

# I 調查研究報告



## 短 報

## 調理加工を行ったツキヨタケ中の中毒成分イルジン S の残存量

大河原龍馬, 篠原秀幸, 佐田厚史

Residual amount of Illudin S in cooked or processed  
*Omphalotus guepiniiformis*

Ryuma OKAWARA, Hideyuki SHINOHARA and Atsushi SADA

ツキヨタケは中毒成分のイルジン S を含有しており、喫食すると 30 分～3 時間程度で嘔吐、下痢、腹痛等の症状を呈する。山形県では、平成 21～30 年に 38 件のツキヨタケ食中毒が発生しており、その中には毒キノコに関する言い伝えを信じたために発生した事例も報告されている。

毒消しに関する言い伝えの調理加工法を検証するため、これらに基づくツキヨタケの調理加工品を製作し、調理加工前後のイルジン S の濃度を比較した。その結果、いずれの調理法もイルジン S が残存し、十分な毒消し効果がないことが判明した。

Key Words : ツキヨタケ *Omphalotus guepiniiformis*, イルジン S Illudin S, 言い伝え Old tradition, 高速液体クロマトグラフ High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

## I はじめに

ホウライタケ科ツキヨタケ属ツキヨタケ (*Omphalotus guepiniiformis*) は、晩夏から秋にかけて主にブナの枯れ木に群生する毒キノコである。子実体には有毒成分イルジン S を含有し、喫食すると 30 分～3 時間程度で嘔吐、下痢、腹痛等の症状を呈する。

山形県では、平成 21～30 年に毒キノコによる食中毒は計 58 件発生した<sup>1)</sup>。このうち、ツキヨタケが原因となった事例が最も多く、38 件 (66 %) であった (図 1)。また、平成 24 年以降は 5 年連続してツキヨタケ食中毒の発生件数が全国で最多であった。

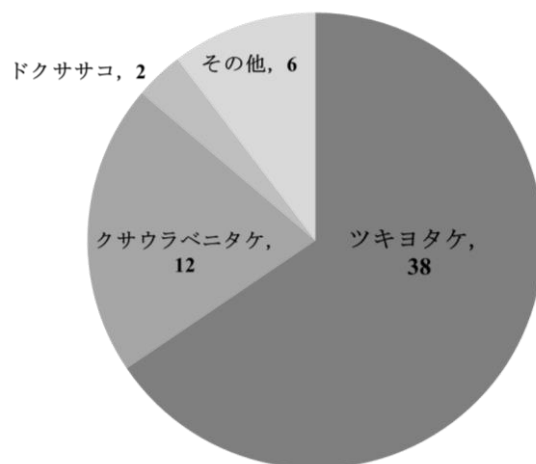


図 1 山形県における毒キノコ食中毒の発生件数内訳 (平成 21～30 年)

毒キノコについては古くから、「干して乾燥すれば食べられる」、「ナスと一緒に料理すれば食べられる」、「塩漬けすると毒が抜ける」等、毒消しを目的とした調理加工法が言い伝えられており<sup>2),3)</sup>、過去の毒キノコによる食中毒の中にはこれらの言い伝えを信じたために発生した事例も報告されている<sup>2)</sup>。

今回は、これらの言い伝えによる毒消しに関する調理加工方法を検証するため、ツキヨタケをモデル試料として、言い伝えに基づく調理加工品を作製し、調理加工前後におけるイルジン S 濃度を比較した。

## II 実験方法

### 1 試料

平成 28 年 9 月～10 月に山形県西川町内で採取したツキヨタケを用いた。

### 2 試薬および標準溶液

試薬：メタノールは関東化学製の高速液体クロマトグラフ用を使用した。オリーブ油はタツミ薬品工業製、醤油、ナス、食塩は食用の市販品を用いた。水は調理用を含め蒸留脱イオン水を用いた。固相カートリッジは Waters 社製 Oasis HLB 6 cc (500 mg) を用い、使用前にメタノール 5 mL、次いで水 5 mL によりコンディショニングを行った。

標準溶液：イルジン S 標準品は林純薬工業製を用いた。標準溶液はイルジン S を 5 mg 秤量し、5 mL のメタノールに溶解したものを適宜希釈した。

### 3 HPLC-UV の測定条件

装置：日本分光製 Galliver 1500 シリーズ、カラム：Inertsil ODS-3 (2.1×150 mm, 5 μm)、カラム温度：40 °C、注入量：10 μL、移動相：水-メタノール (8:2)、流速：0.7 mL/min、測定波長 235 nm

### 4 検量線および定量

イルジン S 標準溶液を 1, 5, 10, 20 μg/mL になるように調製し、HPLC-UV に注入した。得られたクロマトグラムからピーク面積を求め、絶対検量線法により検量線を作成した。試料中のイルジン S は、試験溶液を HPLC-UV に注入し、得られたクロマト

グラムのピーク面積から検量線を用いて定量した。試験溶液は必要に応じて適宜希釈した。

### 5 添加回収試験

イルジン S 濃度が既知 (56.4 μg/g) のツキヨタケ 5.0 g にイルジン S 標準溶液 100 μg/mL を 0.3 mL 添加後、試験溶液を調製した。回収率は添加試料のイルジン S 濃度から元々含まれていたイルジン S 濃度を差引き算出した。

### 6 調理加工品の調製

乾燥処理、醤油汁および油炒め試験に用いるツキヨタケは、あらかじめ柄に沿って中央で縦に 2 分割し、片方を対照試料 (未調理品)、残りの片方を調理加工品とした。塩漬け試験は、ツキヨタケを分割せずに試験に用いた。

調理加工品は以下のとおり調製した。

#### 1) 乾燥処理試料

乾燥方法は、屋内での定温乾燥器 (ヤマト科学製 DX300, 温度 55 °C) を用いた方法、および屋外での天日乾燥法 (平均温度 35 °C) とした。天日乾燥は屋上 (地上 20 m) にて円筒形のネット (形状：直径 200 mm × 高さ 200 mm) にツキヨタケを入れて直射日光下で行った。

それぞれの乾燥時間は、予備実験により子実体重量が恒量 (重量減少率約 85 %) になる時間を確認し、定温乾燥器を用いた方法では 6 時間、天日乾燥法では 7 時間とした。乾燥品はミルサー (岩谷産業製 IFM-800DG) で粉碎し、乾燥処理により減少した重量と等量の水を添加し 1 時間水戻しを行い試料とした (図 2)。

#### 2) 醤油汁試料

ツキヨタケおよび同重量のナスを 10 % 醤油水溶液 200 mL 中で 10 分間煮沸させた後、ツキヨタケおよびナスを取り出し表面をペーパータオルで軽く拭き取り試料とした。また、ツキヨタケおよびナスを取り出した後の煮汁も試料とした (図 3)。

#### 3) 油炒め試料

ツキヨタケおよび同重量のナスを 10 mL のオリ

ープ油とともにホットプレート（東芝製 HGM-3SD）で 200℃、5 分間加熱後、ツキヨタケとナスの表面の油をペーパータオルで軽く拭き取り試料とした（図 4）。

4) 塩漬け試料

ビーカー内でツキヨタケ 1.5 kg と食塩 3.0 kg を混合して 20℃で保存した。塩漬け期間は 1 週間、3 週間、3 ヶ月、6 ヶ月とした。それぞれの塩漬け期間経過時点で順次ツキヨタケおよび塩を取り出し、それぞれを試料とした（図 5）。

7 試験溶液の調製

1) 未調製品および調理加工品（ツキヨタケ、ナスおよび塩）

食品衛生検査指針理化学編 2015 に準じた（図 6）。

2) 煮汁

煮汁 2 mL にメタノール 20 mL を加え、ろ過した。ろ液を減圧乾固後、前項と同様に操作した（図 6）。

8 イルジン S の安定性試験

1) 光照射

イルジン S 標準溶液（1000 µg/mL）0.1 mL を三角フラスコに入れ、窒素気流下で乾固した後、可視光線および紫外線を照射した（n = 3）。可視光線の照射には昼光色の蛍光灯（東芝製、FL40SSEX-N/37-H）を用いて、照射距離は 1 m とした。紫外線の照射には UV ランプ（アズワン製、SLUV-6、波長 254 nm および 365 nm）を用いて、照射距離は 10 cm とした。それぞれ 1 時間照射した後、メタノール 1.0 mL に溶解し、HPLC-UV で測定した。なお、いずれの試験も室温で実施し、光照射により温度上昇がないことを事前に確認した。また、蛍光灯由来の紫外線は可視光線と比較して極微小であり無視できると判断した。

2) 加熱

イルジン S 標準溶液（1000 µg/mL）0.1 mL を三角フラスコに入れ、窒素気流下で乾固後、ホットプレートで 200℃、5 分間加熱した。放冷後、メタノール 1.0 mL に溶解し、HPLC-UV で測定した。

