, 木村博一. 生物発光酵素免疫測定法(BLEIA)によるノロウイルス検出法の評価. 第 33 回日本食品微生物学会, 福岡市 (2012 年 10 月)

【目的】ノロウイルス (NoV) は、国内および先進諸国において腸管感染症の主要原因ウイルスとして認識されている。全体的には、感染者としての調理従事者を介した大規模食中毒事例の報告が依然として多く見られている。NoVによる臨床症状は、一過性であるが、発症から数週間程度、NoVの排泄が見られる場合がある。したがって、NoVに感染した調理従事者の食品などへの二次汚染を制御することが重要である。NoVの検査診断は、食安監発第0514004号による高感度な遺伝子検査法(公定法)が主として使われているが、検査診断コストが高く多検体測定は困難である。また、酵素免疫測定法(ELISA)やイムノクロマト法(IC)もあるが、検出感度や特異性に問題があるとされる。最近、化学発光酵素免疫測定法(BLEIA)による高感度かつ迅速に多数検体を検出可能なシステムが開発された。本研究は、BLEIAの特異性、感度および本システムの簡便性を他法と比較することを目的とした。【方法】検体は、食中毒事例等により得られた糞便の152検体を用いた。公定法に準拠したリアルタイムRT-PCR法によるNoVの定量を基準としてBLEIA、LAMP(LoopampノロウイルスGI/GII検出試薬キット、栄研化学株式会社)、ELISA(NV-AD(III)

「生研」、デンカ生研株式会社)、IC(クイックナビ-ノロ、デンカ生研株式会社)による検出と比較し、解析を行った。また、BLEIAでのサポウイルス、エコーウイルス、アデノウイルスとの交差反応性について確認を行った。【結果】リアルタイムRT-PCR法と各検出法と比較した結果を表1に示した。この結果、BLEIAは遺伝子検査法とほぼ同等の感度を有することが明らかとなった。一方で、ELISAやICはこれらの方法に比し感度が低かった。また、リアルタイムRT-PCR法で陽性となった138検体のうち、9検体ではBLEIAで陰性となったが、それらのコピー数は便1gあたり 10^6 コピー以下であった。また、NoV以外のサポウイルス、エコーウイルス、アデノウイルスとの交差反応性は認められなかった。

表1 リアルタイムRT-PCR法と検出法の比較

	感度(%)	特異度(%)	一致率(%)
BLEIA	93.5	100	94.1
LAMP	89.9	92.9	90.1
ELISA	51.1	100	55.6
IC	54.7	100	58.9

【考察】BLEIAは、公定法であるリアルタイムRT-PCR法とほぼ同等の感度を有し、その検出感度は、便1gあたり 10^6 コピー程度であった。また、本システムにより、多数の検体を迅速に測定することが可能である(120検体/時間)。今後、本システムのコストパフォーマンスなどの検討がさらに必要であるが、調理従事者に対する多数検体の迅速なNoVスクリーニングに応用することが可能であることが示唆された。

齊藤由倫, 中島穂泉, 近藤尚志, 飯塚幸生, 小澤邦壽. サーベイメータを活用した焼却飛灰中放射性 Cs 濃度の推計について. 第 39 回環境保全・公害防止研究発表会, 熊本市 (2012 年 11 月)

一般廃棄物焼却場の焼却飛灰に対して、サーベイメータを活用した飛灰中放射性 Cs 濃度の迅速且つ簡便な推計方法を検討した。2012年7月に県内の一般廃棄物焼却場3か所から、薬剤処理(キレート)前の飛灰15試料をマリネリ2L容器にそれぞれ採取して、サーベイメータによ

り放射線量率を、Ge 半導体検出器(公定法)により放射性 Cs 濃度(^{134}Cs と ^{137}Cs の合計)を測定した。その結果、放射線量率と放射性 Cs 濃度には強い正の相関が確認されたため($R=0.99$)、(1)の一次回帰式から放射性 Cs 濃度を推計できることがわかった。放射線量率(推計値) =

$$\text{放射線量率} \times 26901 - 6 \dots (1)$$

これにより、例えば放射線量率 $0.2 \mu\text{Sv/h}$ の飛灰は放射性 Cs 濃度が $5374 \pm 516 \text{ Bq/kg}$ (95% 予測区間)と推定できる。ただし、今回検討した放射線量率は、概ね $0.040 \sim 0.200 \mu\text{Sv/h}$ であったことから、推計においてはこれを逸脱しない範囲が望ましい。また、安全運用のためには定期的な推計式の見直しも必要であろう。

