

抄 録

1) 他誌掲載論文

Development of macrolide resistance-associated mutations after macrolide treatment in children infected with *Mycoplasma pneumoniae*

Suzuki Y., Shimotai Y., Itagaki T., Seto J., Ikeda T., Yahagi K.,
Mizuta K., Hongo S., and Matsuzaki Y.
J Med Microbiol. 66:1531–1538, 2017.

PURPOSE:

To determine the timing of the emergence of macrolide-resistant mutations after macrolide treatment in individuals with *Mycoplasma pneumoniae* infections.

METHODOLOGY:

Between October 2011 and December 2013, serial pharyngeal swab specimens were collected before and after macrolide treatment from 21 otherwise healthy children infected with *M. pneumoniae* without macrolide-resistant mutations. The copy numbers of a *M. pneumoniae* gene and the proportion of clones showing macrolide-resistance mutations were determined for each specimen.

RESULTS:

After macrolide treatment (10-15 mg kg⁻¹ day⁻¹ clarithromycin for 5-10 days or 10 mg kg⁻¹ day⁻¹ azithromycin for 3 days), fever resolved in 19 (90%) of 21 children within 1 to 2 days, and the *M. pneumoniae* gene copy number decreased in all but one specimen in the second set of specimens relative to the number in the corresponding initial specimens. None of the second specimens, which were collected 2-4 days after initiation of macrolide treatment, showed mutations in the 23S rRNA gene. However, the proportion of mutant clones with A2063G and A2064G mutations in the specimens collected 7-24 days after initiation of treatment increased to 100%. We identified a family in which three members had *M. pneumoniae* infections. The analysis of transmission in this household indicated that the *M. pneumoniae* harboring a macrolide-resistant mutation that developed in the index patient after macrolide treatment was not transmitted to the family members.

CONCLUSION:

A macrolide-resistant population might develop in individual patients up to 24 days after initiation of macrolide treatment. However, the decrease in *M. pneumoniae* load after macrolide administration effectively reduces interpersonal transmission.

Convenient PCR method for variable-number tandem-repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates

Seto J., Wada T., Suzuki Y., Ikeda T., Mizuta K., Mitarai S., and Ahiko T.
J Microbiol Methods. 139:12–14, 2017.

Variable-number tandem-repeat typing for *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates contributes to evidence based tuberculosis control. However, cumbersome PCR procedures for the typing have disturbed routine analyses. We proposed a convenient PCR method for the typing using a PCR master mix that provides rapidity and long-term stability of the frozen PCR cocktail.

First isolation of human parechovirus type 4 in Yamagata, Japan

Tanaka S., Matoba Y., Unno M., Ikeda T., Itagaki T., and Mizuta K.

Jpn J Infect Dis. 70:689–690, 2017.

抄録なし

Multiple-Locus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis of *Mycoplasma pneumoniae* Isolates between 2004 and 2014 in Yamagata, Japan: Change in Molecular Characteristics during an 11-year Period

Suzuki Y., Seto J., Shimotai Y., Itagaki T., Katsushima Y., Katsushima F., Ikeda T., Mizuta K.,

Hongo S, and Matsuzaki Y.

Jpn J Infect Dis. 70:642–646, 2017.

Multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis (MLVA) typing was performed for *Mycoplasma pneumoniae* strains isolated between 2004 and 2014 in Yamagata, Japan. The results were examined by considering the combination of the P1 type and prevalence of macrolide resistance-associated mutations. Four-locus (Mpn13-16) MLVA classified 347 strains into 9 MLVA types, including 3 major types: 3-5-6-2, 4-5-7-2, and 4-5-7-3. All type 3-5-6-2 strains (77 strains) were P1 type 2 variants (2a or 2c), while types 4-5-7-2 (181 strains) and 4-5-7-3 (75 strains) were P1 type 1. MLVA type 4-5-7-2 strains circulated and were dominant until 2010, accounting for 88.4% of the 121 strains isolated between 2004 and 2010. The prevalence of types 4-5-7-3 and 3-5-6-2 strains increased rapidly in 2011 and 2012, respectively, resulting in cocirculation of 3 MLVA types, including type 4-5-7-2, between 2011 and 2013. The prevalence of macrolide resistance-associated mutations in MLVA types 4-5-7-2, 4-5-7-3, and 3-5-6-2 strains was 59.7% (108/181), 25.3% (19/75), and 0% (0/77), respectively. Because the prevalence of macrolide resistance-associated mutations differed by current MLVA types in Yamagata, continued surveillance combined with molecular typing and identification of macrolide resistance-associated mutations is necessary.

2015 年山形市近郊で流行したコロナウイルス 0C43 感染症

板垣勉, 的場洋平, 水田克巳, 松寄葉子

日本小児科医会会報 53:131–134, 2017.

山形市近郊で 2015 年 1 月から 3 月までのインフルエンザ迅速診断陰性 290 例, 296 例からヒトコロナウイ

ルス OC43 が 87 検体で検出され、インフルエンザシーズンで大きな地域流行と通園施設内での集団感染が確認された。87 検体のうち同一者複数回検体およびウイルス分離培養法による混合感染のない 81 例を検討した。症状は発熱 (92.6%)、鼻汁 (54.3%)、咳(39.5%)、で特に優位な症状や特異な咽頭所見はみられなかった。また細菌感染症との鑑別は総白血球数、%顆粒球数、CRP 値や児の臨床評価である程度鑑別可能であった。複数回検索した 2 例の 9 カ月児でそれぞれ 17 日後、23 日後にも検出され乳児ではウイルス排泄期間が長引くことが示唆された。

ヒトパレコウイルス 3 型感染に伴う成人の流行性筋痛症 17 例の検討

山川達志, 水田克巳, 黒川克朗, 永沢光, 山田尚弘, 鈴木恵美子, 和田学
臨床神経学. 57:485-491, 2017.