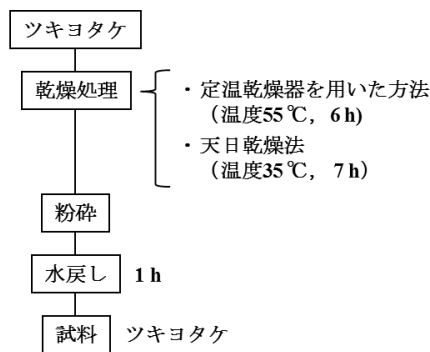


図 2 乾燥処理試料の作成

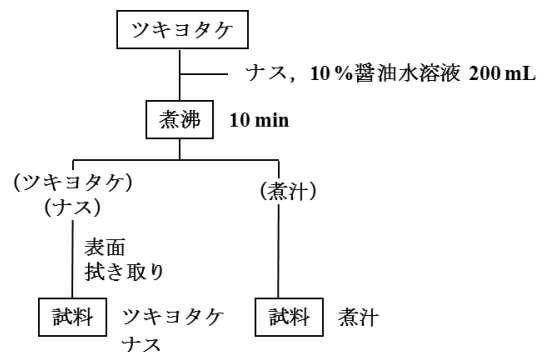


図 3 醤油汁試料の作成

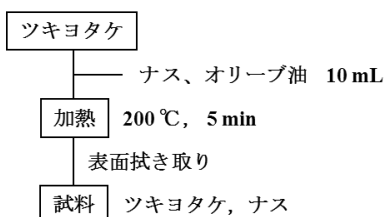


図 4 油炒め試料の作成

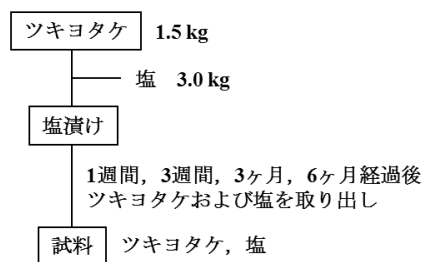


図 5 塩漬け試料の作成

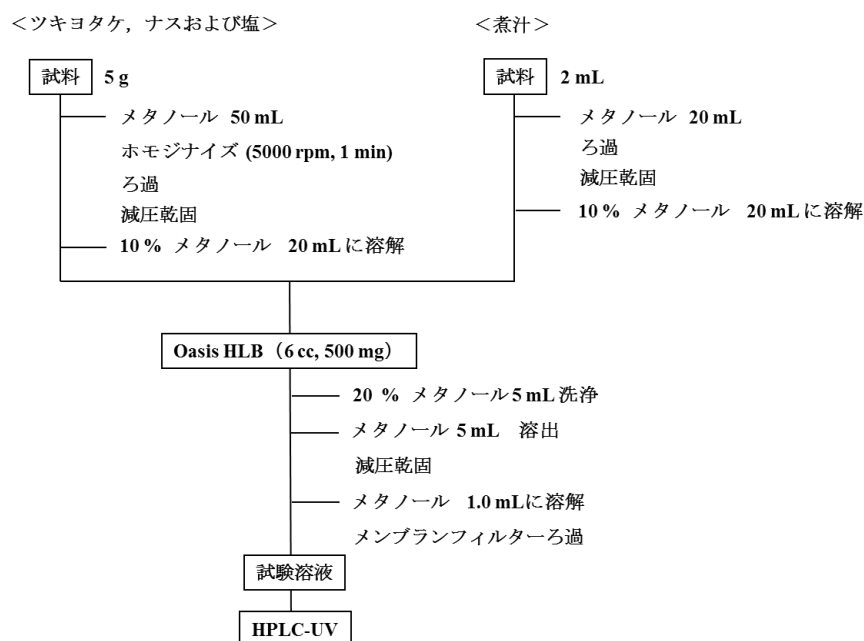


図 6 試験溶液の調製

### Ⅲ 結果および考察

#### 1 検量線

イルジン S のピーク面積から絶対検量線法で検量線を作成したところ、1~20 µg/mL の濃度範囲で決定係数  $r^2 \geq 0.999$  の良好な直線性を示した。

#### 2 添加回収試験

ツキヨタケにイルジン S 標準溶液を添加し、回収率を算出したところ、99 %であった。また、妨害ピークがなく良好な結果が得られた。

#### 3 ツキヨタケの調理加工品中のイルジン S 残存量

##### 1) 乾燥処理

乾燥処理を行ったツキヨタケ中のイルジン S の濃度変化を表 1 に示した。定温乾燥器を用いた方法では、イルジン S はほとんど減少しなかった（平均残存率 93 %）。一方、天日乾燥法では乾燥温度が比較的低い（35 °C）にも関わらずイルジン S の平均残存率は 59 %であった。

この原因として太陽光照射によるイルジン S の分解が考えられたため、イルジン S 標準品を用いて光照射に対する安定性を確認した。その結果、遮光下で保管した場合の残存率を 100 %とすると、可

視光線照射ではイルジン S の残存率は  $(101 \pm 2)$  % で、減少は認められなかった。一方で、254 nm の紫外線照射では残存率は  $(65 \pm 7)$  %、365 nm では  $(48 \pm 5)$  %であった。このことから、紫外線照射がイルジン S の分解に寄与することがわかった。

紫外線は食品表面の殺菌に利用されることがあるが、透過性が低く内部には到達しない<sup>4)</sup>。このことから、天日乾燥ではツキヨタケ表面に存在するイルジン S が紫外線により分解したが、内部のイルジン S は分解せず残存したと推察される。

##### 2) 醤油汁

未調理ツキヨタケに対する醤油汁試料全体のイルジン S の平均残存率は 63 %であった（表 2）。各試料に含まれるイルジン S の平均分布率はツキヨタケ 45 %、煮汁 53 %、ナス 1 %で、ツキヨタケから流出したイルジン S が煮汁中にも調理済みツキヨタケと同程度残存した（図 7）。笠原らは、キノコ汁を想定した調理モデル実験により、イルジン S は煮汁へ移行すること、ならびに 10 分間の沸騰加熱では大幅に分解しないことを報告している<sup>5)</sup>。本実験結果はこの知見を支持するものであり、ツキヨ

**表1 乾燥処理によるイルジンS濃度変化**

乾燥方法	試料 No.	イルジンS濃度 (μg/g)		残存率 (%) <sup>a)</sup>	平均残存率 (%)
		未調理品	調理加工品		
定温乾燥器を用いた方法	1	16.5	11.9	72	93
	2	30.1	31.1	103	
	3	265	278	105	
天日乾燥法	1	78.4	26.0	33	59
	2	87.4	67.5	77	
	3	223	151	68	

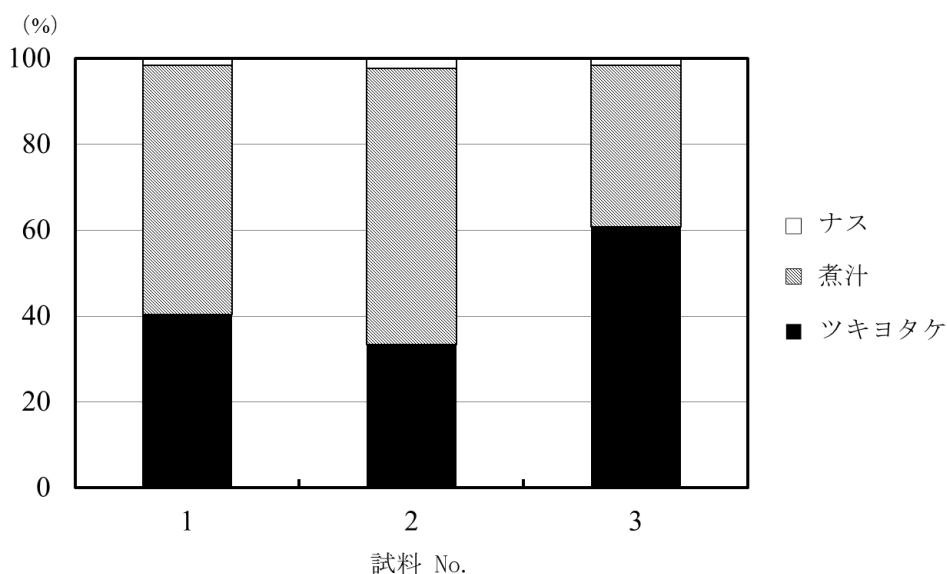
a) 調理加工品のイルジンS濃度 / 未調理品のイルジンS濃度 \*100

**表2 醤油汁試料のイルジンS含有量**

試料 No.	イルジンS含有量 (mg)		残存率 (%) <sup>a)</sup>
	未調理品	調理加工品	
1	1.36	1.14	83
2	1.16	0.443	38
3	1.72	1.17	68
平均 <sup>b)</sup>	1.41 ± 0.28	0.918 ± 0.34	63

a) 調理加工品中のイルジンS量 / 未調理品中のイルジンS量 \*100

b) 平均値 ± 標準偏差(n = 3)



**図7 醤油汁試料のイルジンS分布割合**

タケのみならず、煮汁の摂取で中毒を起こす可能性がある。また、ナスとの調理によるイルジン S の大幅な減少は認められなかった。

### 3) 油炒め

油炒め調理したツキヨタケおよびナス中のイルジン S 濃度を表 3 に示した。未調理ツキヨタケに対する油炒め試料全体のイルジン S の平均残存率は 91 % で、内訳はツキヨタケ 90 %、ナス 1 % だった。

本調理におけるイルジン S の減少は加熱による分解と推測し、イルジン S 標準品を用いて熱安定性を確認したところ、加熱後の残存率は (35 ± 19) % であった。

これらの結果から、本調理におけるイルジン S の分解は加熱が主要因であり、ナスの影響はほぼ無視できると推測される。ツキヨタケは水分を多く含むため、内部は十分に温度が上昇せず、イルジン S

の分解が抑制された可能性がある。したがって、大きいツキヨタケほど加熱調理しても中毒を起こす危険性があると考えられる。

### 4) 塩漬け処理

塩漬けによるツキヨタケ中のイルジン S 濃度を表 4 に示した。民間に言い伝えられる調理法では調理に供する前に水にさらして塩抜きを行うことから、筆者らの以前の調査では塩抜きした試料に含まれるイルジン S 濃度を算出している<sup>6)</sup>。本報では塩漬けのみの毒消し効果を検証するため、塩抜きを行わなかった。

未処理のツキヨタケ中のイルジン S 濃度を 100 % とすると、1 週間で 61 %、3 週間で 37 %、3 ヶ月で 24 %、6 ヶ月では 9 % となり、塩漬け期間が長いほど残存率が低くなる傾向を示した。さらに、塩漬け

**表 3 油炒めによるイルジン S 濃度変化**

試料 No.	イルジン S 濃度 (µg/g)				
	未調理品	調理加工品			
		ツキヨタケ	残存率 (%) <sup>a)</sup>	ナス	移行率 (%) <sup>b)</sup>
1	158	151	96	2.23	4
2	99.1	94.3	95	1.40	1
3	87.9	63.7	72	1.03	3
平均 <sup>c)</sup>	115 ± 31	103 ± 36	90	1.55 ± 0.50	1

a) 調理加工品のツキヨタケ中のイルジン S 濃度 / 未調理品のツキヨタケ中のイルジン S 濃度 \* 100

b) 調理加工品のナス中のイルジン S 濃度 / 未調理品のツキヨタケ中のイルジン S 濃度 \* 100

c) 平均値 ± 標準偏差 (n = 3)

