

京都市におけるマダニの生息調査について（Ⅱ）

微生物部門

○池永 充宏, 伊藤 隆起

1 目的

平成 23 年度から当部門では、刺咬被害や感染症を引き起こすマダニの京都市内における生息状況を調査している。平成 23 年度、北、東、西部周辺の間山地域及び山際の人が通る場所を調査したところ、多種多数のマダニが生息するのを確認するとともに、採集した半数以上が病原体を保有すると考えられる結果であった。

平成 24 年度は調査範囲の拡大とともに、河川に沿った生息範囲の拡大について調べるため京都市内を北部から南部にかけて流れる河川の護岸を調査した。

2 方法

平成 23 年度の調査と同様にフランネル布を用いた flagging 法により、表 1 の各地点 1 ポイント当たり概ね 30 分間採集した。採集したマダニを生きた状態で持ち帰り、体液を採取した後にプレパラートを作成し鑑別を行った。体液は MACHEREY-NAGEL 社の NucleoSpin Blood QuickPure を用いて DNA を抽出し、リケッチア感染症診断マニュアル（国立感染症研究所）に記載されるとおり、17-kDa 蛋白遺伝子を増幅するプライマー R1/R2 及び *R. japonica* に特異的なプライマー Rj5/Rj10 による nested-PCR を行った。

表 1 採集場所

河川名	採集場所(標高)	河川名	採集場所(標高)	河川名	採集場所(標高)	採集場所(標高)
桂川	松尾橋(75)	高野川	山端橋(88)	鴨川	北山大橋(93)	梅小路公園(26)
	桂離宮(75)		高野橋(58)		北大路橋(79)	氷室(534)
	久世橋(68)		蓼倉橋(52)		出雲路橋(64)	
	桂橋(44)		出町橋・河合橋(58)			
					丸太町(50)	
					五条大橋(34)	
					七条大橋(33)	

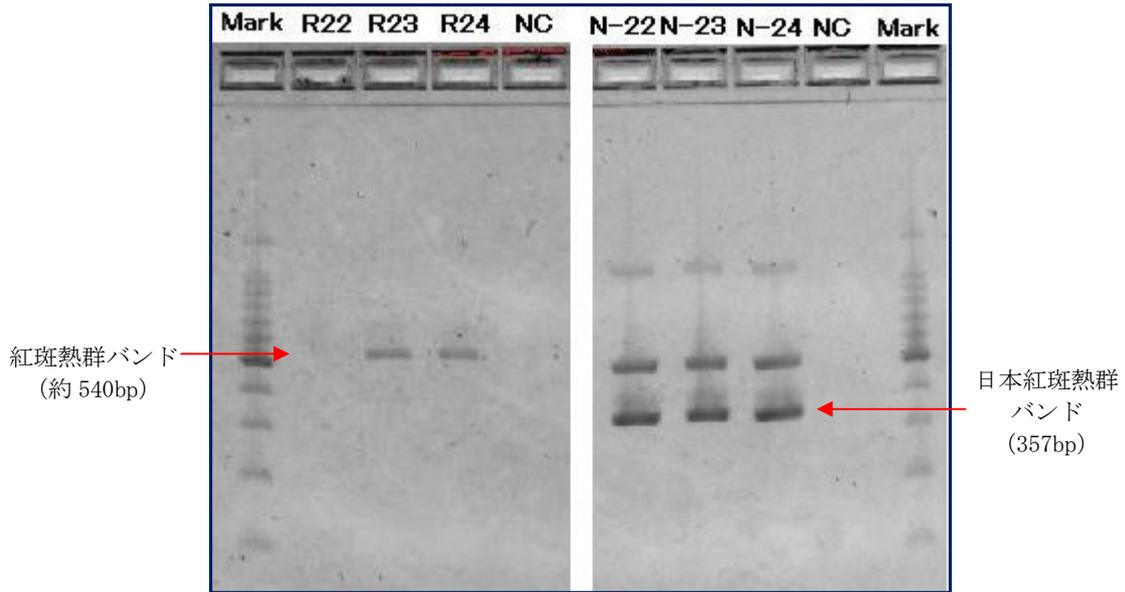
3 結果

表 2 のとおり、桂川及び高野川の上流で、フタトゲチマダニを採集した。

河川で採集されたマダニの遺伝子検査の結果、R1/R2 陽性は 69.2%、Rj5/Rj10 陽性は 76.9%であった。

表 2 採集結果

河川名	採集場所	種類(発育期)	採集匹数	R1/R2陽性	Rj5/Rj10陽性
桂川	松尾橋	フタトゲチマダニ(若虫)	3	2	2
	桂離宮	フタトゲチマダニ(若虫)	9	6	8
高野川	山端橋	フタトゲチマダニ(若虫)	1	1	0
北区氷室		フタトゲチマダニ(幼虫)	150(50匹/1プール)	2	3
		キチマダニ(オス)	1	0	0
		キチマダニ(メス)	1	0	0
		キチマダニ(若虫)	3	0	0
		ヒゲナガチマダニ(メス)	1	0	0
		ヒゲナガチマダニ(若虫)	1	0	0
		タカサゴキラマダニ(若虫)	1	0	0



北区氷室フタトゲチマダニ（幼虫）の泳動結果
(R : R1/R2, N : nested-PCR)



平成 24 年に採集した河川ポイント

4 考察

高野川上流及び桂川上流では植生が多く見られ、マダニを採集した。高野川上流では、近くに大きな児童公園があり、また、桂川上流では川遊びやバーベキューをする若者が多数みられた。さらに、これら採集したマダニ体液の遺伝子検査で、病原体を保有する可能性が示唆されたことから、市内のマダニの生息状況及び生態について、引き続き市民啓発を行う必要がある。