一条美和子, 熊谷貴美代, 齊藤由倫, 近藤尚志, 小澤邦壽. 群馬県における大気中PM2.5成分の挙動—2012年1月及び3月の調査結果から—. 第39回環境保全・公害防止研究発表会, 熊本市 (2012年11月)

PM2.5 の排出源把握の足がかりとなりうる各成分の挙動解明を目的とし、2012年1月及び3月に PM2.5 の成分分析調査を行った。3月は1月に比べ全体的に濃度が高く、その変動も大きかった。両月ともに昼夜の差は見られず、PM2.5 の約 8 割を占める水溶性成分と強い正の相関が見られた。1月における PM2.5 の濃度上昇には NO_3^- が大きく関与していることが示唆され、3月においては NO_3^- に加えて SO_4^{2-} が影響していると考えられた。また、1月には北寄りの風向と PM2.5 濃度に負の相関が見られたことから、前橋では「空っ風」と呼ばれる強い北寄りの風によって PM2.5 濃度が減少する傾向にあることが示唆された。

清田直子, 小林美保, 塚越博之, 西村浩一, 原田誠也, 野田雅博, 木村博一. 本邦におけるヒトライノウイルスCの分子疫学. 第82回日本感染症学会西日本地方会学術集会, 福岡市 (2012年11月)

【目的】ヒトライノウイルス (HRV) は、急性呼吸器感染症 (ARI) を引き起こす主要な病原体である。HRV はウイルス学的に、HRV-A、B 及び C に分類される。HRV-C は、A 及び B と同

様に種々の ARI に関与するという報告があるが、疫学には未だ不明な点が多い。今回、国内 (栃木県及び熊本県) で ARI 患者から検出された HRV の VP4/VP2 coding region の詳細な解析を行ったので、結果を報告する。【方法】2009年4月から2011年12月にかけて、栃木県及び熊本県の病原体定点医療機関を受診した ARI 患者から採取された鼻咽腔拭い液及び気管吸引液計 1345 検体を材料とした。RT-PCR 法により HRV VP4/VP2 coding region の増幅・検出を行った。PCR 増幅産物についてダイレクトシーケンス法による塩基配列解析を行い、近隣結合 (NJ) 法と最尤 (ML) 法による系統樹解析、*p*-distance 解析及び positive pressure 解析を行った。【結果・結論】1345 検体中 165 検体から HRV が検出された (HRV-A:98 株、B:4 株、C:63 株)。HRV-C は上気道炎、気管支炎並びに肺炎など種々の ARI から検出され、この内 19 株を用いて NJ 法による解析を試みたところ、11 遺伝子型に分類された。また、ML 法による解析の結果、これらの株は 1870 年代前半に分歧した可能性が示唆された。また、検出された株間の *p*-distance は比較的長く、解析領域の塩基置換速度はインフルエンザウイルスのヘマグルチニン遺伝子とほぼ同じ速さであることが示唆された。なお、解析領域に positive selected site は見られなかった。以上のことから、本邦における HRV-C は多様な遺伝子型を有し、様々な ARI に関与していることが示唆された。

佐々木佳子, 河合優子, 井上伸子, 塩原正枝, 石岡大成, 横田陽子, 下田雅昭, 小澤邦壽. 群馬県内で発生したカンピロバクターを原因とする食中毒事例. 第25回地方衛生研究所全国協議会関東甲信静支部細菌研究部会, 横浜市 (2013年2月)

【はじめに】*Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* (以下 *C. jejuni*) は、ヒトに感染すると発熱・下痢等の症状を引き起こす食中毒菌である。汚染された肉の生食や飲料水等を介して感染することが報告されている。ヒトの治療薬としては、マクロライド系が第一選択薬剤として推奨されており、セフェム系薬剤には自然耐性を示す。また、近年はニューキノロン系薬剤に対する耐

性菌の増加が問題となっている。本年、当県において同菌を原因とする集団食中毒が発生したが、当初は感染源の特定に至らなかった。しかしながら、今回、薬剤感受性検査、PCR、ダイレクトシーケンス、PFGE等の検討を行ったところ、感染源の特定につながる若干の知見が得られたので、報告する。