**表 4 塩漬けによるツキヨタケ中のイルジン S 濃度変化**

塩漬け期間	イルジン S 濃度 (µg/g) <sup>a)</sup>	残存率 (%) <sup>b)</sup>
未調理品	244	100
1 週間	149	61
3 週間	91.2	37
3 ヶ月	58.6	24
6 ヶ月	23.0	9

a) 平均値 (n = 3) ; 1 個体 1 試料として 3 試料測定

b) 各塩漬け期間におけるイルジン S 濃度 / 未調理品のイルジン S 濃度 \* 100



期間に応じてイルジン S 濃度の 3 個体間の差（変動係数）が小さくなった（変動係数：1 週間 21 %，3 週間 9 %，3 ヶ月 7 %，6 ヶ月 5 %）。

これらの結果から，ツキヨタケ中のイルジン S は塩漬けにより減少する可能性が示唆された。塩からイルジン S が検出されたことから，高塩濃度によりツキヨタケから水分とともにイルジン S が流出したと考えられる（データ示さず）。

そのため，容器内に高濃度のイルジン S を含有したツキヨタケがあれば，容器全体にイルジン S が拡散し，中毒の危険性を高める可能性がある。

#### 4 調理加工品における中毒量の推定

各調理加工でイルジン S の残存率が最少となった塩漬け（6 ヶ月間）について，これを喫食した場合の中毒量を推定した。和田らの以前の調査ではツキヨタケ中のイルジン S 濃度は 8.3~776.2  $\mu\text{g/g}$  と大きな個体差があった<sup>7)</sup>。そこで，その中央値を算出し，ツキヨタケ中のイルジン S 濃度を仮定した。ツキヨタケによる中毒症状はイルジン S として 1 mg 以上の摂取で発現すると推定されている<sup>5)</sup>。塩漬け（6 ヶ月間）による残存率を 9 %とすると，中毒量はツキヨタケ中のイルジン S 濃度 300  $\mu\text{g/g}$  としてツキヨタケ約 40 g（1~2 個）に相当する。加えて，今回の試験結果からイルジン S は他の食材や煮汁に容易に流出するため，ツキヨタケ自体を食さずとも中毒する危険性がある。

## IV まとめ

ツキヨタケをモデル試料として，毒消しに関する言い伝えの調理加工法を検証した。これらの調理加

工法は有毒成分イルジン S を一定量減少させる場合もあるが，完全に消失させることはなかった。よって，ツキヨタケを言い伝えに基づいて調理加工しても中毒の危険性は避けられず，いかなる場合でも喫食すべきではない。

## V 文献

- 1) 厚生労働省：食中毒に関する情報，4 食中毒統計資料  
([https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou\\_iryuu/shokuhin/syokuchu/04.html](https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/shokuhin/syokuchu/04.html))  
(アクセス日，2019 年 6 月 24 日)
- 2) 登田美桜，畝山智香子，豊福肇，他：わが国における自然毒による食中毒事例の傾向（平成元年～22 年），食品衛生学雑誌 53, 105-120, 2012
- 3) 笠原義正，伊藤健：健康と食べ物の言い伝えに関するアンケート調査，山形県衛生研究所報，39, 25-33, 2006
- 4) 吉川修司，土井義明，井上貞仁，他：紫外線強化型光パルスの食品殺菌の応用，北海道食品加工研究センター報告 6, 23-30, 2006
- 5) 笠原義正，伊藤健：LC-MS/MS によるツキヨタケおよび食中毒原因食品中の illudin S の分析，食品衛生学雑誌 50, 167-172, 2009
- 6) 大河原龍馬，和田章伸，笠原義正：ツキヨタケの中毒成分 illudin S の含有量および塩蔵による消長，山形県衛生研究所報 48, 20-23, 2015
- 7) 和田章伸，笠原義正：ツキヨタケの中毒成分 illudin S の LC-MS/MS による分析，山形県衛生研究所報 43, 1-5, 2010

## 短 報

## 山形県における感染症媒介蚊の生息状況調査(2016-18年)

小川直美, 山田浩貴, 小松秀一, 新藤道人, 酒井真紀子, 伊藤真由美, 長岡由香

## Survey of infection vector mosquitoes in Yamagata prefecture (2016-18)

Naomi OGAWA, Hiroki YAMADA, Shuichi KOMATSU, Michito SHINDO, Makiko SAKAI,  
Mayumi ITO and Yuka NAGAOKA

山形県内の10地点において、2016-18年の3年間、ドライアイス併用ライトトラップ法による蚊の生息状況調査を行い、10種の蚊の生息が確認された。種別構成は周辺環境により相違があり、感染症媒介蚊として重要なヒトスジシマカは、住宅地や市街地などで多い傾向がみられた。また、本調査で多く捕集されたアカイエカ群とヒトスジシマカの捕集数は気温と相関関係がみられ、ヒトスジシマカの捕集数については、気温が高い時期では降水量と強い相関関係がみられた。

Key Words : 感染症媒介蚊, アカイエカ群, ヒトスジシマカ, 山形県

## I はじめに

デング熱, チクングニア熱, ジカウイルス感染症等の蚊媒介感染症が、熱帯, 亜熱帯を中心とする各国で流行している。日本国内でも、毎年数百人の蚊媒介感染症患者が報告されており、そのほとんどが海外で感染し、国内で発症した輸入症例である。国内感染事例としては、2014年に東京都を中心とするデング熱の流行が発生し、153人の患者が報告された。海外でウイルスに感染した人が、公園などに生息している蚊に刺され、その蚊が再び他の人を刺すことによって感染が拡大したと考えられる。

山形県では、近年、台湾などのデング熱流行地域を含む、海外からの旅行者が急増しており、県内で蚊媒介感染症が発生するリスクも高まっているといえる。今回筆者らは、山形県内の蚊の生息状況について調査し、得られた知見について報告する。

## II 方法

### 1. 捕集方法

1 調査地点につき、1台の電池式ライトトラップ

(有限会社 猪口鉄工所製)を設置した。蚊の誘引源として、ドライアイス2kgをクーラーバッグに入れて、ライトトラップの上方に吊るした。トラップの設置場所は、なるべく木陰や建物の陰で風当たらないような場所とし、立木やフェンスに固定するか、自立式ランタンスタンドを用いて、地上から1.2mの位置に固定した。午前中から翌日の午前中まで、およそ24時間捕集を行った。

### 2. 調査地点

調査地点は、村山地区5地点、庄内地区5地点とした。住宅街、水田地帯等様々な立地条件にある施設(公園、学校、公舎など)で調査を行った。村山地区の調査地は比較的周囲に住居などの建物が多い場所が多く、庄内地区の調査地は水田地帯など郊外が多いという特徴がある。

### 3. 蚊の種類の鑑別方法

トラップを用いて捕集した蚊は、トラップの網に入ったまま回収し、ビニール袋に入れて保冷した状態で搬送した。-50℃の冷凍庫で24時間殺処理した

後に、顕微鏡(株式会社ハイロックス製)を用いて形態学的に種を同定した。蚊の分類体系と種名は津田<sup>1)</sup>に従った。なお、アカイエカとチカイエカは形態的に酷似しているため、アカイエカ群とした。

Ⅲ 結果および考察

地区年別の捕集数を表 1 に示した。この調査により、山形県内で 10 種の蚊の生息が確認され、最も多く捕集されたのは両地区ともにアカイエカ群であり、次いでヒトスジシマカが多く捕集された。コガタアカイエカは庄内地区で多く捕集された。

表 1 地区年別捕集数

	村山地区			庄内地区		
	2016年	2017年	2018年	2016年	2017年	2018年
アカイエカ群	75	34	68	392	147	203
ヒトスジシマカ	63	55	40	31	29	9
ヤマトヤブカ	23	5	6	2	3	0
ハマダライエカ	24	8	1	35	10	2
コガタアカイエカ	7	2	0	215	24	83
カラツイエカ	2	0	3	8	0	0
シナハマダラカ	2	0	0	0	0	0
オオクロヤブカ	3	2	0	1	0	0
ヤマトクロホシヒゲカ	1	0	0	0	0	0
キンイロヤブカ	0	0	0	0	6	0
種別不明	3	8	0	3	0	1
合計	203	114	118	687	219	298

住宅地や市街地にある調査地点が多かった村山地区は、アカイエカ群とヒトスジシマカがともに約 4 割を占め、水田地帯など、郊外にある調査地点が多かった庄内地区はアカイエカ群が 6 割、コガタアカイエカが 3 割と、地区によって種別構成に相違がみられた (図 1)。

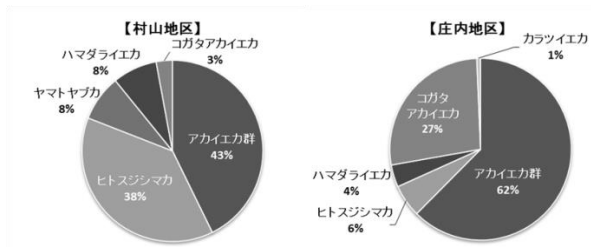


図 1 種別構成

アカイエカ群は 6 月から捕集されはじめ、捕集数

のピークは 7 月から 8 月であり、10 月にはほぼ捕集されなくなった。ヒトスジシマカの捕集数のピークは村山地区で 7 月から 8 月、庄内地区で 8 月から 9 月であった (図 2)。

この調査で得られたデータをもとに、山形県で多く生息する感染症媒介蚊である、アカイエカ群、ヒトスジシマカについて、生息密度に影響を与える要因を検討した。

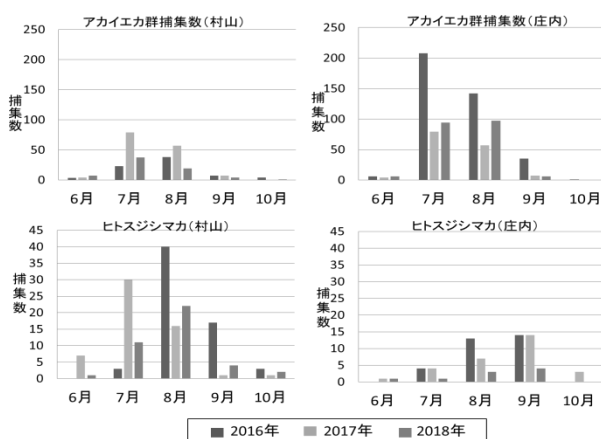


図 2 月別捕集数(アカイエカ群, ヒトスジシマカ)

