

抄 録

1) 他誌掲載論文

Time-varying overdispersion of SARS-CoV-2 transmission during the periods when different variants of concern were circulating in Japan

Ko Y, Furuse Y, Otani K, Yamauchi M, Ninomiya K, Saito M, Imamura T, Cook AR, Ahiko T, Fujii S, Mori Y, Suzuki E, Yamada K, Ashino Y, Yamashita H, Kato Y, Mizuta K, Suzuki M, Oshitani H

Sci Rep. 2023;13:13230.

Japan has implemented a cluster-based approach for coronavirus disease 2019 (COVID-19) from the pandemic's beginning based on the transmission heterogeneity (overdispersion) of severe acute respiratory coronavirus 2 (SARS-CoV-2). However, studies analyzing overdispersion of transmission among new variants of concerns (VOCs), especially for Omicron, were limited. Thus, we aimed to clarify how the transmission heterogeneity has changed with the emergence of VOCs (Alpha, Delta, and Omicron) using detailed contact tracing data in Yamagata Prefecture, Japan. We estimated the time-varying dispersion parameter ([Formula: see text]) by fitting a negative binomial distribution for each transmission generation. Our results showed that even after the emergence of VOCs, there was transmission heterogeneity of SARS-CoV-2, with changes in [Formula: see text] during each wave. Continuous monitoring of transmission dynamics is vital for implementing appropriate measures. However, a feasible and sustainable epidemiological analysis system should be established to make this possible.

A decade of human metapneumovirus in hospitalized children with acute respiratory infection: molecular epidemiology in central Vietnam, 2007–2017

Otomaru H, Nguyen HAT, Vo HM, Toizumi M, Le MN, Mizuta K, Moriuchi H, Bui MX, Dang DA, Yoshida LM

Sci Rep. 2023;13:15757.

Human metapneumovirus (hMPV) can cause severe acute respiratory infection (ARI). We aimed to clarify the clinical and molecular epidemiological features of hMPV. We conducted an ARI surveillance targeting hospitalized children aged 1 month to 14 years in Nha Trang, Vietnam. Nasopharyngeal swabs were tested for respiratory viruses with PCR. We described the clinical characteristics of hMPV patients in comparison with those with

respiratory syncytial virus (RSV) and those with neither RSV nor hMPV, and among different hMPV genotypes. Among 8822 patients, 278 (3.2%) were hMPV positive, with a median age of 21.0 months (interquartile range: 12.7-32.5). Among single virus-positive patients, hMPV cases were older than patients with RSV ($p < 0.001$) and without RSV ($p = 0.003$). The proportions of clinical pneumonia and wheezing in hMPV patients resembled those in RSV patients but were higher than in non-RSV non-hMPV patients. Seventy percent ($n = 195$) were genotyped (A2b: $n = 40$, 20.5%; A2c: $n = 99$, 50.8%; B1: $n = 37$, 19%; and B2: $n = 19$, 9.7%). The wheezing frequency was higher in A2b patients (76.7%) than in those with other genotypes ($p = 0.033$). In conclusion, we found a moderate variation in clinical features among hMPV patients with various genotypes. No seasonality was observed, and the multiple genotype co-circulation was evident.

COVID-19 の呼吸器ウイルス感染症への影響—特に RS・インフルエンザ A 型・季節性コロナウイルス・メタニューモウイルス・パラインフルエンザ 3 型流行の季節性に着目して—

水田克巳, 小川直美, 駒林賢一, 佐々木美香, 的場洋平, 瀬戸順次, 板垣勉, 池田辰也

臨床とウイルス. 2023;51:270-274.

山形における長期の呼吸器ウイルス感染症疫学研究の中で、RS ウイルス(RS)は秋、インフルエンザ A 型 (FluA) とヒト季節性コロナウイルス(HCoV)は冬、ヒトメタニューモウイルス (HMPV) は春、ヒトパラインフルエンザ 3 型(HPIV3)は春から夏を中心に流行していることを観察・報告してきた。2020 年に Severe Acute Respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) による coronavirus disease 2019 (COVID-19) パンデミックが発生 (山形の初発患者発生は 3 月 31 日) し、2004 年から 2022 年までの 1 小児科定点のデータをもとに、上記の呼吸器ウイルス感染症への影響について検討した。FluA は、COVID-19 パンデミック発生以降全く検出がなかった。RS は、2020 年検出はなく、2021 年 7-8 月、2022 年 10-11 月を中心に検出された。HPIV3 は、5-7 月頃に毎年必ずピークを観察していたが、2020 年と 2022 年には検出が無く、2021 年は 2019 年までと同様の流行を観察した。HMPV は、2020-2021 年検出はなく、2022 年 10-11 月に検出された。HCoV-OC43 は 2020 年までは毎年 1-3 月に検出されてきたが、2021 年検出が途絶えた。2021 年、3-6 月に HCoV-NL63 の、そして 9-12 月に HCoV-OC43 の流行が観察された。上記のように、COVID-19 パンデミック発生以後、臨床検体数は減少したものの、パンデミックは呼吸器ウイルス感染症の流行パターンに大きく影響を及ぼしたものと考えられた。今後、地域における、そして日本全体における呼吸器ウイルス感染症の長期的な監視・発生動向調査体制が充実強化され、感染症の流行の特徴がより正確に描きだされ、ひいてはウイルス感染症のコントロールにつながっていくことを強く期待したい。