一方、鴨川上流では植生があるにも関わらず採集することができなかった。その要因としては、数年前に護岸整備が行われており、マダニの移動に影響を与えた可能性が考えられた。

また、鴨川出町橋以南では植生が無い、或いはまばらでマダニを採集することはできなかった。

周辺部に生息するマダニが、市内を流れる河川に沿って生息範囲を広げるには、周辺部のように宿主である小動物などが生息できる環境や、マダニの生息に適した温度や湿度などが必要になると考えられるが、今回の調査では市内河川の上流以南は、植生の状況や気温の高さなどから、マダニが生息するには十分な環境でないと推察された。

ヒトスジシマカ成虫の季節的消長及び産卵数について

微生物部門

○池永 充宏, 北村 喜一

1 目的

チクングニア熱やデング熱を媒介するヒトスジシマカは多化性で 7 世代の交代の後、卵による越冬を行う。そこで防除対策基礎資料とするため、ヒトスジシマカ成虫の季節的消長と産卵数について調査した。

2 方法

成虫は、臭気誘引トラップを 24 時間設置して採集し、鑑別計数した。

産卵数の計数は、平成 23 年の調査で用いたオビトラップと栄養液により、1 週間設置して行った。トラップは同一場所に設置し、併せて気象観測も行った。

3 結果

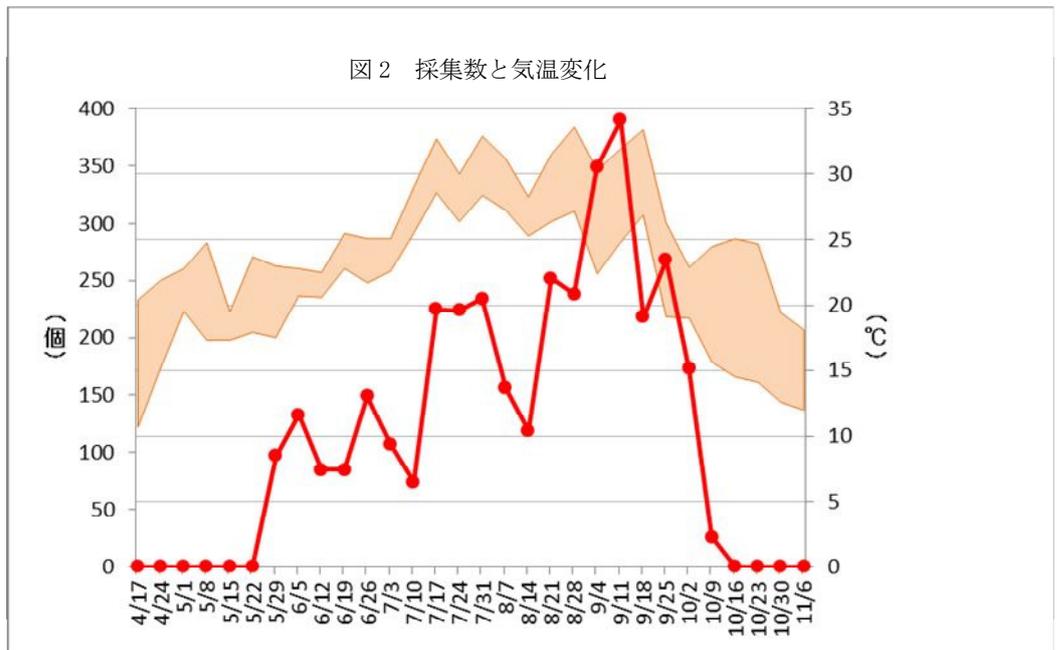
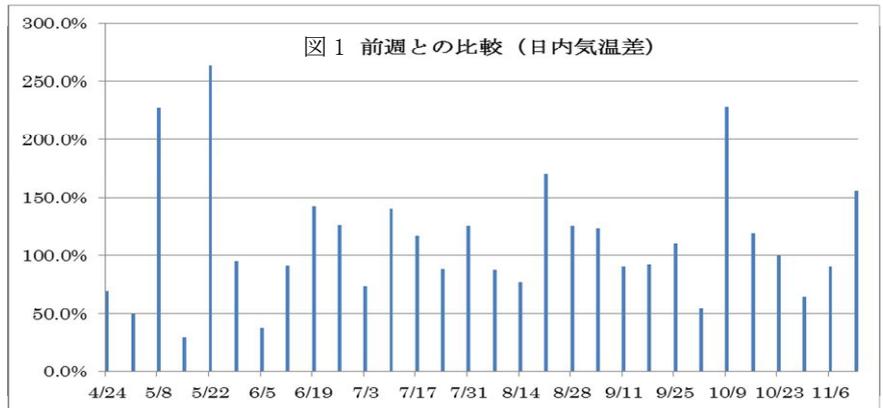
平成 24 年に初めて成虫が採集されたのは、オスが 5 月 8 日、メスが 5 月 29 日で、産卵が確認されたのは 5 月 29 日であった。

成虫の採集数のピークは 9 月 18~25 日で、産卵数のピークは 9 月 11 日で、成虫は約 28 日ごとに、産卵数は約 21 日ごとの周期で増減を繰り返しながらピークに達していた。

成虫の採集数は 10 月 23 日に、産卵数は 10 月 9 日に急激に減少した。

総成虫採集数はオス 97 匹、メス 189 匹とメスの方が多かった。

10 月 9 日に日内気温差の比率が前週までに比べて大きくなった。



4 考察

ヒトスジシマカは、3 月下旬に越冬卵が孵化し、5 月初旬に第 1 世代目の成虫が活動を行うことから 5 月 8 日に採取したオス成虫は第 1 世代目と推測される。