アカイエカ群の捕集数と、様々な気象データとの相関関係を調査したところ、月平均気温と相関関係があることが分かった。相関分析による相関係数は、村山 0.77(p<0.05), 庄内 0.72(p<0.05)と、強い相関を示した (図 3)。

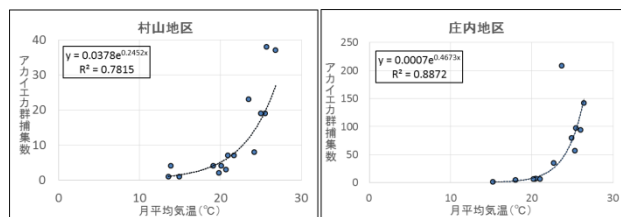


図 3 アカイエカ群捕集数と月平均気温

ヒトスジシマカについては、庄内地区は捕集数が少なかったため、捕集数の多かった村山地区のデータについて分析した。ヒトスジシマカの捕集数は、相関分析により、月平均気温との相関係数が 0.66(p<0.05)と、相関を示した。また、平均気温 25℃

以上の時間数（月積算）との相関係数は、0.71(p<0.05)と、強い相関がみられ、気温が高い時間が長いほど捕集数が多くなった（図4）。

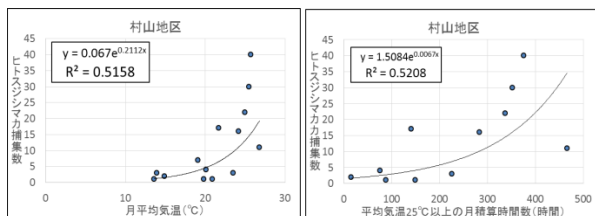


図4 ヒトスジシマカ捕集数と月平均気温および平均気温25℃以上の月積算時間数

2018年の7月は、3年間の調査期間の中で最も平均気温が高かったが、ヒトスジシマカの捕集数が他の25℃以上となった月に比べて大幅に少なかったため、その要因について検討した。様々な気象データや環境要因について検討したところ、2018年7月は、月間総降水量が、他の平均気温25℃以上であった月に比べて極端に少なかった（表2）。

①ヒトスジシマカ捕集数				②月平均気温(°C)			
	2016年	2017年	2018年		2016年	2017年	2018年
6月	0	7	1	6月	20.7	19.1	20.9
7月	3	30	11	7月	23.5	25.5	26.8
8月	40	16	22	8月	25.7	24.2	25.0
9月	17	1	4	9月	21.7	19.8	20.1
10月	3	1	2	10月	13.9	13.6	14.9

③月間総降水量(mm)			
	2016年	2017年	2018年
6月	98.0	49.0	42.5
7月	167.0	358.0	52.0
8月	321.5	174.5	281.0
9月	145.5	95.5	173.5
10月	44.5	188.0	36.5

表2 ヒトスジシマカ捕集数と月別気象データ

そこで、月平均気温が20℃以上であった月について、月間総降水量と捕集数の相関分析を行ったところ、相関係数は0.82(p<0.05)と、強い正の相関を示した（図5）。この結果から、ヒトスジシマカの捕集数は、気温が高く、降水量が多い環境下で捕集数が多くなることが分かった。これは、降水量が多い場合、屋外にある鉢皿や空き缶などの小容器に水が溜まり、ヒトスジシマカの繁殖場所が増えることによると考えられる。したがって、ヒトスジシマカの対策上、

小さな水たまりをなくすことが非常に有効であるといえる。

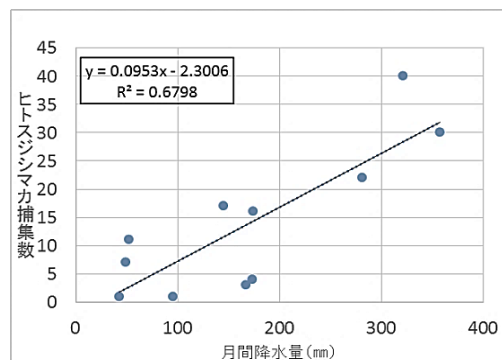


図5 ヒトスジシマカ捕集数と月間総降水量

#### IV 文献

- 1) 津田良夫：蚊の観察と生態調査, SCIENCE WATCH, 北隆館, 東京(2013), 口絵 I~XX

## 抄 録

## 1) 他誌掲載論文

**A case of laboratory cross-contamination of *Mycobacterium tuberculosis* identified by comparative genomics**

Seto J, Wada T, Suzuki Y, Ikeda T, Araki K, Umetsu Y, Ishikawa H, Mizuta K, Ahiko T

Int J Tuberc Lung Dis. 2018;22:1239-1242.

**BACKGROUND:** Two false-positive tuberculosis (TB) cases in Yamagata Prefecture, Japan, 2016.

**OBJECTIVE:** To report the effectiveness of comparative genomics of *Mycobacterium tuberculosis* for identification of cross-contamination cases.

**DESIGN:** Case report of laboratory cross-contamination.

**RESULTS:** Beginning with detection of an identical genotype in two *M. tuberculosis* strains using variable number of tandem repeat typing, we suspected *M. tuberculosis* cross-contamination of specimens collected in a mycobacteriology laboratory based on epidemiological investigations. This suspicion was confirmed using comparative genomics of the two *M. tuberculosis* strains and a strain from an epidemiologically unrelated specimen from the same batch as the two strains in the mycobacteriology laboratory. All strains had an identical genomic sequence with no single nucleotide variants.

**CONCLUSION:** Comparative genomics, which offers the highest discrimination power, is a potent tool for identifying laboratory cross-contamination using epidemiological investigations.

**VP1 amino acid residue 145 of enterovirus 71 is a key residue for its receptor attachment and resistance to neutralizing antibody during cynomolgus monkey infection**

Fujii K, Sudaka Y, Takashino A, Kobayashi K, Kataoka C, Suzuki T, Iwata-Yoshikawa N, Kotani O, Ami Y, Shimizu H, Nagata N, Mizuta K, Matsuzaki Y, Koike S

J Virol. 2018;92:e00682-18.

Enterovirus 71 (EV71) is a causative agent of hand, foot, and mouth disease and sometimes causes severe or fatal neurological complications. The amino acid at VP1-145 determines the virological characteristics of EV71. Viruses with glutamic acid (E) at VP1-145 (VP1-145E) are virulent in neonatal mice and transgenic mice expressing human

scavenger receptor B2, whereas those with glutamine (Q) or glycine (G) are not. However, the contribution of this variation to pathogenesis in humans is not fully understood. We compared the virulence of VP1-145E and VP1-145G viruses of Isehara and C7/Osaka backgrounds in cynomolgus monkeys. VP1-145E, but not VP1-145G, viruses induced neurological symptoms. VP1-145E viruses were frequently detected in the tissues of infected monkeys. VP1-145G viruses were detected less frequently and disappeared quickly. Instead, mutants that had a G-to-E mutation at VP1-145 emerged, suggesting that VP1-145E viruses have a replication advantage in the monkeys. This is consistent with our hypothesis proposed in the accompanying paper (K. Kobayashi, Y. Sudaka, A. Takashino, A. Imura, K. Fujii, and S. Koike, *J Virol* 92:e00681-18, 2018, <https://doi.org/10.1128/JVI.00681-18>) that the VP1-145G virus is attenuated due to its adsorption by heparan sulfate. Monkeys infected with both viruses produced neutralizing antibodies before the onset of the disease. Interestingly, VP1-145E viruses were more resistant to neutralizing antibodies than VP1-145G viruses in vitro. A small amount of neutralizing antibody raised in the early phase of infection may not be sufficient to block the dissemination of VP1-145E viruses. The different resistance of the VP1-145 variants to neutralizing antibodies may be one of the reasons for the difference in virulence. **IMPORTANCE** The contribution of VP1-145 variants in humans is not fully understood. In some studies, VP1-145G/Q viruses were isolated more frequently from severely affected patients than from mildly affected patients, suggesting that VP1-145G/Q viruses are more virulent. In the accompanying paper (K. Kobayashi, Y. Sudaka, A. Takashino, A. Imura, K. Fujii, and S. Koike, *J Virol* 92:e00681-18, 2018, <https://doi.org/10.1128/JVI.00681-18>), we showed that VP1-145E viruses are more virulent than VP1-145G viruses in human SCARB2 transgenic mice. Heparan sulfate acts as a decoy to specifically trap the VP1-145G viruses and leads to abortive infection. Here, we demonstrated that VP1-145G was attenuated in cynomolgus monkeys, suggesting that this hypothesis is also true in a nonhuman primate model. VP1-145E viruses, but not VP1-145G viruses, were highly resistant to neutralizing antibodies. We propose the difference in resistance against neutralizing antibodies as another mechanism of EV71 virulence. In summary, VP1-145 contributes to virulence determination by controlling attachment receptor usage and antibody sensitivity.

## **The largest measles outbreak, including 38 modified measles and 22 typical measles cases in its elimination era in Yamagata, Japan, 2017**

Komabayashi K, Seto J, Tanaka S, Suzuki Y, Ikeda T, Onuki N, Yamada K, Ahiko T,  
Ishikawa H, Mizuta K

*Jpn J Infect Dis.* 2018;71:413-418.

The incidence of modified measles (M-Me), characterized by milder symptoms than those of typical measles (T-Me), has been increasing in Japan. However, the outbreak dominated by M-Me cases has not been thoroughly investigated worldwide. The largest importation-related outbreak of measles with genotype D8 occurred in

Yamagata Prefecture, Japan, from March to April 2017. This phenomenon was observed after Japan had achieved measles elimination in 2015. We confirmed 60 cases by detecting the genome of the measles virus (MeV). Among the cases, 38 were M-Me and 22 were T-Me. Thirty-nine (65.0%) patients were 20-39 years of age. Three out of 7 primary cases produced 50 transmissions, of which each patient caused 9-25 transmissions. These patients were 22-31 years old and were not vaccinated. Moreover, they developed T-Me and kept contact with the public during their symptomatic periods. Considering that M-Me is generally caused by vaccine failure, some individuals in Japan may have insufficient immunity for MeV. Accordingly, additional doses of measles vaccine may be necessary in preventing measles importation and endemicity among individuals aged 20-39 years. Furthermore, to accurately and promptly diagnose individuals with measles, particularly those who can be considered as primary cases, efforts must be exerted to detect all measles cases using epidemiological and genetic approaches in countries where measles elimination had been achieved.