We investigated 17 adult cases (14 males and 3 females) of myalgia induced by human parechovirus type 3 (HPeV3) infection, treated during the summers of 2008, 2011, 2014, and 2016. The patients were aged between 21 and 50 years. The limbs and trunk of all patients were affected, and severe myalgia, muscle weakness, and decreased grip strength were observed. In addition to myalgia and muscle weakness, symptoms included fever in 14 (82%), upper respiratory inflammation in 8 (47%), gastroenteritis in 4 (24%), and scrotal pain in 4 (29% of males) patients. Tendon reflexes were preserved, and serum creatine kinase level increased in all but 1 patient. Spinal MRI was performed for 3 patients, with normal results. Musculoskeletal MRI scans showed abnormal signals in the femoral muscles in 2 of 5 patients. In a nerve conduction test, the frequency of F wave appearance in the median nerve was 40% or less in 5 of 9 patients, and repeater F waves were seen in 2 patients. Of these, 7 patients had infants in their families, and developed fever around the same time; they may have been infected by these infants. All patients recovered within 1-2 weeks. HPeV3 infection is characterized by severe myalgia, and is frequently observed in summer every 2-3 years.

Detection of Saffold viruses from children with acute respiratory infections in Yamagata, Japan, between 2008 and 2015

Itagaki T., Aoki Y., Matoba Y., Tanaka S., Ikeda T., Matsuzaki Y., and Mizuta K.
J Med Virol. 90:34–40, 2018.

Although Saffold virus (SAFV) was reported as a novel human cardiovirus in 2007, no causative association between SAFV and clinical disease has been proven and the longitudinal epidemiology of SAFVs is not available. To establish the relationship between SAFVs and acute respiratory infections (ARIs) and to clarify the longitudinal epidemiology of SAFVs, 7258 nasopharyngeal specimens were collected from children with ARIs in Yamagata, Japan between 2008 and 2015. The specimens were inoculated on a microplate including six cell lines as part of routine surveillance, and molecular screening was performed for SAFVs using a reverse transcription (RT)-PCR method. Throughout the study period, 95 (1.3%) SAFV genotype 2 (SAFV2), and 28 (0.4%) SAFV3 were detected, mainly between September and November. There were two outbreaks of SAFV2 in 2009 and 2013, and one

outbreak of SAFV3 in 2012 and the positive rates during these outbreaks were 12.1% (53/439), 11% (35/319), and 4.4% (20/453), respectively. Sixty-three SAFV2 and 28 SAFV3 strains were detected as a single virus from children with ARIs such as pharyngitis, herpangina, and tonsillitis. These results suggested that SAFV2 and SAFV3 are possible causative agents of ARIs among children and their infections occur mainly in the autumn season in Japan.

Trends of human coronaviruses in Yamagata, Japan, in 2015-2016 focusing on the OC43 outbreak of June 2016

Matoba Y., Aoki Y., Tanaka S., Unno M., Komabayashi K., Ikeda T., Shimotai Y., Matsuzaki Y., Itagaki T., and Mizuta K.

Jpn J Infect Dis. 71:167–169, 2018.

抄録なし

Clinical characteristics of children infected with enterovirus D68 in an outpatient clinic and the association with bronchial asthma

Itagaki T., Aoki Y., Matoba Y., Tanaka S., Ikeda T., Mizuta K., and Matsuzaki Y.

Infect Dis. 50:303–312, 2018.

BACKGROUND:

All reports of increases in severe respiratory disease associated with human enterovirus D68 (EV-D68) are from hospital settings. However, there are few reports describing clinical characteristics in less severely affected populations.

METHODS:

We conducted a retrospective observational study from January 2010 to December 2015 in Yamagata, Japan. Using regional passive surveillance, 5794 respiratory specimens were collected from children who initially presented to an outpatient clinic with acute respiratory symptoms. The collected samples were tested for EV-D68 by reverse transcription PCR.

RESULTS:

EV-D68 was detected in 79 specimens mainly during the two epidemic periods in August-October 2010 and August-October 2015, when detection rates were 10.2% (31 of 304 specimens) and 16.3% (46 of 282 specimens), respectively. Among the 69 EV-D68-positive children, excluding those with viral coinfection, 39 (57%) had upper respiratory tract infections, 23 (33%) bronchiolitis or asthma attack, 5 (7%) bronchitis, 1 (1%) meningitis and 1 (1%) acute flaccid paralysis. In 23 children with wheezing, retraction was observed in 10 (43%), and six (26%) were diagnosed with asthma exacerbation. Six children required hospital admission, five (83%) because of asthma exacerbation. A history of asthma or wheezing was the most significant risk factor for the development of wheezing (odds ratio, 8.23; 95% CI, 2.65-25.50; $p < .001$).

CONCLUSIONS:

The low rate of hospitalization (9%, 6 of 69) indicates that most cases with EV-D68 infection were managed as

outpatients. A history of asthma or wheezing was a potential risk factor for wheezing, resulting in hospitalization due to a severe asthma attack.

パラインフルエンザウイルスが分離された発疹症の 4 例

勝島由利子, 勝島史夫, 水田克巳, 松寄葉子

小児科診療 81:125-128, 2018.

パラインフルエンザウイルス感染の経過中に発疹症をきたした 4 例を経験した。年齢は生後 2 ヶ月~5 歳。男児 2 名, 女児 2 名。発疹の性状は小型の淡い粟粒疹であり, 体幹を中心に出現し, 一部手足, 顔面にも波及していた。パラインフルエンザウイルスの型は 1 型が 1 名, 2 型が 1 名, 3 型が 2 名であった。発疹が出現した時期は発熱前や, 発熱後, また, 無熱で経過中出现したものと様々であった。

山形県における高齢者の内因性再燃結核症例の季節性

瀬戸順次, 阿彦忠之

結核 93:93-100, 2018.