【事例の概要】2012年8月20日、群馬県内の複数の施設に分かれて宿泊した同一の団体客が、下痢等の症状を示しているとの届出が管轄保健所にあり、翌21日に同保健所が調査を開始した。当該団体はスキー場に隣接する3施設を利用しており、うちA・Bの2施設において患者が確認された。当研究所において、A・B施設の患者便、従事者便、ふきとり及び環境由来検体の微生物学的検査を行ったところ、A施設については便3検体中2検体（患者便1/1、従事者便1/2）、B施設については便9検体中6検体（患者便6/8、従事者便0/1）から*C. jejuni*が検出された。3施設は水源が同一の専用自家水道を利用しており、A・B施設においては滅菌を行っていないかった。また、3施設に共通した食事はなかったが、A・B施設の患者は、各施設における水道水を使用した水出し麦茶を提供されていた。これらのことから、使用水を感染源とする食中毒を疑い、A・B施設の水道水の細菌検査及び遺伝子検査を行った。しかしながら、*C. jejuni*をはじめ、その他の食中毒菌は検出されなかったことから、感染源不明の食中毒として取扱われた。【材料及び方法】(1)材料 2012年8月21日（A施設）と22日（B施設）に各施設内厨房で採取された水道水及び患者及び従事者便より分離された*C. jejuni* 8株 2.方法 (1)水道水からの*Campylobacter* 検出 検水1200mlを6000×g、30分間、4℃で遠心後、沈渣を滅菌蒸留水12mlで懸濁した（100倍濃縮）。これから1mlをプレストンブイオン培地に分注し、微好気下で42℃24時間培養後、CCDA培地に塗抹し、微好気下で42℃48時間培養した。同時に、直接CCDA培地に100μl滴下、コンラージ棒で塗抹後、微好気下で42℃48時間培養した。また、懸濁液の25μlをスライドガラスに滴下し、フェイバーGセット（ニッスイ）によりグラム染色を行った。さらには、*C. jejuni*を

ターゲットとして、Klena及びLintonらの方法に従って、PCRを実施した。テンプレートはアルカリ熱抽出法によって抽出したDNAを用いた。(2)薬剤感受性検査 Kirby-Bauer法による一濃度ディスク法を用いて、キノロン系薬剤のナリジクス酸、ノルフロキサシン、シプロフロキサシン、レボフロキサシンに対する分離株の感受性を調べた。培地は羊血液加ミューラーヒントン培地を使用し、微好気下で42℃24時間培養後、阻止円の大きさを測定した。(3)PCR法による病原性遺伝子の検出 分離株及びATCC29428株について、DNA Mini Kit (QIAGEN)及び核酸抽出機(QIAcube)を用いて、DNAを抽出した。これらのテンプレートを用いて、Kaisar, Zengらの方法に従い、12病原遺伝子(*flaA*, *cadF*, *racR*, *dnaJ*:吸着と増殖に関与、*virB11*, *ciaB*, *pldA*:組織侵襲性に関与、*cdtA* *cdtB*, *cdtC*:細胞毒素産生性に関与、*wlaN*:ギランバレー症候群に関与、*CfrA*:エンテロバクチン第二鉄受容器関連)の保有状況を調べた。(4)ダイレクトシーケンス法による塩基配列の解析 分離株について、Zirnsteinらの方法に従い、キノロン系薬剤耐性に関連する*gyrA*領域の塩基配列をダイレクトシーケンス法を用いて決定し、それぞれの株間の違いを解析した。(5)パルスフィールドゲル電気泳動(PFGE法)による遺伝子解析 分離株のDNA構造の違いを、制限酵素*Kpn I*及び*Sma I*(TaKaRa)によるPFGE法にて解析した。【結果】(1)水道水からの*Campylobacter*検出 2施設の検水2検体からは、培養法による細菌の発育は見られなかった。また、Klena, Lintonらの方法によるPCR法によっても遺伝子は検出されなかった。しかしながら、検水の沈渣から、染色性が極めて悪い、形態的に死菌と推測される構造物が確認された。(2)薬剤感受性検査 分離8株すべてが、ナリジクス酸、ノルフロキサシン、シプロフロキサシンに耐性を示した。レボフロキサシンについては中間を示した。(3)PCR法による病原性遺伝子の検出 ATCC29428株は、*flaA*, *cadF*, *racR*, *dnaJ*, *ciaB*, *pldA*, *cdtA* *cdtB*, *cdtC*, *wlaN*, *cfrA*の11遺伝子を保有していた。一方、分離8株すべてが、*flaA*, *cadF*, *racR*, *dnaJ*, *pldA*, *cdtA*, *cdtB*, *cdtC*の8遺伝子を保有していた。(4)ダイレクトシ