### **Detection of modified measles and super-spreader using a real-time reverse transcription PCR in the largest measles outbreak, Yamagata, Japan, 2017 in its elimination era**

Seto J, Ikeda T, Tanaka S, Komabayashi K, Matoba Y, Suzuki Y, Takeuchi S, Yamauchi T, Mizuta K

Epidemiol Infect. 2018;146:1707-1713.

We aimed to verify the effectiveness of real-time reverse transcription (rRT) polymerase chain reaction (PCR) for detecting cases of modified measles (M-Me) and for predicting super-spreader candidates through the experience of a measles outbreak dominated by M-Me in Yamagata, Japan, during March-April 2017. We applied rRT-PCR to specimens from 35 cases of M-Me, nine cases of typical measles (T-Me) and nine cases of prodromal stage of T-Me (P-Me). From rRT-PCR among the M-Me cases, peripheral blood mononuclear cells (PBMC) showed the highest positive rate (80.0%), followed by throat swab (48.6%), urine (33.3%) and serum (3.1%). The negative result of PBMC in M-Me cases was recovered by the result of a throat swab. In specimens of PBMC, throat swab and urine, M-Me group showed the significantly higher cycle of threshold (i.e., lower viral load) in the rRT-PCR than T-Me and P-Me groups, respectively. Furthermore, three super-spreaders in T-Me or P-Me showed an extremely low cycle of threshold in their throat swab specimens. rRT-PCR using PBMC and throat swab might be helpful for clinical management and measles control by certain detection of M-Me cases and by predicting super-spreading events resulting from measles cases with the high viral load.

## **Neutralizing epitopes and residues mediating the potential antigenic drift of the hemagglutinin-esterase protein of influenza C virus**

Matsuzaki Y, Sugawara K, Furuse Y, Shimotai Y, Hongo S, Mizuta K, Nishimura H

Viruses. 2018;10:417.

We mapped the hemagglutinin-esterase (HE) antigenic epitopes of the influenza C virus on the three-dimensional (3D) structure of the HE glycoprotein using 246 escape mutants that were selected by a panel of nine anti-HE monoclonal antibodies (MAbs), including seven of the C/Ann Arbor/1/50 virus and two of the C/Yamagata/15/2004 virus. The frequency of variant selection in the presence of anti-HE MAbs was very low, with frequencies ranging from 10<sup>-4.62</sup> to 10<sup>-7.58</sup> for the C/Ann Arbor/1/50 virus and from 10<sup>-7.11</sup> to 10<sup>-9.25</sup> for the C/Yamagata/15/2004 virus. Sequencing of mutant HE genes revealed 25 amino acid substitutions at 16 positions in three antigenic sites: A-1, A-2, and A-3, and a newly designated Y-1 site. In the 3D structure, the A-1 site was widely located around the receptor-binding site, the A-2 site was near the receptor-destroying enzyme site, and the Y-1 site was located in the loop on the topside of HE. The hemagglutination inhibition reactions of the MAbs with influenza C viruses, circulating between 1947 and 2016, were consistent with the antigenic-site amino acid changes. We also found some amino acid variations in the antigenic site of recently circulating strains with antigenic changes, suggesting that viruses that have the potential to alter antigenicity continue to circulate in humans.

## **Careful clinical surveillance is important for the identification of parechovirus type A3-associated myalgia/myositis: a sporadic case found in a season with a low level of its activity in Yamagata, Japan in 2017**

Tanaka S, Sendo D, Ichikawa M, Toyota K, Furuyama M, Komabayashi K, Ikeda T, Mizuta K

Jpn J Infect Dis. 2019;72:71-72.

抄録なし

## **Parechovirus A3 (PeVA-3)-associated myalgia/myositis occurs irrespective of its genetic cluster; a longitudinal molecular epidemiology of PeV-A3 in Yamagata, Japan between 2003 and 2016**

Mizuta K, Aoki Y, Komabayashi K, Tanaka S, Yamakawa T, Shimizu Y, Itagaki T, Katsushima F, Katsushima Y, Ikeda T



J Med Microbiol. 2019;68:424-428.

No longitudinal molecular epidemiology of parechovirus A3 (PeV-A3) over a decade is available and PeV-A3-associated myalgia/myositis has been reported only in Japan. Thus, we aimed to clarify the longitudinal molecular epidemiology of PeV-A3 with a major focus on the strains detected from PeV-A3-associated myalgia/myositis cases. We performed sequence and phylogenetic analysis for the VP1 region of PeV-A3 strains in Yamagata, Japan, between 2003 and 2016. The phylogenetic analysis indicated that PeV-A3 strains caused PeV-A3-associated myalgia/myositis as well as a variety of infectious diseases, ranging from mild to severe, in subjects ranging from neonates to adults, irrespective of genetic cluster or variations. PeV-A3 strains are causative agents of a variety of human diseases, irrespective of their genetic cluster. Furthermore, we consider that PeV-A3-associated myalgia/myositis may occur, not only in Japan, but also in other countries, as closely related PeV-A3 strains have been circulating around the world.

### **Phylogenetic and antigenic analyses of coxsackievirus A6 isolates in Yamagata, Japan between 2001 and 2017**

Mizuta K, Tanaka S, Komabayashi K, Aoki Y, Itagaki T, Katsushima F, Katsushima Y, Yoshida H, Ito S, Matsuzaki Y, Ikeda T

Vaccine. 2019;37:1109-1117.

Although coxsackievirus A6 (CV-A6) is generally recognized as a causative agent of herpangina in children, CV-A6 infections globally emerged as a new and major cause of epidemic hand-foot-and-mouth-diseases (HFMDs) around 2008. To clarify the longitudinal epidemiology of CV-A6, we carried out sequence and phylogenetic analyses for the VP1 and partially for the VP4-3D regions as well as antigenic analysis using 115 CV-A6 isolates and 105 human sera in Yamagata, Japan between 2001 and 2017. Phylogenetic analysis revealed that CV-A6 isolates were clearly divided into two clusters; strains in circulation between 2001 and 2008 and those between 2010 and 2017. Neutralizing antibody titers of two rabbit antisera, which were immunized with Yamagata isolates in 2001 and 2015, respectively, against 28 Yamagata representative strains as well as the prototype Gdula strain were 1:2560-1:5120 and 1:160-1:640, respectively. The neutralizing antibody titers among residents in Yamagata against the above two strains were similar. Our analyses revealed that there were cross-antigenicities among all analyzed CV-A6 strains, although the newly emerged strains were introduced into Yamagata around 2010 and replaced the previous ones. With regard to control measures, these findings suggest that we can prevent CV-A6 infections through the development of a vaccine that effectively induces neutralizing antibodies against CV-A6, irrespective of genetic cluster.

## Diversity of spotted fever group rickettsiae and their association with host ticks in Japan

Thu MJ, Qiu Y, Matsuno K, Kajihara M, Mori-Kajihara A, Omori R, Monma N, Chiba K, Seto J, Gokuden M, Andoh M, Oosako H, Katakura K, Takada A, Sugimoto C, Isoda N, Nakao R

Sci Rep. 2019;9:1500.

Spotted fever group (SFG) rickettsiae are obligate intracellular Gram-negative bacteria mainly associated with ticks. In Japan, several hundred cases of Japanese spotted fever, caused by *Rickettsia japonica*, are reported annually. Other Rickettsia species are also known to exist in ixodid ticks; however, their phylogenetic position and pathogenic potential are poorly understood. We conducted a nationwide cross-sectional survey on questing ticks to understand the overall diversity of SFG rickettsiae in Japan. Out of 2,189 individuals (19 tick species in 4 genera), 373 (17.0%) samples were positive for Rickettsia spp. as ascertained by real-time PCR amplification of the citrate synthase gene (*gltA*). Conventional PCR and sequencing analyses of *gltA* indicated the presence of 15 different genotypes of SFG rickettsiae. Based on the analysis of five additional genes, we characterised five Rickettsia species; *R. asiatica*, *R. helvetica*, *R. monacensis* (formerly reported as *Rickettsia* sp. In56 in Japan), *R. tamurae*, and Candidatus *R. tarasevichiae* and several unclassified SFG rickettsiae. We also found a strong association between rickettsial genotypes and their host tick species, while there was little association between rickettsial genotypes and their geographical origins. These observations suggested that most of the SFG rickettsiae have a limited host range and are maintained in certain tick species in the natural environment.

## Polio vaccination coverage and seroprevalence of poliovirus antibodies after the introduction of inactivated poliovirus vaccines for routine immunization in Japan

Satoh H, Taya K, Shimizu H, Goto A, Tanaka S, Nakano T, Hotta C, Okazaki T, Itamochi M, Ito M, Nakagawa R, Yamashita Y, Arai S, Okuno H, Morino S, Oishi K.

Vaccine. 2019;37:1964-1971.