〔目的〕国内で多数を占める高齢の内因性再燃結核患者について, 発病者が増加する時期や結核診断上注意を要する時期を明らかにすること。〔方法〕2009~2015 年の山形県における 60 歳以上の結核患者のうち, 結核菌分子疫学により最近の外来性感染による発病の可能性が低いと判断された 296 人を内因性再燃高齢結核症例として選定。これを発見方法別に有症状医療機関受診 157 人, 救急 30 人, 定期通院 26 人, 健康診断 22 人, 高齢者施設での結核非特異的体調悪化 14 人, およびその他 47 人に分類し, それぞれの季節性を検討した。〔結果〕有症状医療機関受診では, 発病者は冬 (12~2 月) が夏 (6~8 月) よりも, 初診患者は春 (3~5 月) が秋 (9~11 月) よりも有意に多かった。定期通院発見例の診断月は, 4~6 月が 1~3 月よりも有意に多かった。〔考察〕山形県の内因性再燃高齢結核症例の発見方法の一部で, 患者発生に季節性があることが示唆された。わが国で結核の早期発見を促す啓発活動を推進する際には, 有症状医療機関受診における冬から春の時期のように, 発病者や初診患者が多いと想定される時期に重点的に展開するのが効果的と考えられた。

2) 学会発表

2014-2015年における山形県のヒトコロナウイルスの流行

的場洋平, 水田克巳, 松寄葉子

第58回日本臨床ウイルス学会, 2017年5月27日, 於長崎市

【目的】ヒトコロナウイルス (229E, OC43, NL63, HKU1) は普通感冒の原因ウイルスとして知られるが, 日本国内における疫学情報は限られている. そのため, 我々は山形県内におけるヒトコロナウイルスのサーベイランスを実施している. 今回, 2014~2015年のヒトコロナウイルスの検出状況を報告する.

【方法】2014年1月から2015年12月に山辺こどもクリニックを受診し, 感染症発生動向調査の一環として患者もしくは保護者から同意を得て採取した1,899検体の咽頭拭い液・鼻腔吸引液について, リアルタイム PCR 法により, ヒトコロナウイルス遺伝子の検出を行った. 【結果】OC43が113検体 (6.0%), NL63が49検体 (2.6%), HKU1が19検体 (1.0%), 229E が2検体 (0.1%) から検出された. 月別検出率が10%を超えた月は, OC43では, 2014年2月, 2015年1月, 2月, NL63 は2014年4月, 2015年4月, HKU1は2015年12月であった. OC43の月別検出率が30%を超えた2015年1~2月には, 3つの保育所において, 2~3週間の間にそれぞれ3人, 7人, 4人の OC43陽性事例が確認された.

【考察】一般的にコロナウイルスの流行は冬季とされ, 2年間の観察結果はそれを裏付けるものであったが, 種類によりピーク時期に違いが認められた. 2015年に大きな流行が観察された OC43については, 短期間に3つの保育所それぞれで複数の OC43 陽性例が確認されたことから, 施設内流行を起こしうる可能性が示唆された. このことから, OC43はインフルエンザと同時期に流行し, 施設内流行を起こしうるウイルス感染症として注視する必要がある.

[非会員研究協力者: 青木洋子・田中静佳 (山形衛研), 下平義隆 (山形大学医学部感染症学講座), 板垣勉 (山辺こどもクリニック)]

咬傷歴のない鼠咬症の1例小野寺啓, 上北洋徳, 渡邊達也, 平カヤノ, 渡部千沙, 斎藤博子, 瀬戸順次, 鈴木裕,
今岡浩一

第211回日本内科学会東北地方会, 2017年6月17日, 於仙台市

【症例】76歳, 男性. 【主訴】意識障害. 【現病歴】某日午後より過度の眠気と構音障害, 意識障害が出現し当院へ搬送された. JCS-10で尿失禁状態, 体温37.3℃, 右肘関節痛と左股関節痛を認めたが, 皮疹はなかった. 血液検査ではWBC 18,690 / μ l, CRP 5.5 mg/dlと炎症反応を認めたが, CT等の画像検査では意識障害の原因は不明だった. 入院後, 新たに腰痛も出現した. 入院時の血液培養からフィラメント状のグラム陰性桿菌が検出され, TAZ/PIPC 投与を開始したところ, 第7病日に解熱し意識清明となった. このグラム陰性桿菌は, 16S rRNA 遺伝子ダイレクトシーケンスで得られた塩基配列が, 鼠咬症の原因菌である *Streptobacillus moniliformis* 基準株(CP001779)の配列と100%一致した. 明かな咬傷歴はなかったが, 再度の問診でネズミ糞尿との接触が起こりうる居住環境であると判明し, 鼠咬症と診断した. 抗生剤治療が奏功し第13病日に退院した. 【考察】咬傷

歴がなくネズミ糞尿などに汚染された水を介して感染し、鼠咬症を発症した例が近年報告されている。症状は、発熱、発疹、移動性多発関節痛が特徴的である。原因不明の発熱や発疹を認めた場合には、稀な感染症である鼠咬症も鑑別として挙げる必要があると考えられた。

山形県における麻しん集団発生

駒林賢一，池田辰也，瀬戸順次，田中静佳，鈴木裕，的場洋平，海野真紀，水田克巳
第71回日本細菌学会東北支部総会，2017年8月3-4日，於仙台市

【目的】2017年3月～4月に山形県において輸入感染事例を発端とした麻しんの集団感染事例が発生した。症状が非典型的な修飾麻しん患者が主体の群における遺伝子検査結果の特徴ならびに感染が拡大した要因について明らかにすることを目的とした。

【方法】麻しんを疑った患者（137名）から採取した咽頭拭い液，尿，全血血液，血清について，国立感染症研究所の病原体検出マニュアルに従い麻しんウイルス（MV）遺伝子の検出を行った。また，保健所による聞き取り調査で得た疫学的情報に基づき麻しん伝播に関する検討を行った。

【結果】リアルタイム RT-PCR 法（qPCR）では434検体中111検体が陽性であった。qPCR で判定保留の15検体のうち6検体がコンベンショナル PCR 法で陽性となり，陽性患者は計53名であった。検体別では4種の検体の内，全血血液の陽性率が87%と最も高かった。感染を拡大させたと考えられた4名のスプレッダーの存在が判明した。その中に，咽頭拭い液の qPCR における Ct 値が25未満と低い，すなわち MV 遺伝子量が多い患者がいた。

【考察】検出率は全血血液が最も高く，感度の高い検体と考えた。判定保留のケースは修飾麻しん患者で検体中のウイルス量が少ないためと考えた。MV 量が多いスプレッダーが麻しんの自覚なく活動を続けたことが感染拡大の要因と考えた。

Evaluation of the virus clearance capacity of NIID-MDCK cells

Hamamoto I., Takahashi H., Mizuta K., Sato K., Nishimura H., Odagiri T.,
and Nobusawa E.