A case of *Legionella pneumophila* serogroup 13 pneumonia based on the detection of serogroup-specific genes in culture-negative sputum

Seto J, Takahashi J, Sampei M, Ikeda T, Mizuta K

Jpn J Infect Dis. 2024;77:118-120.

Legionella pneumophila serogroup (SG) 1, the main cause of Legionnaires' disease, can be diagnosed using urinary antigen testing kits. However, lower respiratory tract specimen cultures are required to identify *L. pneumophila* SG 2-15. We attempted to detect *L. pneumophila* SG-specific genes in a culture-negative sputum specimen from a patient with pneumonia who was suspected to have Legionnaires' disease. Two multiplex PCR methods targeting *L. pneumophila* were modified and amplicons considered to be SG13 specific were detected. Direct sequencing revealed that the amplicons were identical to the nucleotide sequence of *L. pneumophila* SG13. Based on the presentation and clinical course (fever, muscle pain, disturbance of consciousness, high C-reactive protein titer, rhabdomyolysis, hypophosphatemia, and symptomatic improvement with levofloxacin treatment), in combination with the detection of *L. pneumophila* SG-specific genes, we suspected *L. pneumophila* SG13 pneumonia. *L. pneumophila* non-SG1 pneumonia is thought to be underestimated because of its difficult laboratory diagnosis. The modified multiplex PCR system for lower respiratory tract specimens revealed in this study is likely to improve the diagnosis of Legionnaires' disease caused by *L. pneumophila* SG13 and other SGs.

VNTR 分析やゲノム解析を用いた結核分子疫学調査

瀬戸順次, 阿彦忠之

臨床と微生物. 2024;51:156-162.

結核低蔓延国となった日本では、VNTR 分析とゲノム解析を併用した結核分子疫学調査を進めることで、効率的かつ高精度の感染伝播経路追究が可能となる。

ドクササコ有毒成分同時分析法の調理加工品への応用

石田恵崇, 大内仁志, 菅敏幸, 長岡由香

食品衛生学雑誌. 2023;64:89-93.

ドクササコの模擬調理品3種（天ぷら，煮物，しょう油汁）について，有毒成分であるアクロメリン酸A，Bおよびクリチジンの多成分同時分析法が適用可能であるか検討を行った．いずれの調理法においても3種類全ての成分を検出することができ，分析に影響する妨害ピークは見られなかった．このことから，ドクササコ中毒発生時に調理残品を試料として原因キノコを高精度に特定可能であると判断した．また，汁物調理品において有毒成分の大半が汁中に溶出していることを見だし，この性質を利用して食用キノコ中にドクササコが混入している場合でも迅速なスクリーニングが可能であると明らかにした．

呈色反応によるツキヨタケの簡易鑑別法開発

篠原秀幸，大河原龍馬，長岡由香

食品衛生学雑誌. 2023;64:108-110.

呈色反応によるツキヨタケの理化学的鑑別法を検討した．ツキヨタケおよび類似する食用キノコの子実体傘部に試薬を滴下し，呈色反応を観察したところ，ビーム試薬（5%水酸化カリウムエタノール溶液）によりツキヨタケのみが青緑色に呈色した．また，キノコ子実体傘表皮のエタノール抽出物においても同様の反応を示した．ツキヨタケ食中毒発生時の調理残品の鑑別を想定し，調理したツキヨタケに対し前述の呈色反応を適用したところ，生のキノコ同様の呈色反応を確認した．これらのことからビーム試薬による呈色反応はツキヨタケの鑑別に有用と考えられた．

呈色反応によるツキヨタケの簡易鑑別法を食中毒の原因特定に利用した事例

篠原秀幸，大河原龍馬，伊藤育子，石田恵崇，太田康介，長岡由香

食品衛生学雑誌. 2023;64:232-235.