In Japan, the oral poliovirus vaccine (OPV) was changed to 2 types of inactivated poliovirus vaccine (IPV), the standalone conventional IPV (cIPV) and the Sabin-derived IPV combined with diphtheria-tetanus-acellular pertussis vaccine (DTaP-sIPV), for routine immunization in 2012. We evaluated polio vaccination coverage and the seroprevalence of poliovirus antibodies using data from the National Epidemiological Surveillance of Vaccine-Preventable Diseases (NESVPD) from 2011 to 2015. Several years before the introduction of IPV in 2012,

OPV administration for children was refused by some parents because of concerns about the risk of vaccine-associated paralytic poliomyelitis. Consequently, in children aged <1 years who were surveyed in 2011-2012, polio vaccination coverage (45.0-48.8%) and seropositivity rates for poliovirus (type 1: 51.7-65.9%, type 2: 48.3-53.7%, and type 3: 15.0-29.3%) were decreased compared to those surveyed in 2009. However, after IPV introduction, the vaccination coverage (95.5-100%) and seropositivity rates (type 1: 93.2-96.6%, type 2: 93.1-100%, and type 3: 88.6-93.9%) increased among children aged <1 years in 2013-2015. In particular, seropositivity rates and geometric mean titers (GMTs) for poliovirus type 3 in <5-year-old children who received 4 doses of IPV (98.5% and 247.4, respectively) were significantly higher than in those who received 2 doses of OPV (72.5% and 22.9, respectively). Furthermore, in <5-year-old children who received 4 doses of either DTaP-sIPV or cIPV, the seropositivity rates and the GMTs for all 3 types of poliovirus were similarly high (96.5-100% and 170.3-368.8, respectively). Our findings from the NESVPD demonstrate that both the vaccination coverage and seropositivity rates for polio remained high in children after IPV introduction.

## 2) 学会発表

### Genomic comparison of Stx2f phages from *Escherichia coli* and *Escherichia albertii*

Ooka T, Rakibul IMd, Ochiai S, Ogura Y, Seto K, Isobe J, Ikeda T, Seto J, Gotoh Y,  
Nishi J, Hayashi T

2018.5.6-9, VTEC2018, Florence, Italy.

**INTRODUCTION:** Shiga toxin (Stx) is the key virulence factor of enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC), which causes diarrhea and hemorrhagic colitis with life-threatening complications, such as hemolytic uremic syndrome. Stxs are divided into two subtypes (Stx1 and Stx2), and both contain multiple variants. In Stx2, there are 8 known variants; Stx2a, Stx2b, Stx2c, Stx2d, Stx2e, Stx2f, Stx2g, and Stx2h. Although it is generally thought that EHECs have acquired Stxs by phage-mediated horizontal gene transfer (HGT), the mode of transmission of Stx2f was not fully understood. We have recently identified Stx2f-positive *Escherichia albertii*. Here, we performed comparative genomic analysis of the Stx2f-encoding prophages from *E. coli* and *E. albertii* to characterize the mode of transmission and the capability of intra- or inter-species transfer of Stx2f phage.

**METHODS:** A total of 17 Stx2f-positive strains were analyzed. Multi-locus sequence analysis (MLSA) was performed according to the protocol provided from the University of Warwick web site (<http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli/>) and a neighbor-joining tree was constructed using the MEGA6. We selected 6 representative strains from *E. coli* and *E. albertii* lineages and sequenced their genomes by Illumina MiSeq. We further determined the complete sequences of their Stx2f-prophage genomes to perform intra- or

inter-species comparisons of these prophages. Host ranges of these Stx2f phages were analyzed by plaque formation and lysogenization assays using *E. coli* and *E. albertii* strains.

**RESULTS:** Stx2f-positive strains belonged to the *E. coli* phylogroup B1 and B2 and *E. albertii* lineages. All the completely sequenced Stx2f prophages were found to encode CDT and/or T3SS effectors. Intraspecies genomic comparison of 4 Stx2f-encoding prophages in *E. coli* exhibited that their early regions are highly divergent but the late regions were highly conserved (more than 98 % nucleotide identity). On the other hand, two Stx2f-encoding prophages in *E. albertii* were almost identical. Interspecies comparison exhibited that only lysis and tail regions are relatively well conserved (around 90% amino acid sequence identity). Plaque formation and lysogenization assays revealed that Stx2f phages from *E. albertii* and *E. coli* strains can infect *E. coli* K-12 C600.

**CONCLUSIONS:** Our results of genomic comparison of Stx2f phages suggest that the Stx2f phages of *E. coli* and *E. albertii* strains analyzed in this study have been derived from different origins. These Stx2f phages were, however, transmittable between *E. coli* and *E. albertii*, suggesting that the Stx2f genes are exchangeable between the two species by phage-mediated HGT.

## **Establishment of EV71 vaccine efficacy test using human scavenger receptor B2 transgenic mice**

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

Europic 2018, 2018.6.3-7, Egmond aan Zee, The Netherlands.

**Introduction:** Enterovirus 71 (EV71) is a causative agent of hand-foot-mouth disease (HFMD). 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 in vivo EV71 vaccine efficacy test using human SCARB2 transgenic mouse and a set of EV71 virulent strains.

**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 RD-EXT1 KO-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 titer was determined. The immunized mice were challenged with lethal dose of virulent viruses (at 10-week-old). The mice were observed daily for two weeks.

**Results:** 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 RD-EXT1 KO-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 the viruses with different subgenogroups.

Conclusion: We established an efficacy test for EV71 vaccine using SCARB2 tg mice and a set of EV71 virulent strains. Our results indicate that this system is highly reproducible and convenient. The system will be helpful in developing new different types of vaccines.

## パレコウイルス3型による流行性筋痛症・筋炎

水田克巳

第59回日本臨床ウイルス学会シンポジウム，2018年6月9日，於大宮

2008年，山形県内の神経内科医が流行性筋痛症と臨床診断した22名の患者検体について，網羅解析（国立感染症研究所），遺伝子検出・ウイルス分離・中和抗体測定，の組み合わせにより，14名がパレコウイルス3型（HPeV3）に感染していることが判明した．特に7名では，抗体の動きから発症時にHPeV3に感染したと考えられたため，HPeV3による成人の流行性筋痛症として2012年に論文報告し，第53回本学会で発表した．

2011年6-8月に県内の小児においてHPeV3が流行し，同時期に5名の成人筋痛症症例を観察した．ことから，本疾患の再現性を確認するとともに，小児が家庭にウイルスを持ちこみ，感染した親の一部が筋痛症を発症しているのではないかという仮説を提唱し，第54回本学会で報告した．

第56回本学会シンポジウムの講演では，2014年にも同疾患の再現性を確認するとともに，小児でも成人同様の筋痛症が見つかったことを発表した．

その後，HPeV3の全国的流行があった2014，2016年，流行性筋痛症の散发例を観察したという論文・学会報告が大阪をはじめとして全国からみられるようになり，この疾患は山形の風土病から日本の風土病となった．予後が良好であることから，積極的な診断と治療は不要という考え方もあるかもしれない．しかし，臨床ウイルス学がサイエンスであるならば，この疾患の認知はもとより，臨床及びウイルス学的な診断の普及，症例の蓄積，病態メカニズムの解明，さらには海外にこの疾患が無いのかという問いかけをしていくこと，をめざしていくべきではないだろうか．

## 山形県衛生研究所の活動を通じて地方衛生研究所の役割を考える

水田克巳

第59回日本臨床ウイルス学会ランチョンセミナー，2018年6月9日，於大宮

国の設置要綱によれば、地方衛生研究所（地研）は、地域保健対策を効果的に推進し、公衆衛生の向上及び増進を図るため、都道府県又は指定都市における科学的かつ技術的中核として、関係行政部局、保健所等と緊密な連携の下に、調査研究、試験検査、研修指導及び公衆衛生情報等の収集・解析・提供を行うこと、を目的とする。公衆衛生担当の研究所という意味では、英語でいえば、“Public Health Laboratory”という概念に相当するといえよう。

一般に、Public Health Laboratory は、疾患（ここでは特に感染症）から Public（地域や国の人々）を守るための最前線実験（研究）機関と定義されている。Public を感染症から守るといっても、その方法・手段は多岐にわたる。新たな感染症（病原体）の発見に始まって、診断法・治療法・抗ウイルス薬・抗菌剤・ワクチンの開発、疫学研究など、さまざまな要素があり、こうした条件がそろって初めて感染症への具体的な対応が可能となる（インフルエンザが良い例で、1930年代にウイルス疾患であることが発見され、その後、ワクチン・診断キット・抗ウイルス薬開発など医学・医療が進歩し、我々は現在その恩恵を享受している）。

山形県衛生研究所では、鼻咽頭拭い液中に含まれるウイルスをターゲットに、ウイルス分離をベースに遺伝子検出・解析、抗原解析、血清疫学等を組み合わせて中長期にわたる疫学研究を実施している。これまで、エンテロウイルス・ヒトメタニューモウイルス・アデノウイルス・コロナウイルスなど多くのウイルスを取り扱ってきた。いっぽう、2017年3-4月には、排除達成後国内で最大規模の麻疹流行に遭遇し、その解析結果を論文として投稿したところである。

今回のランチョンセミナーは、山形県衛生研究所の活動を通じて、幾つかの研究実践例を共有しながら、地研の役割について考える機会としたい。

## 2001~2017年に山形で分離されたコクサッキーウイルス A6型の分子疫学

水田克巳，田中静佳，駒林賢一，青木洋子，池田辰也，板垣勉，勝島史夫，勝島由利子，  
吉田宏，伊藤末志，松寄葉子

第72回日本細菌学会東北支部総会，2018年8月18日，於仙台

【目的】コクサッキーウイルス A6型は、主に小児の夏風邪の1つであるヘルパンギーナの病原体として知られていた。しかし、2008年のフィンランドからの初めての報告以来、大腿部や臀部等にいたる広範な発疹や爪甲脱落症等を特徴とする非定型的な手足口病との関連を示唆する報告が世界的になされている。日本でも、2009年頃からコクサッキーウイルス A6型による非定型的な手足口病の報告が出始め、2011年に全国で大流行して以降、手足口病の主要な原因ウイルスとなって、隔年おきの流行が続いている。我々は、継続的に山形県内のウイルス分離を実施してきており、今回は2001年から2017年までに分離されたコクサッキーウイルス A6型山形株について分子疫学的解析を実施することを目的とした。

【方法】研究期間の115株の分離株についてVP1，3Dポリメラーゼ領域についてシーケンス・系統樹解析を実施した。

【結果】系統樹解析の結果，山形株は，非定型的な手足口病の報告が出始めた 2009 年前後で，2 系統に分岐した。

【考察】兵庫県の先行研究 (J.Med.Virol.89:1395-1403,2017) によれば，2008 年までの株は ClusterI に，2009 年の株は ClusterI 及び ClusterII に，2010 年以降の株は ClusterII に分岐している。山形では，2009 年の株は無いが，2008 年までの株は兵庫の ClusterI と同じ Cluster に，2010 年以降の株は兵庫の ClusterII と同じ Cluster に属することが確認された。