成虫の採集数と産卵数のピーク日の差は 7~14 日で、気温 30°C 前後での卵から成虫に達する日数にほぼ一致していた。成虫採集数、産卵数ともに増加した 6 月から 9 月中旬までの日内気温差について見ると、前週との比率が $112.4 \pm 0.28\%$ (平均±標準偏差) とほとんど変化が認められなかったが、産卵数が急激に減少した 10 月 9 日では、 228.2% と前週までと比較して大きく変化していた。低温短日下で成長したヒトスジシマカのメス成虫は 9 月下旬以降、越冬卵(休眠卵)を産卵するが、日内温度差についても越冬卵産卵に寄与すると考えられた。

雨水マスにおける蚊幼虫・サナギの発生状況調査

微生物門

○伊藤 隆起, 北村 喜一

1 目的

近年、ウエストナイル熱、デング熱、チクングニヤ熱などが日本に上陸することが懸念されている。これらのウイルスの最も有力な媒介者はアカイエカとヒトスジシマカであり、その主な発生源は道路脇の雨水マスである。

そこで、雨水マスにおける蚊幼虫・サナギの発生状況を把握し、蚊防除対策の基礎資料とするため調査を実施した。

2 方法

平成 24 年 4 月 5 日から 12 月 27 日まで、毎週 1 回、衛生環境研究所前の道路脇の雨水マス 3 箇所（地点No.1~3）から、マス内の停留水を特定の柄杓（直径 13cm、深さ 7cm）で採水し、蚊幼虫・サナギの種類を鑑別し計数した。なお、サナギは置き水で飼育し、成虫に羽化させて種類を鑑別した。

3 結果

採集結果を表 1 に示す。

全期間を通じて合計 4,171 個体の幼虫・サナギを採集した。種類はほとんどがアカイエカとヒトスジシマカの 2 種で、比率をみると 3 地点ともアカイエカが多く、地点No.1 が 81%、地点No.2 が 76%、地点No.3 は 84%であった。

採集数が最も多かった地点No.1 の採集日別結果を図 1 に示す。

表 1 地点別採集成績

地点	アカイエカ			ヒトスジシマカ			合計
	幼虫	サナギ	計	幼虫	サナギ	計	
No.1	1,714	115	1,829	388	51	439	2,268
No.2	479	152	631	182	18	200	831
No.3	818	87	905	139	28	167	1,072
計	3,011	354	3,365	709	97	806	4,171

(1) アカイエカの季節的消長

最初の出現は 5 月 24 日で、200 個体以上が採集された。その 2 週間後の 6 月 7 日に 1 回目のピークが見られた。その翌週はマスの清掃直後のため採集数は激減したが、すぐに復活した。その後、7 月中旬から 9 月上旬まで一時的に数が減少したが、9 月中旬から再び増加し、10 月 25 日に 2 回目のピークをみせ、11 月中旬でほぼ終息した。なお、幼虫が最後に採集されたのは 12 月 14 日で、気温 2℃、水温 7℃であった。

(2) ヒトスジシマカの季節的消長

最初に出現したのは 4 月 18 日で、2 週間後の 5 月 2 日に 1 回目のピークが見られたものの、その後急速に減少し、6 月 7 日には全く見られなくなった。その後、少しずつ増加し、9 月 13 日に 2 回目のピークが見られた。最後に採集されたのは 10 月 11 日で、それ以後は、全く採集されなかった。

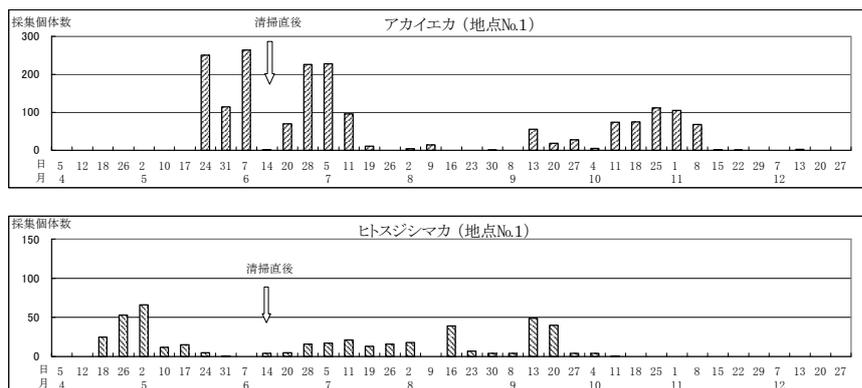


図 1 地点No.1 の種別・採集日別成績

4 考察

今回の調査でアカイエカとヒトスジシマカでは、最初の出現時期に 1 ヶ月間の差が見られた。これはアカイエカが成虫で越冬し春に産卵・ふ化するのに対し、ヒトスジシマカは卵で越冬することから、アカイエカよりも早く出現したと思われる。

雨水マスの調査結果には、マス内の清掃、大雨による停留水の流出、路上の油やゴミの流入による水質悪化などに起因するマス内の環境変化が大きく影響することが分った。このことから、同じ道路脇の雨水マスでもマスごとに生息環境が異なるため、今回は、1 つのマ스에注目して季節的消長の観察を行ったが、今後は他のマスも含め、生息環境の変化を含めた資料の蓄積をしていきたい。

人おとり法による蚊成虫捕獲調査（第2報）

微生物部門

○伊藤 隆起, 池永 充宏

1 目的

近年、近隣諸国でデング熱やチクングニヤ熱が流行しており、これらのウィルスの媒介者は市内で最も普通にみられるヒトスジシマカである。本市では市内12地点でライトトラップによる蚊成虫生息調査を行っているが、今回対象のヒトスジシマカは主に昼間に活動することから、ライトトラップだけでは生息状況を十分に把握できないと思われる。そこで、ヒトスジシマカの発生消長を把握し、媒介蚊対策の基礎資料とするため、人おとり法による捕獲調査を行った。なお、この調査は昨年から実施していることから、昨年と今回との比較も行った。