ツキヨタケを原因とする食中毒事例において，原因究明に呈色反応による簡易鑑別法を利用した．検体として確保された未調理キノコの子実体傘部にビーム試薬（5%水酸化カリウムエタノール溶液）を滴下したところ，一部のキノコで青緑色に呈色した．このキノコの子実体傘表皮のエタノール抽出物においても同様の反応を示した．未調理キノコに対しLC-MS/MSを用いた分析を行ったところ，各検体からツキヨタケの有毒成分の1つであるイルジンSが検出され，本事例はツキヨタケを原因とする食中毒であると断定された．以上のことから，当該鑑別法はツキヨタケ食中毒の原因究明におけるスクリーニング検査として有用であることが示唆された．

2) 学会発表

分子疫学調査の活用（特にゲノム解析）瀬戸順次

第98回日本結核・非結核性抗酸菌症学会学術講演会，2023年6月10-11日，於東京

結核における分子疫学調査の目的は、患者疫学情報と結核菌の情報を組み合わせることにより結核の伝播経路を解明することである。結核菌の情報を得る手段として、国内では反復配列多型（VNTR）分析が主に用いられている。VNTR分析は一定の識別能を有し、安価（数千円程度）かつ迅速（最短で1日間）に実施可能である。しかし、VNTR分析では最近の接触歴が全くない結核患者間で型別が一致することも珍しくなく、この分析だけでは実地疫学調査を行う保健所に過度の負担をかけてしまう。一方、近年急速に実施体制が整いつつある結核菌ゲノム解析（解析単価：解析数に応じて数千円～数万円）は、解析に時間を要するものの、その最高峰の菌株識別能により実地疫学あるいは院内感染対策上重要となる最近の感染伝播の実態を効率よく捉えることができる。さらに、ゲノム解析では、結核菌ゲノムの変異蓄積状況を精査することで、誰から誰に結核が伝播したかに関する示唆を与え得る。このように、VNTR分析とゲノム解析では特長に違いがあるものの、患者疫学情報との組み合わせにより未知の伝播経路の発見、集団感染事例の検証等に貢献する点は共通している。

本セミナーでは、VNTR分析およびゲノム解析を用いた具体的な結核伝播（あるいは非伝播）事例を紹介しながら、保健所・医療機関等の「結核の現場」において分子疫学調査を活用していくための方策を考える場としたい。

メタゲノム解析の手法によるコクサッキーウイルス A6分離株のゲノム配列取得とその評価駒林賢一，瀬戸順次，池田辰也，水田克巳

第75回日本細菌学会東北支部総会，2023年8月21日，於山形

【背景】次世代シーケンサーを用いた病原体のゲノム解析体制を充実させる機運が地方衛生研究所において高まっているが、新型コロナウイルスを除くウイルスのほとんどは解析法が未整備である。当所ではiSeq100シーケンサーを用い、メタゲノム解析の手法で数種のウイルスゲノムの解析を試みた。その中で、配列長が約7500塩基のエンテロウイルスについて良好な成績を得たため、その概要と取得配列の精度について述べる。

【方法】コクサッキーウイルス A6 分離株（CVA6）は RD-A あるいは RD-18S 細胞を用いて培養し、上清

を回収した。試料中のウイルスゲノムの比率を高めるため、遠心後に上清をろ過し、遊離核酸の消化を行った後 RNA を抽出した。未処理の培養上清からも RNA を抽出した。

TransPlex® Complete Whole Transcriptome Amplification Kit (#WTA2-10RXN, Merck)を用い、RNA をテンプレートとしランダム増幅を行った。産物 DNA は磁気ビーズによる精製を行った後、QIAseq FX DNA Library CDI-A Kit (96) (#180484, QIAGEN) を用いてライブラリ調製を行い、iSeq100 (イルミナ) でシーケンス解析を実施した。

得られた Fastq ファイルの解析には CLC Genomic Workbench (Qiagen) を用いた。参照株のゲノム配列にリードのマッピングを行い、コンセンサス配列を取得した。本法で得た塩基配列を水田らの先行研究 (Vaccine, 2019;37:1109-1117) においてサンガー法により得た塩基配列と比較し、精度を評価した。

【結果】8 株の CVA6 について解析し、カバレッジ 100 以上のコンセンサス配列 (全長の 99.2~99.8%) を取得した。未処理の検体と比較し、ウイルスゲノムの比率を高める処理を施した試料では、CA6 由来のショートリードデータが占める割合が平均 23.2 倍であった。先行研究においてサンガー法で得た 6,603 塩基と比較し、1 株当たり平均 0.75 塩基 (0.01%) の不一致があった。

【考察】本法はプライマー設計の必要がなく、低出力の iSeq100 を用いて信頼性の高いウイルスゲノム塩基配列を取得できるため、CVA6 のゲノム解析に有用と考えられる。