第65回日本ウイルス学会，2017年10月24-26日，於大阪市

【Objective】 In Japan a cell-culture system has been considered for seasonal influenza vaccine production. To isolate vaccine viruses from clinical specimens, we established qualified NIID-MDCK cells. One of the major concerns in isolating the viruses in NIID-MDCK cells is the contamination of adventitious agents from clinical specimens. Therefore, in this study we have examined the clearance capacity of NIID-MDCK cells against the adventitious viruses and evaluated the usefulness of NIID-MDCK cells.

【Materials and Methods】 Following respiratory viruses, which are likely to be present in clinical specimens together with influenza viruses, were selected as probable adventitious viruses: RS virus, human metapneumovirus, human rhinovirus 16, human coronavirus, human adenovirus 4, herpes simplex virus type 1, enterovirus D68 and

human parainfluenza virus type 3 (HPIV3). NIID-MDCK cells and the permissive cells were infected with the respective viruses and incubated for 72 hours. The supernatants of infected cells were harvested and used for the next passages in the respective cells. After each passage, the copy numbers of viral genomes in the cell culture supernatants were determined by a multiplex real-time RT-PCR assay.

【Results】 After 2 to 4 passages of the viruses in NIID-MDCK cells, genomes of most viruses other than HPIV3 were not detected, but were detected after the same passages in permissive cells. The genome of HPIV3 was detected even after five passages in NIID-MDCK cells and the number of HPIV3 genome copies increased by serial passage in both cells.

【Discussion】 These results suggested that most of the adventitious respiratory viruses except for HPIV3 could be eliminated from the vaccine viruses by passaging in NIID-MDCK cells. Therefore, NIID-MDCK cells are suitable to be used to isolate vaccine viruses for the cell-cultured seasonal influenza vaccines.

Attachment receptors negatively affect neurovirulence and positively affect in vitro replication of Enterovirus 71

Kobayashi K., Sudaka Y., Takashino A., Mizuta K., and Koike S.

第65回日本ウイルス学会，2017年10月24-26日，於大阪市

[Background] In the last meeting, we presented that Enterovirus 71 (EV71) possessing a glutamic acid (E) residue in 145 of capsid protein VP1 (VP1-145E) is highly pathogenic, whereas viruses possessing a glycine (G) residue in that position (VP1-145G) is low pathogenic in hSCARB2-tg mouse model. VP1-145G virus replicates in cultured cells more efficiently than VP1-145E virus. The reason for these differences remains unknown. VP1-145G virus reportedly binds to heparan sulfate (HS) but not VP1-145E does, although these viruses equally bind to hSCARB2. We hypothesized that attachment to HS affects replication efficiency of EV71 in vivo and in vitro.

[Materials and Methods] VP1-145G and E viruses were prepared from infectious cDNA clones. We collected blood and some tissues after i.v. injection of the viruses to hSCARB2-tg mice and determined viral titer by TCID50. Liver homogenate prepared from hSCARB2-tg and non-tg mice was incubated with 1000 pfu of virus. Virus titer unbound to the homogenate was determined by plaque assay. HS-depleted RD cells (RD-HSKO) were generated by knocking out EXT1 or EXT2 gene using CRISPR/Cas9 system. Susceptibility of these cells to VP1-145G and E viruses was evaluated by plaque assay.

[Results] In in vivo study, VP1-145G virus was diminished in blood stream within 30 min after injection, whereas VP1-145E virus continuously circulated for at least 8 hours. VP1-145G virus was adsorbed to liver homogenate but not VP1-145E virus was. In in vitro study, plaque formation efficiency of VP1-145G virus, but not VP1-145E virus, was reduced in RD-HSKO cells.

[Discussion] Our data suggest that binding to HS causes adsorption of VP1-145G virus to peripheral tissues insusceptible to EV71 in vivo, and therefore negatively affects the efficient infection of VP1-145G virus in central nervous system. On the contrary, binding to HS positively affects the replication of VP1-145G virus in vitro by enhancing the attachment of the virus to host cell surface.

Establishment of EV71 vaccine efficacy test using human SCARB2 transgenic mice

Koike S., Imura A., Sudaka Y., Takashino A., Kobayashi K., Fujii K., Nishimura H.,
and Mizuta K.

第65回日本ウイルス学会，2017年10月24-26日，於大阪市

Background: Enterovirus 71 (EV71) is a causative agent of hand-foot-mouth disease (HFMD). Although HFMD is a mild disease, HFMD caused by EV71 can be associated with severe neurological disease. EV71 is a serious public health concern and the development of EV71 vaccine is an urgent issue. EV71 is classified into several subgenogroups and it is known that some EV71 strains are resistant to cross neutralization in in vitro neutralizing test. Therefore it is difficult to evaluate the vaccine efficacy only by in vitro neutralizing test. We established a novel EV71 vaccine efficacy test using human SCARB2 transgenic mouse and a set of EV71 virulent strains.

Materials and Methods: We screened a number of EV71 strains and selected virulent EV71 strains belonging to C1, C2, C4, B4 and B5 subgenogroups, respectively. We constructed full-length cDNA of these strains. We prepared the viruses by transfecting in vitro-transcribed RNA into 2D4-SCARB2 cells (RD cells lacking heparan sulfate and overexpressing human SCARB2). EV71 SK-EV006 strain (C2) was purified, inactivated by formalin and mixed with Alhydrogel™. We immunized the SCARB2 tg mice twice (at 4- and 8-week-old of age) Sera of the immunized mice were collected and neutralizing antibody titer was determined. The immunized mice were challenge by lethal dose of virulent viruses (at 10-week-old). The mice were observed daily for two weeks.

Results and Discussion: During passage of the viruses in cultured cells, the virulence of the viruses decrease very rapidly and it was difficult to maintain the virulence. By using 2D4-SCARB2 cells, we were able to propagate virulent EV71 strains stably. The inactivated EV71 elicited neutralizing antibodies in SCARB2 tg mice. The immunized mice were protected from lethal infection of viruses with different subgenogroups. Our results indicate that EV71 vaccine efficacy can be evaluated using SCARB2 tg mice and a set of EV71 virulent strains.