2 方法

平成24年4月1日から12月5日まで、毎週1回、昼間（土曜日の16時頃）と夜間（水曜日の20時頃）、調査者が自宅庭（約4m×8m）の中央に立ち、直径36cmの捕虫網を10分間振って近寄ってきた蚊を捕獲した。

3 結果

今回（平成24年度）と昨年（平成23年度）の調査結果を表1に示す。

昼間の調査ではヒトスジシマカ458個体（昨年242個体）、夜間の調査ではヒトスジシマカ286個体（昨年200個体）、アカイエカ27個体（昨年20個体）を捕獲した。

ヒトスジシマカは夜間でも多くの個体が採集された。一般的にヒトスジシマカは昼間活動型といわれているが、昨年からの調査で、夜間でも十分吸血活動を行うことが認められた。また、吸血しない雄も多数採集されたが、夜間は昼間に比べると半数以下に減少しており、この傾向は両年とも同じであった。

次に、ヒトスジシマカの雌について、週別成績を図1に示す。今年の調査では、昼間は5月第3週から採集され、7月後半に一時少なくなるものの8月に入ると再び増加し、11月第2週まで採集された。夜間は5月第2週から採集され、10月第2週を最後に採集されなくなった。これは昼間より4週早い終息であった。

なお、23年度と24年度の週別成績を比較すると、ピーク時期の違いはあるものの、出現時期と終息時期については、両年とも同じ結果が得られた。

表1 採集結果

24年度	ヒトスジシマカ		アカイエカ	
	♀	♂	♀	♂
昼間	247	211	0	0
夜間	200	86	26	1

23年度	ヒトスジシマカ		アカイエカ	
	♀	♂	♀	♂
昼間	134	108	0	0
夜間	164	36	19	1

4 考察

人おとり法は、調査の場所や時間帯、更には採集時の気象条件の違いで、結果に差が出る可能性があり、注意が必要である。しかし、昨年と今回ではほぼ同じ結果が得られたことから、この調査の有効性が示唆された。また、特殊な機材が不要なことや、作業が簡便なことから、今後も、特定地域の蚊の生息調査や被害の実態調査等に活用できると思われる。

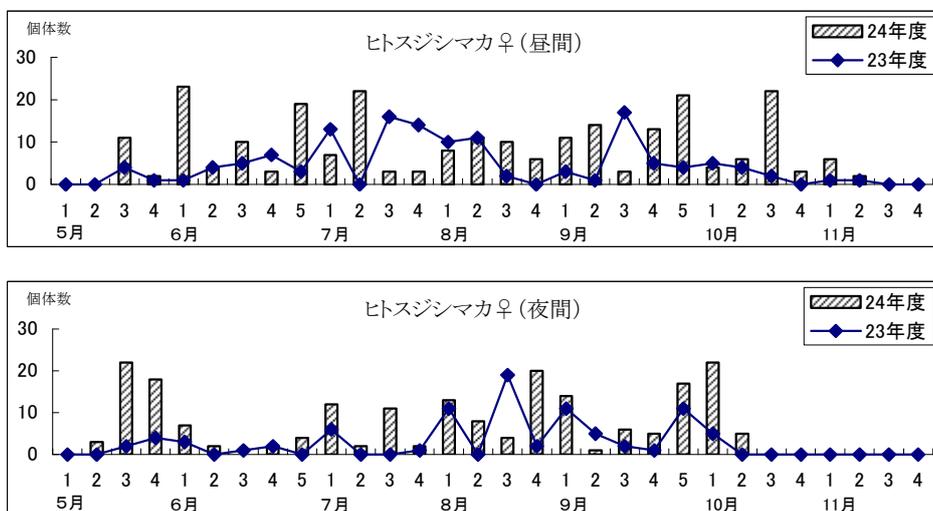


図1 ヒトスジシマカ♀ 週別成績（平成23・24年度）

光及び臭気による誘引性を用いた蚊成虫トラップの採集比較について

微生物部門

○池永 充宏

1 目的

蚊成虫は、吸血する生き物をさまざまな情報から感知している。蚊成虫を採集する方法としては、夜間行動型のイエカ属には光（500nm 以下）で誘引するライトトラップが有効である。一方、近年増加しておりデング熱やチクングニア熱を媒介するといわれる昼間行動型のヤブカ属には、ヒトが発散するような臭気を出す誘引剤が有効であるといわれている。これらの誘引性について調査した。

2 方法

京都市内の保健センターA及びB（以下「A, B」という）の2か所で、平成24年4月から12月の間に25回、ライトトラップと臭気誘引剤（以下「ライト, 臭気」という）を用いたトラップを同時に24時間設置し、回収した蚊成虫を種別、性別に計数した。誘引剤は、ドイツで製造販売されている製品を使用した。

3 結果

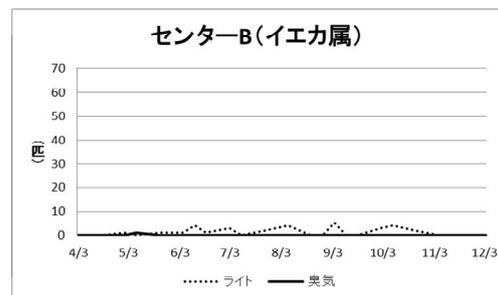
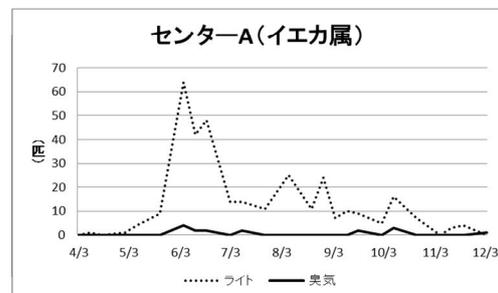
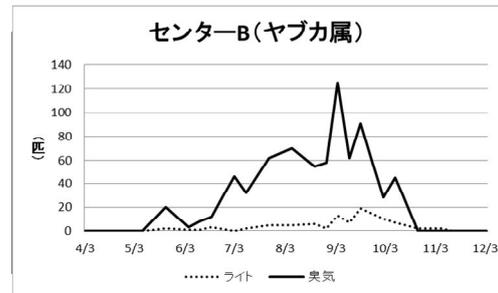
Aでの採集数は、ライトでは629個体（ヒトスジシマカ♀106 ♂194, アカイエカ♀113 ♂216）、臭気では724個体（ヒトスジシマカ♀319 ♂389, アカイエカ♀4 ♂11, トラフカクイカ♀1）であった。