長期にわたるパレコウイルス A 1 型の抗原解析と血清疫学

水田克巳, 佐々木美香, 駒林賢一, 池田陽子, 青木洋子, 板垣勉, 勝島由利子,
勝島史夫, 松寄葉子

第 75 回日本細菌学会東北支部総会, 2023 年 8 月 21 日, 於山形

【目的】パレコウイルス A1 型 (PeVA1) は、1956 年に初めて分離報告され (ハリス株), 主に小児の感染性胃腸炎や上気道炎等の原因とされている。我が国の感染症発生动向調査事業によれば、PeVA1 はほぼ毎年検出報告がある。2004 年山形株を用いた血清疫学調査 (J Med Microbiol. 2020;69:1381-7) の結果から、我々は“PeVA1 の抗原性は長期間安定して保存されているのではないか”という仮説をもち、この仮説を検証するため、以下の実験を行うこととした。

【方法】まず、ハリス株と 2021 年山形株 (Y4785 株) で免疫血清を作成し、2001~21 年の 62 株の山形分離株の抗原性を解析、次に 1976 及び 2021 年の山形県民血清のハリス株・Y4785 株に対する中和抗体価を測定、した。

【結果及び考察】ハリス株・Y4785 株免疫血清の中和抗体価は、それぞれハリス株・Y4785 株に対し 1:12800・1:800, 1:400・1:102400 であり、抗原性の違いがみられたが交差性を認めた。ハリス株・Y4785 株免疫血清は、山形分離株に対し、それぞれ 1:400~1:6400, 1:6400~1:102400, の中和抗体価を示し、ほとんどの株が後者の Y4785 株免疫血清で 4~64 倍高く反応していた。

ヒト血清については、1976年の血清よりも2021年の血清においてY4785株により高く反応したが、ハリス株も中和した。

これらのことから、PeVA1は、大きく抗原性を変えることなく、小児で日常よくみられる感染性胃腸炎や上気道炎を引き起こしながら我々のコミュニティで伝播し、我々と共存してきたことが示唆された。

本研究は、東北乳酸菌研究会の支援を受けて実施された。

新型コロナウイルス感染症に対する地方自治体の衛生研究所に所属する 公衆衛生獣医師の対応

瀬戸順次

第166回日本獣医学会学術集会，2023年9月6日，オンライン

【はじめに】新型コロナウイルス感染症（COVID-19）パンデミックでの山形県衛生研究所職員の役割は、病原体の専門家として新型コロナウイルスの検査・解析をおこない、保健所・県庁・医療機関、ひいては県民に「県内で何が起きているのか」を伝えることだったと思われ返されます。山形県におけるCOVID-19対応の経緯をお伝えするには3日あっても足りませんが、今回は要点のみを振り返ります。

【初期対応】2020年春の第一波の時期は、新型コロナウイルス検査のほぼ全てを全国の衛生研究所でおこなっていました。当所の検査系は、国立感染症研究所（感染研）の支援によりスムーズに確立できましたが、日々届くたくさんの検体をさばくのは非常に大変でした。そこで、これまでの紙ベースでの検査受付・報告を、エクセルプログラムを用いた半自動の仕組みに切り替えました。その恩恵である事務処理の負荷軽減（恐らく、パンデミック終了までに数千時間分）は、円滑な検査の実施に大きく貢献したと考えています。また、当該仕組みにより蓄積された検査情報と保健所の疫学調査結果を組み合わせ、第一波における山形県内の新型コロナウイルス流行の状況を世に示すことができたのは、今となっては良い思い出です（Seto J, et al. Jpn J Infect Dis. 2021;74:522-9.）。

【時空間三次元マップ】民間検査センターや医療機関でも検査が可能になっていった第二波以降も、当所には連日多くの検体が搬入され、慌ただしい毎日が続きました。その中でも「県内で何が起きているのかを県民に伝えたい」と考え、疫学の基礎である時・場所・人の情報をまとめて図示可能なCOVID-19時空間三次元マップを開発しました。2020年春から2022年初めまでの県内流行状況をホームページで公開し続けた本取り組みは、COVID-19を正しく恐れるための一つの情報として価値があったものと考えています（瀬戸順次ら. 日公衛誌. 2023;70:185-96.）。

【系統把握】2021年以降、衛生研究所に求められる主な役割は、陽性/陰性の検査からウイルスの系統把握に移行していきました。既に懐かしきもあるアルファ株、デルタ株、オミクロン株などの系統情報は、実は全国の衛生研究所が地道にデータを蓄積・公開していました。解析手法は、系統把握開始当初はリアルタイムPCRでしたが、感染研の手厚いサポートを受けながら、次第にゲノム解析に移行していきました。今では新型コロナウイルス以外の病原体の研究にもゲノム解析を用いるようになっており、パンデミック