山形県における高齢者の内因性再燃結核患者の季節性

瀬戸順次，阿彦忠之

日本公衆衛生学会，2017年10月30日-11月2日，於鹿児島市

【目的】我が国において主流を占める高齢者結核（新登録結核患者のうち60歳以上の割合=71.8%；2015年）の早期診断等による感染拡大の防止は，結核罹患率の更なる低下に貢献すると考えられる。本研究では，高齢者結核の発病の主因と考えられている内因性再燃による結核患者を対象に，山形県において発生頻度が増加する季節，すなわち早期診断や感染拡大防止に留意すべき季節が存在するかを明らかにすることを目的とした。

【方法】2009-15年の山形県における菌陽性肺結核患者513例のうち結核菌の24領域反復配列多型 (VNTR) 分析を実施した471例から、結核推定既感染率が低い中年層以下 (59歳以下) の102例、および VNTR 分析でクラスタを形成した (つまり最近の結核感染による発病が示唆された) 73例を除外した296例を内因性再燃結核患者と推定した。本研究では、これら症例のうち有症状医療機関受診 (咳・痰・発熱等の症状を訴えて医療機関を受診) により結核と診断された157例を対象として、診断月、初診月、および CDC ガイドライン (MMMR, 54 (RR-15), 2005) に基づき推定された感染性始期 (発病月) を調査した。統計解析として、連続する3か月間の症例数が最多と最少の2群についてウィルコクソン順位和検定を実施した。

【結果】診断月では、4-6月が症例数最多 (3か月間の年平均症例数: 7.6例)、11-2月が最少 (4.6例) となった ($p=0.063$)。初診月は、最多の3-5月 (7.9例) が最少の9-11月 (4.1例) に対して有意に症例数が多かった ($p=0.017$)。発病月では、最多の12-2月 (7.3例) が最少の6-8月 (4.3例) に対して有意に症例数が多い結果となった ($p=0.031$)。

【結論】山形県の内因性再燃結核患者 (推定) のうち、有症状医療機関受診により発見された結核患者の発病時期は冬季 (12-2月) に多く、初診時期は春季 (3-5月) に多いことが明らかとなった。発病が冬季に多かった要因としては、これまでに報告されている冬季の紫外線量減少に伴うビタミン D 欠乏による免疫機能低下との関連性が考えられた。また、山形県が寒冷地・豪雪地帯であることを踏まえると、冬季の厳しい生活環境が結核の発病を助長したのかもしれない。本研究で得られた結核の季節性については、今後、他の地域における同様の研究で検証される必要があると考えられる。

山形県における2014年から2016年に分離した肺炎マイコプラズマの疫学的動向

鈴木裕, 松寄葉子

第38回山形県医学検査学会, 2017年10月28-29日, 於長井市

【はじめに】肺炎マイコプラズマ (以下, Mp) はマイコプラズマ肺炎の起因菌である。Mp は、表面抗原をコードする P1 遺伝子の塩基配列の違いにより 1 型と 2 型に大別され、流行の主流を為す P1 遺伝子型が 8~10 年間隔で交代する現象が知られている (1)。また、治療の第一選択薬であるマクロライド系抗菌薬 (以下, ML) に耐性の Mp が問題視されており、23S rRNA 遺伝子の点変異が ML 耐性を反映することが知られている (1)。本研究は、2014 年~2016 年に山形県で分離された Mp の p1 遺伝子型と 23S rRNA 遺伝子変異 (以下, ML 耐性遺伝子変異) の有無を調査することで、本県における Mp の疫学的動向を把握することを目的とした。

【対象及び方法】2014 年 1 月から 2016 年 12 月に県内の一般診療所で Mp 感染疑い患者より採取された咽頭拭い検体から分離した Mp 63 株を対象とし、著者らの既報 (2) の方法に則って p1 遺伝子型及び ML 耐性遺伝子変異を解析した。P1 遺伝子型別 ML 耐性遺伝子変異保有率をフィッシャーの直接確率法により検討した。

【結果】P1 遺伝子型解析の結果、Mp 63 株中 11 株 (17.5%) が 1 型菌、52 株 (82.5%) が 2 型菌と同定された。ML 耐性遺伝子変異解析では、8 株 (12.7%) が ML 耐性遺伝子変異保有株、55 株 (87.3%) が遺伝子変異を持たない ML 感受性株と判定された。p1 遺伝子型別 ML 耐性遺伝子変異保有率は、1 型菌が 45.5% (5/11) だったのに対し、2 型菌は 5.8% (3/52) と有意に低かった ($p<0.01$)。

年次推移を見ると、p1 遺伝子型は全期間を通じて 2 型菌が多く（2014 年；83.3%（5/6），2015 年；75.0%（3/4），2016 年；83.0%（44/53）），2016 年 8 月以降 2 型菌の分離数が増加した。ML 耐性遺伝子変異保有率は 2014 年；0%（0/6），2015 年；25%（1/4），2016 年；13.2%（7/53）で推移し、遺伝子変異を有する 2 型菌は 2016 年 10 月に初めて分離された。

【考察】国立感染症研究所によると、2016年7月以降、本県を含む全国でマイコプラズマ肺炎患者数の増加が確認されている。本研究により、P1遺伝子2型菌の増加が2016年の本県におけるマイコプラズマ肺炎流行の原因である可能性が示された。演者らによる2004年～2013年の調査（2）により、本県では2011年まで主流であった1型菌が2012年以降減少し、代わりに2型菌の割合が増加したことが示されている。今回、2014年以降も2型菌の割合が高かったことから、本県において1型菌から2型菌への交代現象が起きていること、及び交代現象が2016年に観察されたようなマイコプラズマ肺炎流行の契機となっている可能性が考えられた。本研究により、本県の2004年以降の調査においてすべて ML 感受性であった2型菌（2）が、2016年以降一部の株で ML 耐性遺伝子変異を有することが確認された。このことは、今後、本県において2型菌の ML 耐性化が進行する可能性を示唆している。よって、今後も Mp の疫学的動向の把握に努め、本県におけるマイコプラズマ肺炎に関する情報を蓄積していく必要がある。

1. 岡崎則男 他. 呼吸器系最近感染症, 第3章. 株式会社じほう, 2006; 45-65.
2. 鈴木裕 他. 感染症誌. 2014; 89: 16-22.