これらのことから，非定型的な手足口病と関連する ClusterII のウイルスは 2009 年頃に日本に侵入し ClusterI とともに共存，2010 年以降，ClusterI は消失し ClusterII のウイルスが日本全国に広がったものと考えられた。

なお，本研究は東北乳酸菌研究会の支援を受けて実施された。

## Tissue culture adaptation of enterovirus 71 selects mutant viruses that bind to HS and are attenuated in vivo

Kobayashi K, Son CT, Takashino A, Mizuta K, Nishimura H, Ichimura H, Koike S

第66回日本ウイルス学会学術集会，2018年10月28-30日，於京都

[Background] Enterovirus 71 (EV71), a causative agent of hand-foot-mouth-disease, is sometimes associated with severe neurological disease. Identification of virulence determinants is important to understand EV71 pathogenesis. EV71 is quickly attenuated when propagated in cell culture, which makes such analysis difficult. The aim of this study is to clarify the mechanism of rapid change and establish a system to avoid such bias during cultivation. We hypothesized that heparan sulfate (HS) is a possible cause of attenuation because HS binding variants are avirulent. [Methods] RD-A cells, HS-deficient RD-A cells (HS\_KO), hSCARB2 over-expressing RD-A cells (RD-SCARB2, and HS\_KO-SCARB2) were used. Virulent strains (HS non-binding) were passaged in the cells at a low moi three times. To evaluate virulence levels, viruses were inoculated to hSCARB2-tg mice intraperitoneally. Mutations of viral genome were determined by next generation sequencing.

[Results] When virulent strains (HS non-binding) were passaged in RD-A cells, HS\_KO, and RD-SCARB2 cells, we recovered viruses with HS binding mutation and attenuation phenotype. However, viruses passaged in HS\_KO-SCARB2 cells had no apparent mutations and similar levels of virulence to the parental virus.

[Discussion] SCARB2 serves as a receptor for all EV71 strains by binding to, internalizing, and initiating uncoating of the virion. However, SCARB2 is not abundant on cell surface, resulting in limited infection efficiency via SCARB2 in cultured cells. Once HS-binding strains appear by error prone viral RNA replication, HS, which is an attachment receptor abundantly expressed on surface of cultured cells, supports efficient infection of the HS-binding mutants. Thus, tissue culture adaptation of EV71 selects mutants that bind to HS and are attenuated in vivo. HS-deficient and hSCARB2 over expressing cells do not select avirulent variants, suggesting that receptor

usage is an important selection factor for unnatural mutants.

## Susceptibility of NIID-MDCK cells to human parainfluenza virus type 3 (HPIV3) in the presence of influenza virus

Hamamoto I, Takahashi H, Mizuta K, Odagiri T, Nobusawa E

第66回日本ウイルス学会学術集会，2018年10月28-30日，於京都

【Objective】 In Japan, cell-culture influenza vaccine production methods have been developed as an alternative strategy to overcome current limitations of egg-based production system. One of the major concerns for this new methods is the contamination of adventitious viruses into the pre-seed viruses isolated in NIID-MDCK cells. In our previous study, NIID-MDCK cells, which were established to isolate vaccine pre-seed viruses for the production of cell culture-based seasonal influenza vaccines, exhibited limited susceptibility to a large variety of virus infections, except for human parainfluenza virus type 3 (HPIV3). In this study, we investigated the susceptibility of NIID-MDCK cells to HPIV3 infection when influenza viruses were co-infected.

【Materials and Methods】 NIID-MDCK cells and HPIV3-susceptible Caco-2 cells were co-infected with influenza virus and HPIV3. At 72 hours post-infection, 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 and Discussion】 The susceptibility of NIID-MDCK cells to HPIV3 infection was reduced by multiple passages following co-infection with HPIV3 and influenza B virus. In contrast, NIID-MDCK cells showed high susceptibility to HPIV3 infection regardless of the presence of influenza A virus. The same results were obtained with recently isolated virus strains. Therefore, our results suggest that there are susceptibility differences of NIID-MDCK cells to HPIV3 infection in the presence of influenza A or B virus. In future, we would like to investigate a novel mechanism for influenza-mediated susceptibility of NIID-MDCK cells to HPIV3 infection.

## 不活化ワクチン導入から現在までのポリオの予防接種状況・抗体保有状況の推移について（感染症流行予測調査より）

佐藤弘，多屋馨子，清水博之，大石和徳，後藤明子，青木洋子，中野剛志，堀田千恵美，長谷川道弥，板持雅恵，伊藤雅，岡本玲子，豊嶋千俊

第22回日本ワクチン学会学術集会，2018年12月8-9日，於神戸



【背景と目的】2012年9月にポリオの定期接種に使用されるワクチンが不活化ポリオワクチン（IPV）に切り替わり、2018年7月現在は3種類のポリオ含有ワクチン（強毒株由来IPV：cIPV，Sabin株由来IPV含有四種混合ワクチン：DPT-sIPV，強毒株由来IPV含有四種混合ワクチン：DPT-cIPV）が使用されている。これらワクチンの接種状況およびポリオ抗体保有状況の現況（2017年度），ならびに継時的推移（2011～2017年度）の検討を行った。

【対象と方法】2011～2017年度に感染症流行予測調査で実施されたポリオ感受性調査（調査期間は主に各年7～9月）の結果を用いた。同期間に北海道，山形県，群馬県，千葉県，東京都，富山県，愛知県，山口県，愛媛県からポリオ含有ワクチンの接種歴およびポリオウイルスSabin 1～3型に対する中和抗体価の測定結果が報告された。

【結果と考察】5歳未満（242～372名，接種歴不明者を除く）のポリオ含有ワクチン1回以上接種率は、2011～2012年度に86～87%であったが、2013～2017年度は98～100%と高かった。またワクチンの種類・回数が明らかな者（190～260名）では、IPVのみ被接種者は2011～2012年度（0～6%）に少なかったが、2013年度48%，2014年度73%，2015年度91%と増加し、2016～2017年度は97～99%がIPVのみ被接種者であった。一方、5歳未満（259～427名）の抗体保有率（中和抗体価 $\geq$ 1:8，以下同じ）は、1型・2型に対して2011～2012年度に85～86%であったが、2013～2017年度は95～100%と、1回以上接種率の上昇とともに抗体保有率も上昇していた。3型に対しては2011～2012年度に59～60%であったが、2013～2014年度は75～88%，2015～2017年度は94～96%と、IPVのみ被接種者が増加するにつれて抗体保有率の上昇がみられた。

2017年度調査のワクチンの種類・回数が明らかな10歳未満（各年齢18～63名）において、0～5歳は多くがIPVのみ被接種者（89～100%）で、そのうち4回接種者は0歳で0%，1歳で35%，2～4歳で94～100%，5歳で88%であった。6歳以上ではIPVのみ被接種者は半数以下であった。次にIPVのみ4回の接種歴があった1～5歳（1型・3型：18～48名，2型：11～32名）の抗体保有率をみると、1型に対する4歳（89%）を除き、いずれの年齢とも1～3型に対して概ね95%以上（94～100%）であった。一方、抗体陽性者における幾何平均抗体価は1型で1～2歳（27.7～8.5），2型で1～4歳（28.3～8.6），3型で1～4歳（27.8～8.9）が概ね28.0を示したが、1型の3～5歳（26.2～6.3），2型の5歳（26.6），3型の5歳（26.3）で低い傾向がみられた。

IPV定期接種導入後の5歳未満における接種率および抗体保有率は高く維持されていることが確認されたが、2017年度調査の5歳児で1～3型に対する幾何平均抗体価が低かったことについては、今後のさらなる検討が必要と考えられた。

最後に本調査にご協力頂いた都道府県衛生研究所の先生方をはじめ、関係機関の皆様に深謝いたします。

## 1 都4県に拡大した麻しんの集団感染を経験して

山田敬子，阿彦忠之，石川仁，水田克巳，瀬戸順次

第77回日本公衆衛生学会，2018年10月24-26日，於郡山

【はじめに】我が国は、日本土着のウイルスが過去3年以上検出されなかったことから、WHOにより麻疹排除状態と2015年に認定されている。しかし、海外渡航者による輸入感染例は続いており、2016年には関西国際空港で、さらに本年に発生した沖縄県での集団感染事例は記憶に新しい。昨年、山形県では、県外から自動車教習所に入校した学生を発端に60人の集団感染事例を経験したので、課題を含め報告する。

【経過】感染源となった症例は20代男性。2017年2月20日～26日までインドネシアへ渡航し、3月2日から来県していた。翌日から38℃以上の熱発があったが、3月8日に40℃へ上昇するまで受診せず。同日緊急入院し、翌日午後には麻疹ウイルス検出により確定診断された。有症状のまま1週間も宿泊先のホテルと自動車教習所に滞在したため、同教習所の生徒や職員、ホテル利用者等と職員へ2次感染が拡大。さらに最大4次まで感染拡大し、4月15日の最終罹患者の届出から4週間後の5月17日にやっと終息宣言が可能となった。

【対応】この間、接触者として健康観察を実施したのは、約3,700人（70か所）、県外への調査依頼は445人（201自治体）に及んだ。検体採取者は137人（陽性：53人 陰性：84人）、緊急ワクチン接種は144人。県内4つの2次医療圏のうち3カ所まで感染拡大した他、宮城・埼玉・東京・滋賀・三重にも2次感染患者が発生した。

【考察】終息後の分析では、60人中41人（68%）が修飾麻疹であったが、初発患者以外にワクチン未接種の3人が感染拡大させていたと判明した。課題としては、患者の立ち入り先などの情報公開基準が各県で定まっておらず、今回のように複数の都道府県で患者が発生した場合の報道の在り方や、感染拡大に伴い感染症指定医療機関以外の医療機関の協力を仰ぐ際、事前に職員の麻疹ワクチン接種歴や抗体価などを把握していない場合が多く、緊急対応に間に合わない状況などがあった。初発患者の届出から最終罹患者の届出までは38日間経過したが、自動車教習所を含む関係機関の協力のもとで、速やかな接触者健診と緊急ワクチンの接種を実施できたことが感染拡大防止に有効であったので、そのポイントを報告する。

## Detection of modified and primary measles cases using a real-time RT-PCR

Seto J, Mizuta K, Yamada K, Ishikawa H, Ahiko T

第77回日本公衆衛生学会，2018年10月24-26日，於郡山

[Objective] We aimed to verify the effectiveness of real-time reverse transcription (rRT) PCR for detecting cases of modified measles (M-Me) and for predicting candidates of primary cases (i.e., the individuals who transmit measles to others) through the experience of a measles outbreak dominated by M-Me in Yamagata, Japan, during March-April 2017.