また、Bでの採集数は、ライトでは118個体（ヒトスジシマカ♀68 ♂19, アカイエカ♀20 ♂8, コガタアカイエカ♀3）、臭気では718個体（ヒトスジシマカ♀364 ♂353, アカイエカ♀1）であった。

A, Bともに臭気はライトに比べてヤブカ属を有意に多く採集でき、ライトは臭気に比べてイエカ属を有意に多く採集することができた。（ $P < 0.05$, T-test (P)）これらの結果は、メス、オス別に比較しても同様であった。

4 考察

ヤブカ属の採集には臭気誘引が、イエカ属の採集には光誘引が有効であった。海外で発生している感染症を媒介するヤブカ属及びイエカ属の蚊は、我が国でも多く発生しており、誘引剤によるトラップも活用していきたい。



蚊成虫に誘引作用を示す臭気発生液調製の試みについて

微生物部門

○池永 充宏, 伊藤 隆起, 北村 喜一

1 目的

ヤブカ属を誘引するのに有効とされる臭気誘引剤がドイツで製造販売されている。

当部門では、この臭気誘引剤を使用して平成 23 年及び 24 年に効率的にヒトスジシマカを採集することができた。蚊成虫はヒトが発散するアンモニアや有機脂肪酸などにも誘引されるが、この臭気誘引剤はこれらを含んでいる。しかし、この商品は輸入に頼るため、入手に時間と多額の費用を要することから、同等の誘引作用を示す臭気発生液の調製を試みた。

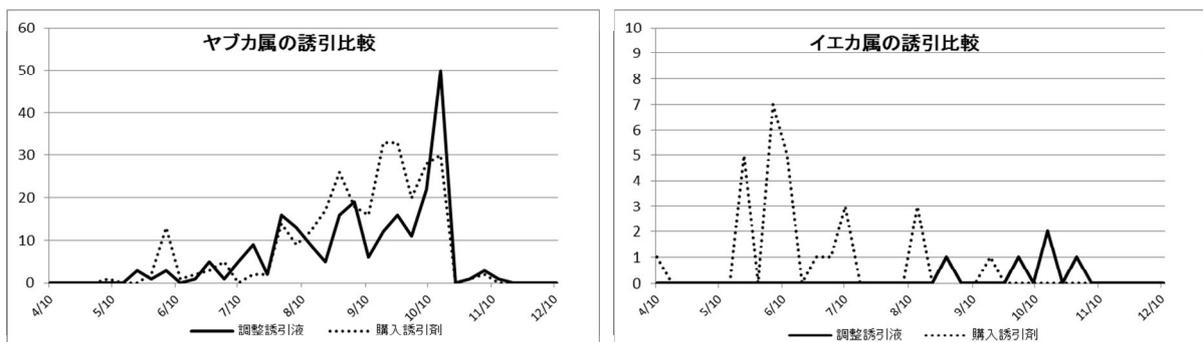
2 方法

衛生環境研究所の敷地内にトラップを設置した。トラップ本体は、臭気誘引剤を用いて使用するもので、ドイツから輸入したものである。このトラップに購入した誘引剤及び調整した誘引液をそれぞれ入れて設置した。調査は、平成 24 年 4 月から 12 月の間に 32 回、毎回 24 時間設置して行った。

誘引液は、有機脂肪酸、オクテノール、乳酸等を配合し、調製したものである。

3 結果

購入した誘引剤による総採集数は、ヒトスジシマカ♀192 ♂97, ヤマトヤブカ♀1, アカイエカ♀10 ♂18 であった。また、調製した誘引液による総採集数は、ヒトスジシマカ♀171 ♂59, アカイエカ♀3 ♂2 であった。



4 考察

調製した誘引液は、ヤブカ属を購入した誘引剤と同等に誘引採集することができた。しかし、イエカ属については購入した誘引剤の方が調製した誘引液より多く誘引採集することができた。

イエカ属の誘引にオクテノールの有効性が認められており、購入誘引剤と同等にイエカ属を誘引するためには、オクテノール濃度を調製する必要があると思われる。

さらに、今回作成した誘引剤は液状であり、使用毎に調製しなければならず、継続して使用するには成分放出量の調製も可能な形態を講じる必要があると思われる。

溶血性レンサ球菌検出状況

微生物部門

○清水 麻衣, 橋本 貴弘, 改田 千恵 (山科区役所保健部), 松本 剛芳,
柳田 清英 (退職), 木澤 正人 (東山区役所保健部)

1 目的

溶血性レンサ球菌を分離・同定することにより, 流行株等, 溶血性レンサ球菌研究の基礎データを蓄積する。

2 方法

感染症発生动向調査事業で入手した検体 (咽頭ぬぐい液) から, 溶血性レンサ球菌の分離・同定を行い, Lancefield 血清群別 (A, B, C 及び G) 及び A 群溶血性レンサ球菌については T 型別を行った。