ークエンス法による塩基配列の解析 分離 8 株の *gyrA* の塩基配列はすべて一致した。また、*Campylobacter jejuni* の標準株 3 株 (ATCC29428、ATCC33560、ATCC49349) と塩基配列を比較したところ、ATCC29428 とは塩基配列が一致したが、他の 2 標準株と塩基が異なる箇所が 7 箇所確認された。(5) PFGE 法による遺伝子解析 PFGE による泳動パターンは、制限酵素の種類によらず、すべての分離株で一致した。【考察】当該 2 施設の水道水の細菌検査においては、*Campylobacter* は検出されなかった。しかしながら、遠心処理後の沈渣をグラム染色したところ、染色性が極めて不良であるが、種々の形態を示す死菌と推測される構造物が確認された。これらのことから、飲料水として使用されていた水道水は、細菌により汚染され、かつ殺菌不十分であった可能性が示唆された。すなわち、検水の培養で *Campylobacter* が陰性であったのは、各施設から水道水を採取した調査段階においてはすでに滅菌がされており (採水時 0.1mg/l の次亜塩素酸ナトリウムを検出)、細菌が死滅していたことによるものと考えられた。また、ターゲット遺伝子のサイズを変えた PCR 法によっても *Campylobacter* を検出できなかったことから、検水中の細菌は、遺伝子レベルまで破壊されていたことが示唆された。一方、分離株における薬剤感受性、病原性遺伝子の保有パターン、*gyrA* 領域の塩基配列、PFGE の泳動パターンはすべて一致した。*gyrA* 領域は標準株においても種々の変異が報告されており、変異の起こりやすい領域であることが示唆される。しかしながら、今回、すべての分離株で塩基配列が完全に一致した。これらのことは、分離された 8 株は同一のものであることを強く示していると考えられる。以上の結果から、A 施設と B 施設の患者から分離された *C. jejuni* 8 株は同一由来であり、水道水が感染源である可能性が極めて高いことが示唆された。

山口直哉，飯島明宏，中島穂泉，須藤和久，松本理沙，佐藤侑介，後藤和也，小澤邦壽．群馬県神流川流域における水質実態調査．第 47 回日本水環境学会年会，大阪市 (2013 年 3 月)

神流川は、関東地方の国直轄区間 10km 以上

の一級河川を対象とした水質ランキングで毎年上位に位置しており、清流として流域自治体の主要な観光資源となっている。本研究では、このフィールドを活用した新しい環境学習プログラムの開発を目指し、その水質に関する詳細なデータを収集すべく、流域 9 地点において調査を行った。その結果、全 9 地点の BOD 平均値は 0.5~0.9 mg/L であり、低濃度で推移していた。一方で、上流域における全窒素濃度 (約 1.0 mg/L 程度) は、本県北部 (BOD 等の濃度レベルが同程度と考えられる地点) の全窒素濃度と比較して高いことが確認された。多くの項目について下流域で濃度が上昇する傾向がみられ、これは下流域の人口増加に伴う汚濁負荷量の増加が影響しているものと示唆された。また、生活環境項目のデータを標準化し、クラスター分析を行い、地点間の類似性を確認した。

河合優子，佐々木佳子，井上伸子，塩原正枝，石岡大成，横田陽子，下田雅昭，小澤邦壽．多剤耐性アシネトバクターの分子疫学的解析．2012 年度第 3 回群馬県病原微生物情報研究会，前橋市 (2013 年 3 月)

アシネトバクター属菌は一般的には弱毒菌であるが、乾燥に強く、薬剤耐性を獲得する様々な機構を有しており、近年院内感染の原因菌として注目されている。今年度、群馬県内で多剤耐性アシネトバクター (MDRA) による院内感染事例が発生し、入院患者および院内環境から MDRA が分離されたため、薬剤感受性試験・分子疫学的解析等を行った。

供試菌株は MDRA の定義で示されるとおり、IP, AMK, LVFX に耐性を示した。また、ABPC, CET, CMZ, SM, KM, GM, TC, CP, FOM, NA, ST に対しても耐性を示した。PFGE 法・MLST 法による分子疫学解析では、供試菌株はほぼ同一クローンを示しており、それは世界的 MDRA 流行株と同一もしくは非常に近いタイプであることがわかった。代表菌株 1 株について薬剤耐性機構を解析した結果、外来性耐性遺伝子の獲得や染色体性遺伝子変異による耐性獲得が確認された。このような菌の出現に際しては、地域全体でその動向を監視していくことが必要であると考えられる。