結核菌分子疫学により判明した遠隔地における検査室内交差汚染事例

瀬戸順次, 和田崇之, 鈴木裕, 池田辰也, 水田克巳, 阿彦忠之

第2回抗酸菌研究会, 2017年11月23-24日, 於東京

【はじめに】結核菌分子疫学の進展により、結核菌（Mtb）検査における検査室内交差汚染を科学的に証明できる時代となってきた。今回我々は、国内における主要な遺伝子タイピング手法である反復配列多型（Variable-number tandem-repeat: VNTR）分析に加え、近年導入が進みつつあるゲノム解析を用いることで、遠隔地における Mtb 検査室内交差汚染を証明した事例を経験した。

【患者】A: C 病院入院, 90歳代男性, 201x.3.xx 吸引痰塗抹(-), 29日目 Mtb 培養(+)

B: C 病院通院, 70歳代女性, 201x.3.xx+4d 喀痰塗抹(-), 35日目 Mtb 培養(+), NTM 症合併

【経過】201x年7月、感染症法に基づき山形県で実施している網羅的な患者由来 Mtb の24領域 VNTR 分析により、A・B 由来株の VNTR パターンが一致したこと、かつ2009年以降の県内 Mtb にはないパターンであったことを確認した。保健所での実地疫学調査の結果、患者間に疫学的関連性が認められず、培養検査を実施した D 検査センターにおける交差汚染が想定された。201x年10月、A・B 由来株のゲノム解析により両株間に点置換変異（SNVs）が無く、同一株であることが判明した。201x年11月、D 検査センターにおいて A・B 由来株と同時期に検査され、Mtb 培養陽性となった菌株を取り寄せ、VNTR 分析を実施した。その結果、7株中1株（由来患者の居住地は山形県から約400km の位置）が A・B 由来株と同一 VNTR パターンとなった。その後、上記3株はゲノム比較からすべて同一菌株であることが強く示唆された。最終的に、A, B は結核患者ではないと判断され、患者登録から除外された。

【考察】本事例は、WHO ガイドライン（Understanding and using tuberculosis data; 2014）における検査室内

交差汚染の要件を全て満たしていた（同一検査センターにおける同一バッチ・同一安全キャビネットでの検体処理、培養陽性までの日数が通常よりも遅い、および複数回採取された検体のうち1度だけ Mtb 陽性）。「検査センターの検査にミスがあるわけがない」という先入観から、本事例では対応が慎重となり実態解明に時間を要したが、上記要件を満たす場合には積極的に検査室内交差汚染の可能性を追究していく必要があると考えられた。偽陽性結核患者の発見が、不要な入院および不要な治療の是正という人権保護、並びに保健所における不要な感染源追跡および不要な接触者健康診断の回避という時間・経費の節減に繋がることが踏まえると、検査室内交差汚染の迅速な解明は結核菌分子疫学が担う一つの重要な役割と言える。

山形県における麻しんの集団発生

駒林賢一，池田辰也，瀬戸順次，田中静佳，鈴木裕，的場洋平，海野真紀，水田克巳

第44回山形県公衆衛生学会，2018年3月8日，於山形市

【はじめに】麻しんは麻しんウイルス（MeV）による急性呼吸器感染症である。典型麻しんでは前駆期として発熱と風邪様のカタル症状が2～5日続き，その後発疹期が3～5日続く。いずれかの症状を欠き軽症である場合は修飾麻しんと呼ばれる。日本は2015年3月に WHO 西太平洋事務局により麻しんの土着株が排除された状態と認定されたが，海外渡航者による輸入感染事例は毎年発生している。山形県では2011年以降麻しん患者の発生はなかったが，2017年3月から4月に輸入感染事例を発端とした麻しん集団発生事例を経験した。本研究では当該集団発生事例において MeV 遺伝子の検出率が高かった検体，および感染が拡大した要因を明らかにすることを目的とした。

【材料と方法】当所において，麻しん疑い患者を対象に，国立感染症研究所の病原体検出マニュアルに従い遺伝子検査をおこなった。患者から採取した全血血液より抽出した末梢血単核球（PBMC），咽頭拭い液，尿，血清より RNA を抽出し，リアルタイム RT-PCR 法（rRT-PCR）およびコンベンショナル RT-PCR 法（cRT-PCR）を実施した。また，県内保健所による疫学調査結果および県外関係機関より得た疫学情報に基づき，麻しん伝播に関する検討を行った。なお，麻しん感染後に他の都県へ移動した県外の患者の検査結果および疫学情報は，県健康福祉部健康福祉企画課を通じて入手した。

【結果】県内麻しん疑い患者137人の遺伝子検査の結果，53人が陽性であった。rRT-PCR と cRT-PCR の結果より，434検体中115検体が陽性であった。遺伝子検査陽性者の検体種別の陽性率は PBMC91%（48/53 検体），咽頭拭い液65%（33/51検体），尿57%（29/51検体），血清23%（5/22検体）であった。県外では初発患者と接触のあった7人から MeV 遺伝子が検出された。

疫学調査の結果，初発患者は関東在住の20代男性で，2月20日～26日にインドネシアのバリ島へ旅行歴があり，3月2日に自動車教習所に通うために来県していた。翌3月3日に発熱し，8日に医療機関を受診，9日に当所において当該患者検体から MeV 遺伝子を検出した。以後感染が拡大して4次感染まで発生した。4月15日まで発生した患者は計60人（典型麻しん22人，修飾麻しん38人）であり，麻しん排除認定以降最大の集団発生事例となった。

二次感染以降の感染源となった患者（スプレッダー）は7人いた。そのうち初発患者を含む3人は診断の遅れなどの理由により発症中に他者との接触を続けており，25，16，9人へ麻しんを伝播していた。残り4人は1～2人に麻しんを伝播していた。スプレッダーのワクチン接種歴は未接種5人，接種歴不明と1回接種

が各1人であった。また、病型は典型麻しん6人、修飾麻しん1人であった。

【考察】MeV 遺伝子の検出率はPBMCが最も高く、遺伝子検査に適した検体と考えられた。感染拡大の要因として、麻しんワクチンの未接種者が典型麻しんを発症し感染源となったこと、診断の遅れなどの理由で集団内で活動を続けたことの2点が考えられた。麻しんは感染力が非常に強く、集団発生を防ぐために人口の95%以上が2回接種を実施するよう推奨されている。輸入感染事例を散発に留めるために、予防接種2回の啓発を徹底し、麻しんに対し十分な免疫力を持った集団の維持を目指していく必要がある。

A case of cross-contamination in a laboratory at remote location clarified by molecular epidemiology for *Mycobacterium tuberculosis*

Seto J., Wada T., Suzuki Y., Ikeda T., Mizuta K., and Ahiko T.