を経験して良かったことを強いてあげるとすれば、当所に次世代シーケンサーが導入されたことなのかもしれません。

【おわりに】タイトルの「公衆衛生獣医師」を回収しきれずに抄録の最後になってしまいました。私自身の COVID-19 対応の根幹には、獣医学部時代の講義で学んだ微生物学の知識や、感染症学講座で教わった遺伝子学的解析技術の基礎があったのは言うまでもありません。また、公衆衛生獣医師としてこれまで所属してきた食肉衛生検査所、保健所、衛生研究所で培ってきた「人脈」があったからこそ、関係機関と連携した円滑な対応を成し得たと思っています。手に技術を持ち、人脈も有している公衆衛生獣医師は、COVID-19 対応という巨大な歯車を回すにあたっての「潤滑油」として機能していたのかもしれない。

機械学習によるインフルエンザウイルス細胞変性効果自動判定技術の構築

水田克巳, 瀬戸順次, 青木洋子, 佐々木美香, 駒林賢一, 藤原直哉, 昆美也子,
鈴木優子, 大槻りつ子

第 70 回日本ウイルス学会, 2023 年 9 月 26-28 日, 於仙台

【目的】ウイルスを培養する際、培養細胞の細胞変性効果 (CPE) を人の目で見極める必要があるが、CPE の判定には熟練を要する。そこで、本研究では、CPE 判定技術向上の一助とするため、機械学習を用いたインフルエンザウイルス (Flu) CPE 自動判定の仕組みを構築することを目的とした。

【方法】山形県衛生研究所 (山形) で MDCK 細胞を用いて培養した Flu-CPE 画像 399 枚および Flu 未感染 MDCK 細胞画像 (陰性画像) 399 枚を用意し、畳み込みニューラルネットワークの代表的なモデルである ResNet18 のパラメーターを学習した。この学習されたモデルを用い、新たに撮影した Flu-CPE 画像 78 枚 (山形 38 枚, 新潟県保健環境科学研究所[新潟]31 枚, 宮城県保健環境センター[宮城]9 枚) および陰性画像 92 枚 (山形 56 枚, 新潟 31 枚, 宮城 5 枚) の CPE の有無を推論した。

【結果】確率 0.5 以上を CPE と判断した場合、全体の CPE 判定の感度は 98.7% (CPE 画像 78 枚中 77 枚正答)、特異度は 67.4% (陰性画像 92 枚中 62 枚正答) であった。施設別では、山形は感度 97.4%/特異度 87.5%、新潟は感度 100%/特異度 35.5%、宮城は感度 100%/特異度 40.0% であった。新潟と宮城の陰性画像を培養開始 4 日目までと 5 日目以降で分けたところ、4 日目までは特異度 64.7%、5 日目以降は 10.5% であった ($P < 0.01$)。

【考察】機械学習による Flu-CPE の自動判定を試行した結果、3 施設に共通して極めて高い感度が得られた。実際の検査では、CPE 陽性判定後に遺伝子検査等で Flu を検出していることを踏まえると、多少の偽陰性が含まれていたとしても Flu が増殖している可能性のある検体を選別できる点において本仕組みは有用であると考えられた。一方、山形以外の 2 施設で特異度が低くなった点については、培養 5 日目以降の特異度が著しく低下した点を踏まえると、時間経過とともに劣化していく Flu 未感染 MDCK 細胞の像が CPE と誤認されている可能性が考えられた。この点に関しては、人の目で観察した場合でも時間経過に伴って CPE の判定が難しくなることと矛盾しないため、Flu-CPE が観察され始めることが多い時期 (培養開始

後3-4日目頃)に培養細胞の観察や画像撮影を重点的におこなう必要があると考えられた。また、山形の画像を学習させたことにより新潟、宮城の画像で特異度が低下した可能性も考えられたため、現在、これら施設においてもパラメーターの学習や新規画像の推論を実施可能な環境整備を進めているところである。

山形県における菌ゲノム解析を用いた結核患者感染経路推定

瀬戸順次

第70回日本ウイルス学会 ICD 講習会, 2023年9月28日, 於仙台

院内感染事例の追究や市中における感染症の広がりや把握のためには、「いつ・どこで・どのように」感染が広がっていったかを調べるのが重要になります。その際、潜伏期間の短い感染症であれば、人側の情報(院内での患者の動き、患者からの聞き取り情報等)だけで状況を把握できる場合もあるかもしれませんが、しかし、感染から発病まで数か月、長い場合では数十年を要する結核では、多くの感染伝播事例の全容は人側の情報からだけでは解明できません。そこで登場するのが「菌側の情報」であり、結核であれば「結核菌の分子疫学解析結果」が該当します。

分子疫学解析にはいくつかの手法がありますが、最近特に注目されているのが「ゲノム解析」です。その理由として、ゲノム解析は病原体のゲノム全体(結核菌であれば約440万塩基対)を対象に情報を取得するため、極めて高い精度で菌株間の比較を行うことができる点が挙げられます。また、ゲノムの変異蓄積状況を精査することで、病原体が「誰から誰に」伝播したかに関する示唆を得られる点も大きな強みです。