また, 市内医療機関において劇症型溶血性レンサ球菌感染症と診断された患者由来の菌株についても収集を行い, 同様に検査を行った。

3 結果

感染症発生动向調査事業で入手した咽頭ぬぐい液 264 検体の検査を実施し, 37 検体から, A 群溶血性レンサ球菌を検出した (表 1)。

T 型別については, T12 型が 17 株 (45.9%) と多く認められた。

A 群以外の溶血性レンサ球菌については, B 群溶血性レンサ球菌を 1 検体から検出した。

表 1 A 群溶血性レンサ球菌の検査件数及び検出数

検査件数		1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	計
		76	63	63	32	4	5	9	1	0	5	3	3	264
検出数	T1	1	2					1						4
	T3	1		2										3
	T4				2									2
	T11			2										2
	T12	4		3			2	2			2	2	2	17
	T25	1												1
	T28		2	1				1						4
	TB3264	1	1	2										4
合計		8	5	10	2	0	3	3	0	0	2	2	2	37

また, 市内医療機関において劇症型溶血性レンサ球菌感染症と診断された患者由来の菌株については, 6 株の検査を実施して, その内訳は A 群 T1 型が 4 株, A 群 TB3264 型が 1 株, C 群が 1 株であった。これらの菌株は, 患者情報等と併せて近畿地区レファレンスセンター (大阪府立公衆衛生研究所) に送付しており, 詳細な解析が行われ, 他の地区と併せた全国集計データが, 平成 25 年度衛生微生物技術協議会第 34 回研究会において報告されている。

患者便等からの *Kudoa septempunctata* 検査法の検討

微生物部門

○清水 麻衣, 橋本 貴弘, 改田 千恵 (山科区役所保健部), 松本 剛芳,
柳田 清英 (退職), 木澤 正人 (東山区役所保健部)

1 目的

近年、ヒラメを生食した際に、食後数時間で一過性の嘔吐や下痢を呈するも軽症で終わる事例が数多く報告され、研究の結果、ヒラメの筋肉内に寄生した新種の粘液胞子虫 *Kudoa septempunctata* が関与していることが明らかになり、この寄生虫は食中毒の病因物質として取り扱われることとなった。(「生食用生鮮食品による病因物質不明有症事例への対応について」平成23年6月17日付け食安発0617第3号)

これに続いて同年7月には、ヒラメからの *K. septempunctata* 検出法について、遺伝子検査法及び顕微鏡検査法が暫定版として通知され(「*Kudoa septempunctata* の検査法について(暫定版)」平成23年7月11日付け食安監発0711第1号)、当部門においても、この通知法によりヒラメの検査に対応している。

しかし、*K. septempunctata* による食中毒が疑われた実際の有症事例においては、保健センターが調査に入った時点で既に当該ヒラメの残品がなく、原因物質特定のための検査ができないこともある。そのため、患者便等からの *K. septempunctata* 検査が求められるが、検査法が定められたのはヒラメのみで、患者便等については未だ定められていない。

そこで今回、当部門においても患者便等からの *K. septempunctata* 検査に対応することを目標として検討を行った。

2 方法

平成23年9月から平成24年6月の間に発生した、*K. septempunctata* による食中毒が疑われる有症事例3事例(うち1事例が食中毒と断定)の患者便4検体を用いて、次の5とおりの方法で患者便からDNAを抽出し、ヒラメ検査の通知法に準じてリアルタイムPCRを実施した。

これらの検体については、大阪府立公衆衛生研究所に依頼した検査(以下、「依頼検査」とする。)により、3検体が *septempunctata* 遺伝子陽性、1検体が陰性と判定されている。

ア 無処理の患者便を、便検体からのDNA抽出専用キットであるQIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN)を用い、プロトコール「病原体検出のための糞便からのDNA精製」に従ってDNA抽出

イ 無処理の患者便を、QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN)を用いてDNA抽出

ウ BioMasher II (nippi)で破碎した患者便を、QIAamp DNA Mini Kitを用いてDNA抽出

エ 患者便をPBSに懸濁して遠心し、その沈渣を再懸濁したものをBioMasher IIで破碎した後に100 μ mのフィルターでろ過し、得られたろ過物をQIAamp DNA Mini Kitを用いてDNA抽出

オ エのろ過物を30%に調整したPercoll (GE Healthcare)に重層して遠心し、得られた沈渣を遠心洗浄したものを、QIAamp DNA Mini Kitを用いてDNA抽出

なお、QIAamp DNA Mini KitによるDNA抽出は、ヒラメ検査の通知法に準じて行った。

3 結果

患者便4検体すべて、いずれの方法でDNA抽出したものからも、*K. septempunctata* 遺伝子は検出されなかった。(表1)

表1 患者便からの *K. septempunctata* 検査結果

検体	検体採取 (喫食後日数)	当部門での検査結果					依頼検査 結果
		ア	イ	ウ	エ	オ	
A	2	—	—	—	—	—	+
B	4	—	—	—	—	—	—
C	2	—	—	—	—	—	+
D	3	—	—	—	—	—	+

4 考察

今回用いた患者便検体と、当部門での検査結果及び依頼検査結果との関係は表1のとおりである。

喫食の2~3日後に採取された患者便3検体から、依頼検査では*K. septempunctata* 遺伝子が検出されたが、当部門の検査では検出されなかった。この原因については、第一に、検査法の違いが考えられる。

依頼検査の検査法は、ヒラメ検査の通知法とは全く異なる大阪府立公衆衛生研究所独自の方法である。当部門においても、実績があるこの方法で患者便の検査を実施したいところではあるが、当部門にはない高価な機器とDNA抽出キットを必要とし、リアルタイムPCRのプライマーとプローブも新たに作成しなければならないことなどから、残念ながら現状では対応できない。そのため今回は、当部門でも対応可能なDNA抽出キットを使用して、ヒラメ検査の通知法と同じプライマーとプローブを用いたリアルタイムPCRを実施したが、抽出性能や検出系の感度に差があったのかもしれない。