The 52nd US-Japan Mycobacteria Panel Meeting, 2018.3.15-16, Niigata-city.

Abstract

Molecular epidemiology for *M. tuberculosis* (Mtb) can identify cross-contamination of Mtb culture in laboratory settings. We clarified a case of cross-contamination that occurred in a laboratory distant from Yamagata, Japan, using variable-number tandem-repeat (VNTR) typing and comparative genomics.

In April, two patients with pulmonary tuberculosis (TB) who visited a hospital were reported in Yamagata, Japan. Sputum specimen from patient A (age, ≥ 90 years, male), collected in March, was negative for Mtb in the smear test, but was Mtb-positive after culturing for 29 d. Sputum specimen from patient B (age, ≥ 70 years, female), which was collected 4 d after specimen collection from patient A, was negative for Mtb in the smear test, but positive after culturing for 35 d. In July, we acquired Mtb strains isolated from sputum samples of patients A and B in a laboratory, which is located > 300 km from Yamagata. Comprehensive 24-locus VNTR typing in Yamagata revealed that the two strains formed a cluster (i.e., showed indistinguishable VNTR patterns). Furthermore, the cluster was detected for the first time in Yamagata since 2009. An epidemiological relationship was not detected between the patients despite thorough contact tracings by a public health center (PHC). However, the PHC found that sputum specimens from patients A and B were consecutively pretreated and cultured in the same batch in the laboratory. Furthermore, sputum specimens of the two patients collected on other days were all culture-negative. In October, comparative genomics revealed that there were no single nucleotide variants (SNVs) between the two strains, and cross-contamination was strongly suspected. In November, we obtained five Mtb strains isolated from culture-positive samples in the same batch as samples with strains A and B from the laboratory. Consequently, a strain isolated in the laboratory from a sample of patient J, who lived approximately 400 km from Yamagata, was part of the same cluster as strains A and B. Thereafter, comparative genomics clarified that strains A, B, and J had an identical genome with no SNVs. The PHC concluded that the case was one of cross-contamination, in which specimens A and B were contaminated by specimen J, which was pretreated immediately before the two specimens. Finally, patients A and B were excluded from the TB notification.

This case fulfilled the requirements for cross-contamination mentioned in the guidelines of the World Health Organization (WHO)¹: consecutively processed samples in a single laboratory have indistinguishable genotypes; samples were batch-processed or shared a safety cabinet; the culture growth was unusually slow; only one of the specimens taken was culture-positive. In this case, a considerable amount of time had elapsed till we clarified that the case was that of cross-contamination; however, a better practice is necessary to identify the problem rapidly and notify all relevant parties, especially when a case fulfills the requirements of the WHO guideline. We strongly recognize that timely identification of false-positive TB patients leads to protection of human-rights by reducing needless hospitalization and treatment, and saves time and expenses by avoiding unnecessary contact tracings and medical checkups by PHCs. Molecular epidemiology for Mtb may assume an important role for rapidly detecting cases of cross-contamination.

Reference

1) Understanding and using tuberculosis data. The World Health Organization. 2014;83-107.

平成 29 年の村山・庄内地域における蚊の生息状況調査

小川直美, 山田浩貴, 小松秀一, 伊藤真由美.

第 44 回山形県公衆衛生学会, 2018 年 3 月 8 日, 於山形市

山形県内に生息する蚊の種構成, 季節的消長について明らかにすることを目的に平成 28 年に引き続き山形県内の蚊の生息状況を調査した。調査地点は, 村山地区と庄内地区の各 5 地点で, 6 月～10 月の隔週 (月 2 回), ドライアイス併用ライトトラップ法で調査を行った。結果, 村山地区では 6 種の蚊の生息が確認され, 優占種はヒトスジシマカであった。庄内地区では, 5 種の蚊の生息が確認され, 優占種はアカイエカ群であった。捕集数の合計は, 村山地区 114 頭, 庄内地区 219 頭であった。平成 29 年の捕集数は, 平成 28 年に比べて大幅に減少した。特にアカイエカ群の捕集数は半減した。捕集当日の気温と捕集数の関係について相関分析したところ, アカイエカ群では平均気温, 最高気温, 最低気温と正の相関が統計的有意性をもって認められた。また, 月別の捕集数と気温との関係についても相関分析したところ, 日最高気温が 25℃ 以上の日数, 20℃ 以上の時間数と正の相関が統計的有意性をもって認められた。

呈色反応によるツキヨタケの鑑別法と調理品への適用

大河原龍馬, 篠原秀幸, 佐田厚史.

第 54 回全国衛生化学技術協議会年会, 2017 年 11 月 21 日~22 日, 於奈良県奈良市

山形県では毒キノコによる食中毒が近年増加しており, 平成 24~28 年の 5 年間で 38 件発生した. そのうちツキヨタケが原因となった事例が 27 件 (71%) で最多であった. これは, ツキヨタケの形態が食用のキノコ (ムキタケ, ヒラタケ, シイタケ) と似ていることから, 誤って採取し喫食するためと考えられる. そこで, 食中毒を未然に防止するため, 採取現場で簡易・迅速かつ安全にツキヨタケを鑑別する手法を検討した. その結果, 一般的な試薬により調製可能なビーム試薬を使用し, 少量の検体及び試薬, 簡易なエタノール抽出でツキヨタケと食用きのこを鑑別することができた. また, 調理品として醤油汁, 油炒めや塩漬けした場合であっても, ツキヨタケ試料では呈色が認められた. したがって, 未調理検体だけでなく, 調理検体にも適用可能な手法であることが分かった.