本ICD講習会では、結核患者疫学情報と、結核菌ゲノム解析を中心とした分子疫学解析結果を組み合わせることによる結核の感染経路推定について、具体的事例を交えながら解説することを主眼とします。その中で、一個人あるいは一組織でできることは限られているという前提のもと、関連機関と連携しながら追究を深めていくことの重要性を強調できればと考えます。本講習会が、結核対策の進展のみならず、参加者の先生方の施設における院内感染対策の進展に少しでも役に立つことを願っています。

山形県衛生研究所はPublic Health Laboratoryとして機能しているのか？

水田克巳

第27回日本ワクチン学会, 第64回日本臨床ウイルス学会合同学術集会, 2023年10月21-22日, 於静岡

国立健康危機管理研究機構設立予定の中、地方衛生研究所(地研)は、機構と連携した検査とサーベイランス能力向上が求められている。しかし端的にいえば、パンデミック対策は、地研がPublic Health Laboratory(PHL)

として機能するかどうかにかかっているといえるのではないかと。

山形衛研では、1999年にマイクロプレート法によるウイルス分離を導入し、呼吸器ウイルスの疫学研究を通じて感染症対策・公衆衛生向上に貢献することを目標にしてきた。分離・抗原解析・系統樹解析・血清疫学を組み合わせた2018年までの活動については論文(Jpn J Infect Dis. 2019;72:211-223.)にまとめた。長期疫学研究の必要性、診断法・ワクチン・抗ウイルス薬の開発や基礎研究進歩のための共同研究推進の重要性、にも言及した。

増殖が遅いウイルスは(RT-)PCR法によるスクリーニング後に検体を細胞に接種するTwo-step分離法を、株化細胞による分離が難しい季節性コロナウイルスは気液界面培養を、取り入れるなど分離ウイルスの対象を拡大しつつ、研究資源として分離株や臨床検体を保存・蓄積してきた。実際、長期疫学研究として、分離株を用いて10~20年にわたる系統樹解析や抗原解析を実施するとともに、近年では、1970~2020年台の山形県民の血清を用いた血清疫学調査も実施している。

2008年の山形での観察からは、新しい疾患概念としてパレコウイルスA3型による流行性筋痛症を提唱した。この疾患について、日本から散発例の報告はなされているが、現在でも外国からの報告が無い状況が続いている。2017年の山形における麻疹の流行においては、患者60名のうち50名が3名のスーパースプレッダーからの感染となっていた。その解析結果から、日本のようにワクチン接種率が高く麻疹を排除した社会では、リアルタイムRT-PCR法により咽頭拭い液中のウイルス量が多くスーパースプレッダーとなりうる患者を見出すことで、効率的に流行を終息させることができるのではないかと、という仮説を提唱した。

こうした経験の背景には、地研がPHLとして機能するか否かは、検体を入手した時、単に陽性・陰性の結果を出すだけでなく、感染症コントロールに寄与しうる付加価値をつけられるかどうかにかかっている、という演者の考えがある。

山形衛研では、分離株を国内外の大学・研究機関・民間企業に分与するなど共同研究を実践してきた。具体的な成果は、ヒトメタニューモウイルスの抗原検出キットを世に出したただけである。今後、山形分離株がワクチンや抗ウイルス薬の開発に役立って欲しいと強く願っている。我々は直接的にパンデミック対策の研究を実施しているわけではないが、パンデミック対策は、地研がPHLとして機能することの延長線上にある、と言っては言い過ぎであろうか。

長期にわたるパレコウイルス A1 型の抗原解析と血清疫学

水田克巳，佐々木美香，駒林賢一，池田陽子，青木洋子，板垣勉，
勝島由利子，勝島史夫，松寄葉子

第 27 回日本ワクチン学会，第 64 回日本臨床ウイルス学会合同学術集会，2023 年 10 月 21-22 日，於静岡

【目的】パレコウイルスA1型 (PeVA1) は、1956年に初めて分離報告され (ハリス株)、主に小児の感染性胃腸炎や上気道炎等の原因とされている。我が国の感染症発生動向調査事業によれば、PeVA1はほぼ毎年検出報告がある。2004年山形株を用いた血清疫学調査 (J Med Microbiol. 2020;69:1381-7) の結果から、我々

は“PeVA1の抗原性は長期間安定して保存されているのではないか”という仮説をもち、この仮説を検証するため、以下の実験を行うこととした。

【方法】まず、ハリス株と2021年山形株（Y4785株）で免疫血清を作成し、2001~21年の62株の山形分離株の抗原性を解析、次に1976及び2021年の山形県民血清のハリス株・Y4785株に対する中和抗体価を測定、した。