また、使用した患者便検体についても、依頼検査では、採取後に数日間凍結保存したものを融解して使用しているが、当部門での検査の際には、これを再度凍結して長期間保存した後に融解して使用しており、この影響も考えられた。

さらに、依頼検査においては、原則として患者便300mgからDNAを抽出しているが、当部門の検査では、QIAamp DNA Stool Mini Kitの場合でプロトコールに従い約200mg、QIAamp DNA Mini Kitの場合はヒラメ検査の通知法に準じて約50mgからの抽出となったため、患者便中にごくわずかなDNAしか残っていない場合は、少量の検体からでは十分に抽出できない可能性が考えられた。

K. septempunctata は、細菌やウイルスのように患者の体内では増殖しない。喫食したヒラメに含まれていた*K. septempunctata* が、短い潜伏時間の後に排出されるのみであるため、細菌やウイルスによる食中毒のように患者便に持続的に排出されることもない。そのため、*K. septempunctata* を患者便から検出するには、検体採取のタイミングが非常に重要であると考えられている。

他の地方衛生研究所における検査では、少数ではあるが、患者便からQIAamp DNA Stool Mini KitやQIAamp DNA Mini Kitを用いてDNA抽出を行い*K. septempunctata* 遺伝子を検出している事例が報告されており、今回当部門で実施した方法でも、患者便の状態等によっては、検出される可能性はあるものと考えられる。しかし今回、依頼検査で陽性となった検体が陰性になってしまうことが、結果的に明らかとなったため、現段階で当部門では、患者便の検査に対応することはできない。

今後も、*K. septempunctata*による食中毒が疑われる有症事例が発生した場合は、十分な量の患者便検体が採取されていれば、依頼検査と併せて、当部門においても可能な範囲で検討したいと考えるが、患者便の検査についてはヒラメのような判定基準もなく、また、ヒラメ検査の通知法におけるリアルタイムPCRは他の*Kudoa*属粘液胞子虫にも交差することが判明しており、仮に検出されたとしても、多くの課題が残されている。

新たな機器の導入を必要とせず、ルーチンで対応可能な、患者便等からの*K. septempunctata*検査法の公定法の策定が望まれる。

京都市における蚊の病原体保有状況とその分子生物学的解析

微生物部門

○杉江 真理子, 渡辺 正義, 近野 真由美 (上京区役所保健部)

1 目的

デングウイルス及びチクングニアウイルスは、近年日本で検査の需要が高まっている節足動物媒介性（アルボ）ウイルスである。媒介蚊は主にネッタイシマカやヒトスジシマカで、患者発生国ではヒト-蚊-ヒトのサイクルで伝播し、都市部で流行を引き起こしている。3～10 日間の潜伏期の後に、全身の不快感、倦怠感といった前駆的的症状があり、突然の発熱、頭痛、全身の筋肉痛がほぼ同時に出現する。発熱は二峰性であることが多いが、約1週間で解熱する。デング熱は、自然治癒傾向の強い疾患であるが、血小板減少による出血症状を伴ったデング出血熱にまで移行することがあり、さらにデングショック症候群まで進行した場合、適切な治療を施さないとショック死する危険性もある。チクングニアウイルスは、デングウイルスと同じくネッタイシマカやヒトスジシマカにより媒介され、3～7 日間の潜伏期の後に、熱と筋肉痛や関節痛を主な症状とする急性の発疹性熱性疾患を引き起こす。症状がデング熱と類似するため、流行地域からの熱性患者では、鑑別診断が必要となる。デング熱やチクングニア熱にはワクチン及び特効薬がなく、その予防は、いかに感染蚊から身を守るか、感染蚊を増やさないかが焦点となる。

そこで、媒介蚊における、デングウイルス及びチクングニアウイルスの保有状況を早期に探知することを目的に、京都市内で捕集したヒトスジシマカのメスを使用し、ウイルスの遺伝子検出を行った。

2 方法

捕集したヒトスジシマカのメス約20匹を1プールとして、BPA加イーグルMEM培地中で粉碎後、遠心分離した上清を検液とした。検液からRNAを抽出し、デングウイルス及びチクングニアウイルスの遺伝子検出を国立感染症研究所の病原体検出マニュアルに従い実施した。

なお、検液はマイナス80℃で保存し、京都産業大学において保存検液を使用したアルボウイルスの検査が行われた。

3 結果

京都市衛生環境研究所捕集2135匹、中京保健センター捕集318匹、南保健センター捕集364匹、計2817匹(127プール)について検査した結果、デングウイルス及びチクングニアウイルスは、全て陰性であった。また、京都産業大学においても、現在のところ、その他のアルボウイルスは検出されていない。

4 考察

京都市では、デング熱及びチクングニア熱発生国を含めた海外からの観光客数が増加しており、一方、近年の日本国内においての海外旅行者数は横ばいではあるが、デング熱の輸入症例数は急増している。また、デングウイルスは、ヒトに感染した場合、かなりの割合で不顕性感染に終わると考えられており、デング熱を発症した場合においても、潜伏期間中に検疫を通過することが容易に起こり得るため、実際の届出数以上に潜在的な患者及び病原体保有者が存在することが推測される。海外では、これまで発生の報告がなかった国においても、2007年にはイタリアでチクングニア熱の流行が報告され、2010年にはフランスでデング熱及びチクングニア熱の国内発生が報告されており、日本においても注意が必要と考えられる。

今回の結果では、デングウイルス及びチクングニアウイルスは検出されなかったが、両ウイルスの流行の危険性は年々高まっており、今後も長期的なサーベイランスが重要である。

「鳥インフルエンザウイルス」のヒトへの感染

微生物部門

○渡辺 正義, 杉江 真理子, 近野 真由美 (上京区役所保健部)