[Method] We applied rRT-PCR to specimens from 35 cases of M-Me, 9 cases of typical measles (T-Me), and 9 cases of prodromal stage of T-Me (P-Me) that developed into T-Me after diagnosis as M-Me at the time of specimens collection.

[Results] From rRT-PCR among the M-Me cases, peripheral blood mononuclear cells (PBMC) showed the highest positive rate (80.0%), followed by pharyngeal swab (48.6%), urine (33.3%), and serum (3.1%). The negative result of PBMC in M-Me cases was recovered by the result of pharyngeal swab. In specimens of PBMC, pharyngeal swab, and urine, M-Me group showed significantly higher cycle of threshold (i.e., lower viral load) in the rRT-PCR than T-Me and P-Me groups, respectively. Furthermore, three primary cases in T-Me or P-Me showed an extremely low cycle of threshold in their pharyngeal swab specimens.

[Conclusion] rRT-PCR using PBMC and pharyngeal swab might be helpful for clinical management and measles control by certain detection of M-Me cases and by predicting primary cases with high viral load.

## 調理加工を行ったツキヨタケ中の有毒成分イルジン S の残存量

大河原龍馬, 篠原秀幸

日本きのこ学会第 22 回大会, 2018 年 9 月 12-14 日, 於函館

ツキヨタケは有毒成分のイルジン S を含有しており, 喫食すると 30 分~3 時間程度で嘔吐, 下痢, 腹痛等の症状を呈する. 毒キノコについては古くから, 「乾燥すれば食べられる」等の毒消しを目的とした調理加工にまつわる言い伝えがあり, 過去にはそれら言い伝えを信じたために食中毒となった事例が報告されている. 今回, それらの言い伝えの真偽を検証するため, 言い伝えに基づくツキヨタケの調理加工品を作製し, 調理加工前後のイルジン S の濃度を比較した. その結果, いずれの調理加工法もイルジン S の残存が認められ, 十分な毒消し効果がないことが判明した.

## 2017 年に山形県内で発生したヒスタミン食中毒事例

太田康介, 伊藤育子, 篠原秀幸, 石田恵崇, 大滝麻井子, 佐藤陽子, 長岡由香, 阿部英明

日本食品衛生学会第 114 回学術講演会, 2018 年 11 月 15-16 日, 於広島

2017 年に山形県内の保育施設で提供された給食(ブリの照り焼き)を原因とするヒスタミン食中毒が発生し, 生体アミンの分析を行った. 食品衛生検査指針に準じ, 抽出, 精製, ダンシルクロライドで蛍光誘導体化したものを HPLC 分析に供した. 分析はヒスタミン, チラミン, プトレシン, カダベリン, スペルミジンの 5 化合物を対象とした. 分析の結果, 当該食中毒の主たる病因物質ヒスタミンは全ての試料から検出された. FAO/WHO 専門家会議においてヒスタミンの最大許容濃度は 0.2 mg/g と結論付けられており, いずれも当該濃度を超過した. また分析結果, 給食の提供量, および各年齢(年代)における平均体重から, 体重あたりの推定ヒスタミン摂取量を算出した.

## PCR を用いたトリカブト鑑別法の適用検体の検討

太田康介, 大滝麻井子, 平健吾, 篠原秀幸, 大河原龍馬, 内海浩, 阿部英明

第 55 回全国衛生化学技術協議会年会, 2018 年 11 月 29-30 日, 於横浜

山形県における発生件数が最多であるトリカブトを用い, その塩基配列を指標とした鑑別法の適用検体について検討した. 植物そのものを試料とした場合, 本系でトリカブトの品種に関係なく検出可能であること, トリカブトと山菜(ニンソウ, モミジガサ)の鑑別が可能であることが確認できた. さらに, トリカブトと山菜の混合品でもトリカブト遺伝子の検出は可能であった. トリカブトの油炒めを用いた実験では, 230℃で2分間加熱した3試料のうち検出できたのは2試料だった. このことから, 植物に与えた熱量によっては本系では検出困難になることが示唆された. お浸しについては本系の適用は可能と考える. 模擬吐物については, 人工胃液での処理時間が4時間以内であれば全ての試料からトリカブト遺伝子が検出できた.

## 食中毒検体を想定した試料でのトリカブト鑑別法 —第2報—

太田康介, 平健吾, 大滝麻井子, 篠原秀幸, 大河原龍馬, 内海浩, 阿部英明

第 45 回山形県公衆衛生学会, 2019 年 3 月 7 日, 於山形

PCR法を用いてトリカブト固有の塩基配列を検出することで, トリカブトと山菜の鑑別が可能であること, ならびにトリカブトの油いため, およびおひたし等からトリカブトのDNAを検出可能であることを昨年の第44回山形県公衆衛生学会において報告した. しかし, 実際の食中毒検体はトリカブトと他の植物(山菜等)が混在するケースがほとんどである. そこで今回, トリカブトと山菜を混合した試料を用いた検証を行った結果について報告する. 実験1: 所定重量比でトリカブトとニンソウを混合した未調理試料での検出可否を確認したところ, 全ての試料でトリカブト遺伝子を検出できた. このことから, ニンソウにトリカブトが微量混入している検体でも検出可能であることが明らかとなった. 実験2: 実験1と同様に混合した試料を調理し, 検出可否を確認したところ, トリカブトの比率に依存して検出数が変化した. 全ての試料から検出できるように検出系を改良することが今後の課題と考える.

## 残留農薬分析において均一化法が分析値に及ぼす影響

篠原秀幸, 太田康介, 大河原龍馬, 石田恵崇, 平健吾, 伊藤育子, 内海浩, 阿部英明

第 45 回山形県公衆衛生学会，2019 年 3 月 7 日，於山形

食品中の残留農薬分析などのサンプリング検査では試料の均一性が重要となる。しかし、通常の均一化方法（以下、常温粉砕法）では果皮を含む果物類等の均一化において果皮等の固形分と水分が分離することがある。一方、ドライアイスにより試料を凍結した状態で均一化する方法（以下、凍結粉砕法）では試料が粉末状に均一化されるため、固形分と水分が分離しない。そこで、農薬を添加したぶどうを各均一化法で均一化し、農薬成分のピーク面積の変動係数を比較した。その結果、凍結粉砕法で均一化した場合、変動係数が常温粉砕法と比べて小さくなり、サンプリングに起因する定量値の変動を軽減できる可能性が示唆された。

## テングタケに対する複数の分析法の適用

伊藤育子，太田康介，平健吾，内海浩，阿部英明

第 45 回山形県公衆衛生学会，2019 年 3 月 7 日，於山形

平成 30 年 9 月、庄内保健所管内でテングタケの誤食による食中毒が発生した。テングタケを原因とする食中毒は県内においては今回が初めての事例である。この事例では患者の症状およびキノコ検体の鑑定によって原因食品の特定が行われたが、外見からの判断などの経験に基づく手法では原因特定が困難な場合も考えられる。そこで、自然毒食中毒検査体制の更なる整備を目的として、テングタケ検体に対して 2 種の分析法を実施した。(1) LC-MS/MS を用いた有毒キノコ一斉分析法：テングタケ検体からムシモールとイボテン酸のみが検出された。陰性試料では全ての毒成分について不検出であった。(2) PCR 法：テングタケ検体において明瞭なバンドが検出されたが、その他のキノコ検体においても同位置にごく薄いバンドが検出された。これは採取・運搬時の検体同士の接触によりコンタミネーションが発生したことが原因と考えられる。有毒キノコ一斉分析法からは毒成分の種類が特定できるが、ムシモールとイボテン酸を含む毒キノコは複数種が存在し特定はできない。一方 PCR 法ではテングタケであることを特定できるが、毒成分の有無は判断できない。2 つの結果を合わせて提示することで、食中毒原因のより確実な特定や、状況に応じた検体への対応が可能となることから、複数の検査法を整備することの必要性が裏付けられた。

## 2018 年の山形県における百日咳の報告状況について

山田浩貴，小川直美，小松秀一，長岡由香

第 45 回山形県公衆衛生学会，2019 年 3 月 7 日，於山形

感染症発生動向調査において、2018 年に山形県内の医療機関から報告された百日咳患者について分析し

た。2018年に山形県で報告された百日咳患者は142人（2019年1月7日現在）であった。年齢別では6～12歳が多く、全体の75%を占め、ワクチン接種歴では90%が4回接種済みであった。成人の患者の報告は20人で90%がワクチン接種歴不明であった。また、0歳児の報告は全て生後3ヶ月以下であり、ワクチン未接種であった。6～12歳の報告数が多く、そのほとんどがワクチンを4回接種済みであることから、ワクチン接種終了から5年以降でワクチンの効果が減弱することが示唆される。症状別では、「持続する咳」が全症例の約9割、「夜間の咳き込み」が約6割にみられた。また、0歳児の症例では半数以上でウーブ及びスタッカートを伴う咳嗽発作がみられ、無呼吸発作、肺炎など重篤な症状を示した例もあった。また、家族内感染ありと記載があった症例が23例あり、同胞での感染が最も多く65%を占めた。学校での流行ありと記載があった症例は42例だった。このことから、学校が大きな感染源であり、家族内に感染を持ち込まれた場合、同胞間で感染が拡大されやすいことが推察される。

2018年の百日咳の報告は、142人で全数把握疾患のうち最も多く報告された感染症となった。本調査により、小学校での流行がしばしば発生していることが示唆された。百日咳は感染力が非常に強い。早期に流行を探知し、情報発信を行うことにより、早期診断、早期治療につなげ、流行を最小限に抑えることに寄与できると考えられる。