【結果と考察】ハリス株・Y4785株免疫血清の中和抗体価は、それぞれハリス株・Y4785株に対し1:12800・1:800、1:400・1:102400であり、抗原性の違いがみられたが交差性を認めた。ハリス株・Y4785株免疫血清は、山形分離株に対し、それぞれ1:400~1:6400、1:6400~1:102400、の中和抗体価を示し、ほとんどの株が後者のY4785株免疫血清で4~64倍高く反応していた。ヒト血清については、1976年の血清よりも2021年の血清においてY4785株により高く反応したが、ハリス株も中和した。これらのことから、PeVA1は、大きく抗原性を変えることなく、小児で日常よくみられる感染性胃腸炎や上気道炎を引き起こしながら我々のコミュニティで伝播し、我々と共存してきたことが示唆された。

本研究は、東北乳酸菌研究会の支援を受けて実施された。

自宅浴槽水の不完全入れ替えを原因とするレジオネラ症の一例 —分子疫学の立場から—

的場洋平, 瀬戸順次, 池田辰也, 水田克巳, 遠藤優子, 大内玲奈,
三浦朗子, 伊藤京子, 青木敏也, 藤井俊司

第50回山形県公衆衛生学会, 2024年3月12日, 於山形

【緒言】*Legionella pneumophila* を代表菌種とするレジオネラ症の感染源の解明には、患者検体及び患者周辺の環境から分離された菌株を用いた分子疫学解析が有用とされる。今回、自宅浴槽でのレジオネラ属菌感染が疑われ、分離培養陰性の患者検体から抽出されたDNA（喀痰DNA）を用いた分子疫学解析により感染源を追究した事例について報告する。

【方法】2023年7月にレジオネラ尿中抗原キット（リボテスト®レジオネラ, 極東製薬）陽性によりレジオネラ症の届出がなされた患者の喀痰を用い、既報に基づきレジオネラ属菌の分離培養、レジオネラ属特異的LAMP法（Loopamp®レジオネラ検出試薬キットC, 栄研化学）及び*L. pneumophila* 特異的 nested-PCRによる遺伝子検出を行った。血清群の判別は、喀痰DNAを用い multiplex PCR により行った。喀痰DNAは、ダイレクト sequence-based typing (SBT)法により遺伝子型別した。村山保健所において患者自宅浴槽水から分離した*L. pneumophila* 血清群110株は、パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 及び SBT 法により遺伝子型別した。

【結果】喀痰検査結果は、分離培養陰性、レジオネラ属特異的 LAMP 法陽性、*L. pneumophila* 特異的 nested-PCR 陽性であった。血清群判別 multiplex PCR では、*L. pneumophila* 血清群1遺伝子のみが検出された。喀痰DNAのダイレクト SBT 法結果は、シークエンスタイプ (ST) 3201であった。患者自宅浴槽水分離株10

株は PFGE により 1 バンドずつ異なる 3 群に分類された。それら 3 群を含む 5 株の SBT 法結果も喀痰 DNA と同じ ST3201 であった。国内臨床株との比較の結果、ST3201 は浴槽水と関連性のある患者から分離されることの多いグループ B1 に属した。

【考察】今回、保健所の感染源調査により自宅浴槽におけるレジオネラ属菌感染が疑われた事例を分子疫学的に追究し、患者喀痰 DNA と患者自宅浴槽水分離株から共に ST3201 という浴槽水と関連性がある ST が検出されたことが確認された。このことは、実地疫学調査の妥当性を分子疫学解析が担保したことを意味する。レジオネラ属菌検査におけるゴールドスタンダードは、喀痰等検体からレジオネラ属菌を分離することであるが、必ずしも菌が分離されるとは限らない。そのような中、本事例ではレジオネラ属菌分離陰性であった喀痰 DNA を用いたダイレクト SBT 法により分子疫学的追究が可能であることを示した。喀痰中のレジオネラ属菌 DNA が少量の場合はダイレクト SBT 法の結果が得られないという制約はあるものの、本事例は、今後の保健所等におけるレジオネラ症感染源追究をサポートする新たな分子疫学的方法論を提案している。なお、本事例の詳細は、国立感染症研究所発行の病原微生物検出情報 (IASR) に掲載された (vol.44 No.12 p207-208)。

結核菌ゲノム解析を用いた 2007 年に探知された結核集団感染事例の追究

瀬戸順次, 的場洋平, 池田辰也, 三浦朗子, 藤井俊司, 水田克巳, 山田敬子, 阿彦忠之

第 50 回山形県公衆衛生学会, 2024 年 3 月 12 日, 於山形

【目的】山形県において 2007 年に探知された結核集団感染事例について、患者から分離された結核菌のゲノム解析結果を評価することにより、いつ・どこで・どのように結核が広がっていったかを追究すること。