1 目的

平成 21 年に発生した新型インフルエンザ (AH1pdm09) のように、インフルエンザウイルスは変異しやすく、鳥型由来のパンデミックが世界的に危惧されている。

そこで、鳥インフルエンザウイルスの早期発見、インフルエンザウイルス変異の解析、ヒトへの感染防止など公衆衛生に役立つことを目的に、昨年に引き続き、鴨川河畔で採取したカモ糞便から、インフルエンザウイルス分離を行った。また、ウイルスの遺伝子再集合が起きやすい豚のインフルエンザウイルスの調査も行った。

なお、本調査研究は京都産業大学との共同研究である。

2 方法

(1) インフルエンザウイルスの宿主動物であるカモ糞便を、鴨川河畔で採取した。採取した検体は京都産業大学で、孵化鶏卵法によるインフルエンザウイルス分離を行った。

調査期間は、カモ飛来シーズンの平成 24 年 12 月から平成 25 年 3 月までとし、期間中週 1 回、鴨川河畔 (丸太町橋から北山大橋間) において検体採取を行った。

(2) 食肉検査部門に依頼し、京都市と畜場に搬入された豚から、鼻腔ぬぐい液を採取した。

調査期間は、ヒトにおけるインフルエンザ流行シーズンと想定した平成 24 年 12 月から平成 25 年 3 月までとし、期間中週 1 回、各 10 検体を採取した。

採取した検体は、MDCK 細胞を用いた定法により、ウイルス分離を行った。

(1)、(2)について、ヒトに感染する可能性があるインフルエンザウイルスが分離された場合は、リアルタイム RT-PCR 法により同定し、当研究所で同定困難なインフルエンザウイルスについては、京都産業大学に詳細な検査を依頼することとした。

3 結果

(1) 12 月 3 日から 3 月 25 日の間 (計 8 回)、カモ糞便 471 検体を採取し、インフルエンザウイルス分離を行ったが、いずれの検体からもインフルエンザウイルスは分離されなかった。

(2) 12 月 3 日から 3 月 19 日の間 (計 15 回)、食肉検査部門に依頼し、豚鼻腔ぬぐい液 150 検体を採取した。検体を MDCK 細胞に接種したところ、いずれの検体からもインフルエンザウイルスは分離されなかった。

4 考察 (結論及び評価)

本シーズンの調査において、カモ糞便からインフルエンザウイルスは分離されなかった。一方、環境省が実施している野鳥における定期糞便検査の結果によると、平成 23-24 年シーズンは約 13000 検体から 27 検体の低病原性鳥インフルエンザウイルスが分離されている¹⁾。今シーズンの京都市における検査では検出されなかったが、全国的な調査結果を勘案すると、定期的な調査をすることが重要と考えられる。

また、豚鼻腔ぬぐい液についても、本調査ではインフルエンザウイルス分離はされなかった。しかし、アメリカでは豚インフルエンザウイルス A (H3N2v)²⁾、中国では鳥インフルエンザウイルス A (H7N9) のヒトへの感染が報告されており³⁾、インフルエンザウイルスの動向は、常に監視の必要があるといえる。

参考文献等

- 1) 平成23-24年シーズンの野鳥における鳥インフルエンザウイルス保有状況調査の結果について：
環境省自然環境局鳥獣保護業務室：平成24年8月22日
- 2) CDC ホームページ 「Information on Influenza A (H3N2) Variant Viruses (“H3N2v”)」
- 3) WHO ホームページ 「Avian influenza A(H7N9) virus」

食肉輸送車の衛生管理について

食肉検査部門

○田村 和義

1 目的

京都市中央卸売市場第二市場に出入りする食肉輸送車の衛生管理状況を調査し、指導・啓発することで食肉衛生向上を図る。

2 方法

第二市場に出入りする買参業者及び内臓等取扱業者の食肉輸送車の輸送担当者または管理責任者に対する聞き取り調査及び荷台のふきとり検査を実施した。不適切な業者に対して口頭及びチラシで指導・啓発し、必要に応じて再検査を実施した。

3 結果

買参業者は車両の洗浄に関して湯や洗剤を用いるなど意識が高く、ふきとり検査の結果も大腸菌群数は検出下限値以下、一般細菌数は9業者中8業者で100 cfu/cm²以下と、ともに良好であった。一方、内臓等取扱業者は洗浄しない、あるいは水洗いのみのような不十分な洗浄が多く、明らかな埃や汚れが認められた。また、ふきとり検査の結果は2業者で大腸菌群を検出し、一般細菌数は全ての業者で100 cfu/cm²以上と高値を示した。

大腸菌群を認めた2業者に対しては指導・啓発後、再調査を行った。その結果、大腸菌群数は検出下限値以下、一般細菌数は100 cfu/cm²未満となった。

内臓取扱業者は不十分な洗浄が多く、ふきとり検査結果で汚染が顕著に認められたため、翌年度さらに調査を実施し、汚染が認められた業者には指導・啓発を行った。

4 考察

今回の調査では、買参業者は日常的にしっかりと車両の洗浄を行っているが、内臓等取扱業者は洗浄不十分な車両が多かった。このことを裏付けるように、ふきとり検査結果でも内臓等取扱業者の荷台は汚染が顕著に認められた。これらの原因としては内臓運搬時に液体成分の飛散によって荷台が汚染されやすいこと、車両の衛生管理に関する意識が低かったことなどが考えられる。

今回の指導・啓発によって、衛生意識の低い業者に対しては洗浄方法や車両の取扱いを改善することができた。しかし、一度改善した業者でも期間があくとまた汚染された状態に戻ってしまったので、今後も定期的に指導することで業者に衛生的な車両を維持することを習慣化し、食肉衛生の向上につなげていきたい。