さらに, ツキヨタケに含まれる呈色物質を特定すべく液・液分配及び薄層クロマトグラフィーによる成分の分離を行った. 分離物質のメタノール溶液についてそれぞれアルカリ性条件下, 酸性条件下で吸光度の測定を行ったところ, 極大波長から呈色物質が得られていることを確認した.

各種トリカブトにおける含有成分の特性について (第 2 報)

中山秀幸, 三島英悟, 北川美穂, 沼澤聡明, 伊藤育子, 長岡由香, 佐田厚史.

第 54 回全国衛生化学技術協議会年会, 2017 年 11 月 21 日~22 日, 於奈良県奈良市

昨年度の本協議会において, オクトリカブト (山形県), ウゼントリカブト (山形県), 及びタンナトリカブト (佐賀県) の含有成分の特性について報告した. しかしながら, 前回の報告では, メタノール抽出液を前処理することなく TOF MS により定性分析を行ったため, 検出ピークがかなり多くなってしまい解析を複雑なものとした部分があった. そこで, 今回, 分画試験を実施してフラクションごとに TOF MS による定性分析を行った.

分画試験の結果, アコニチン類はメタノール濃度が 80 %, 90 %及び 100 %の分画に溶出していた. 山形市神尾の試料では 50~1,200 m/z の TIC クロマト, 250 nm ± 50 nm の UV クロマトともに, 他 2 試料と比較し観察されるピーク数が少なかった.

山形市神尾の試料にはアルカロイド成分の含有量が少ない, もしくは, 含有種類が少ないのではないかと考えられた. 落合らは, 福井県勝山及びその周辺地域にて採取したサンヨウブシには, Hypognavine を主成分とする品種が存在することを報告しており, 今回の結果と合わせて考えると興味深い. 山形市神尾のウゼントリカブトに Hypognavine や Ignavine 等のアルカロイドが含有されているかは今後の研究課題である.

自然毒一斉分析法の開発と食中毒への適用

大滝麻井子, 沼澤聡明, 笠原翔梧, 伊藤育子, 長岡由香, 佐田厚史.

第 32 回日本中毒学会東日本地方会, 2018 年 1 月 20 日, 於山形市

山形県では自然毒による中毒が毎年発生しており, 厚生労働省の食中毒統計によると, 本県における植物性自然毒(植物及びきのこ)による中毒発生数は全国で最も多い。本研究では, 中毒発生時の迅速な原因究明や中毒を未然に防ぐことを目的とし, 一度の測定で複数の毒成分を分析可能な自然毒一斉分析法の開発を行った。その結果, 有毒植物 5 種類 14 毒成分について一斉分析が可能となった。また, 開発した一斉分析法を用いて, 県内で発生したイヌサフランによる中毒の原因特定及びβ-グルコシダーゼの含有量に関する検討を行ったので報告した。

食中毒検体を想定した試料でのトリカブト鑑別法

太田康介, 大滝麻井子, 佐田厚史.

第 44 回山形県公衆衛生学会, 2018 年 3 月 8 日, 於山形市

トリカブト属植物(以下, トリカブト)による食中毒の発生件数(2000~2016 年)を都道府県別で比較すると, 山形県は全体の約 34%を占め全国最多であり, 過去には県内での死亡事例もある。食中毒の発生要因はトリカブトの若葉とニリンソウなど可食野草(山菜)の誤認が主である。今回, 我々は食中毒検体を想定した試料を作製し, PCR 法によるトリカブトと山菜の鑑別について検討した。その結果 4 種のトリカブトでは明瞭なバンドが目視確認できたが, 可食野草では確認できなかった。また, 食中毒が疑われる場合に当研究所に搬入される検体として, 油炒め及びお浸しが想定される。そこで, オクトリカブトの油炒め, お浸しを作製し, 同様に DNA の抽出, PCR を行った。その結果, いずれの試料においても明瞭なバンドが目視確認できた。

呈色反応によるツキヨタケの理化学的鑑別法

大河原龍馬, 篠原秀幸, 佐田厚史.

第 44 回山形県公衆衛生学会, 2018 年 3 月 8 日, 於山形市

山形県では毒キノコによる食中毒が近年増加しており, 平成 24~28 年の 5 年間で 38 件発生した。そのうちツキヨタケが原因となった事例が 27 件(71%)で最多であった。これは, ツキヨタケの形態が食用の

キノコ（ムキタケ、ヒラタケ、シイタケ）と似ていることから、誤って採取し喫食するためと考えられる。そこで、食中毒を未然に防止するため、採取現場で簡易・迅速かつ安全にツキヨタケを鑑別する手法を検討した。その結果、一般的な試薬により調製可能なビーム試薬を使用し、少量の検体及び試薬、簡易なエタノール抽出でツキヨタケと食用きのこを鑑別することができた。また、調理品として醤油汁、油炒めや塩漬けした場合であっても、ツキヨタケ試料では呈色が認められた。したがって、未調理検体だけでなく、調理検体にも適用可能な手法であることが分かった。

山形県に流通する農産物中の残留農薬検査結果（平成18年度～平成29年度）

篠原秀幸，萬年美穂子，佐藤陽子，沼澤聡明，大滝麻井子，石田恵崇，伊藤育子，佐田厚史。

第44回山形県公衆衛生学会，2018年3月8日，於山形市

当所では、県内に流通する農産物等の安全性確保を目的として、山形県食品衛生監視指導計画及び県内流通農産物等残留農薬検査事業実施要領に基づき残留農薬の検査を実施している。今回、ポジティブリスト制度が施行された平成18年度から平成29年度までの12年間における農産物の残留農薬検査の結果をまとめた。果実類のほうが野菜類よりも検出頻度が高いにもかかわらず、基準値を超過して検出される頻度は野菜類が高かった。しかし、検出される農薬のほとんどは基準値と比べ1/1000～1/10程度と低く、生産段階で農薬を適正に使用していることが推察された。また、全検体数に対する基準値超過検体の割合は低く、県内に流通している農産物における農薬残留レベルは十分に低いものと考えられた。