【方法】山形県で感染症法に基づき実施している結核分子疫学調査により収集された結核菌 926 株 (患者登録時期 2006 年 11 月~2023 年 11 月) について、菌株識別のためのスクリーニング手法である反復配列多型 (VNTR) 分析を実施した。当該集団感染事例の発端患者株と VNTR 分析結果が一致、もしくは 1 領域違いとなった株を選別し、全ての解析法の中で最も高い菌株識別能を有する結核菌ゲノム解析を実施した。ゲノム解析により近縁株 (集団感染事例の関連株) と判定された患者について、疫学調査結果とゲノム解析結果を総合し、集団感染事例の全体像を考察した。

【結果】結核菌 926 株中 45 株 (5%) が VNTR 分析により当該集団感染事例と関連する可能性のある株として選定された。このうち菌が死滅していた 1 株を除いた 44 株のゲノム解析を実施した結果、42 株が近縁株と判定された。ゲノム解析による結核菌の変異蓄積状況を分析したところ、それら 42 株は、発見の遅れがあった発端患者の株を含む 15 株からなるゲノム一致株 (ゲノムクラスター) を起点とする感染伝播の様相を示した。患者登録年は 2006~23 年であり、2006~11 年登録が 29 人 (69%)、2012~23 年登録が 13 人 (31%) であった。発端患者居住地市町村とその周囲の市町村に居住する患者が 42 人中 31 人 (74%) を占めた。また、地域内の特定の遊技施設を利用していた者が 11 人 (26%) 含まれた。

【考察】本研究では、近縁株を確実に選別でき、菌株の変異蓄積状況から感染伝播の方向性や連続性に関

する示唆が得られるゲノム解析を用いて結核集団感染事例を評価した。結果、ゲノムクラスタ1つのみが起点であり、二次感染を示唆する菌株のつながりが観察されなかったことから、本事例は、ゲノムクラスタに含まれた15株の患者、特に発見の遅れがあった発端患者が感染を広げた事例と解釈された。また、事例探知から5年が経過した2012年以降も近縁株患者が散見されていたが、それら患者は集団感染事例探知前後に結核に感染しており、その後、内因性再燃により結核を発病したと考えられた。本研究結果は、一度集団感染事例が発生すると、その後数十年にわたって近縁株患者が発生し続ける可能性を示唆している。そのため、今後集団感染事例が発生した際には、事例のキーワード（本事例であれば特定の遊技施設）を向こう数十年にわたって疫学調査項目に組み込んで調査を続けていく必要があると考えられた。さらには、保健所等実地疫学調査の現場において、集団感染事例を風化させずに、将来にわたって情報を引き継いでいくことが重要と考えられた。

ドクササコ有毒成分同時分析法の調理加工品への応用

石田恵崇，大内仁志，菅敏幸，長岡由香

第119回日本食品衛生学会学術講演会，2023年10月12-13日，於東京

有毒キノコであるドクササコは、その有毒成分としてアクロメリン酸類やクリチジンを含有することが知られている。実際の食中毒事例を想定した場合、検体として搬入されるのは調理加工済みの喫食残品である可能性が高い。そこで本研究では、開発した同時分析法により調理加工品中の有毒成分を検出可能であるか、模擬調理品を作製し検証を行った。

模擬調理品として、代表的なキノコ料理である天ぷら、煮物（筑前煮）、しょう油汁の3種類を作製することとし、書籍に記載された分量および調理法で調理した。これと併行して、ブナシメジをブランク検体に用い、各調理品n=1で調理した。得られた模擬調理品からキノコ子実体および煮汁を選り分けそれぞれ検体とし、アクロメリン酸A・Bおよびクリチジンの定量を行った。

その結果、模擬調理品はいずれの調理法においても3種類全ての成分を検出することができ、分析に影響する妨害ピークは見られなかった。また、煮物およびしょう油汁については煮汁からも全ての成分が検出された。特にしょう油汁は有毒成分の85%以上が汁中へ溶出していることが明らかとなった。今回分析対象としたドクササコの有毒成分はいずれも水溶性が高いことから、煮物や汁物といった水を加える調理法では成分が溶出すると考えられる。このため、キノコ子実体を全く喫食しなかった場合でも汁を全て飲むことで大半の有毒成分を摂取してしまうということが判明した。一方で、この性質を利用すれば、汁物調理品中のドクササコスクリーニングに応用できる可能性がある。実際に可食キノコ中にドクササコを混合した模擬調理品に関して検討を行ったところ、ドクササコの混合割合（重量比）が10%の場合は全ての成分が、1%および0.1%の場合はクリチジンが検出され、汁を測定対象とした迅速スクリーニングが実現可能であると示唆された。

ツキヨタケの発光を利用した簡易判別法

佐藤昌宏, 篠原秀幸, 進藤裕文, 大河原龍馬, 長岡由香

第60回全国衛生化学技術協議会年会, 2023年11月9-10日, 於福島

ツキヨタケは子実体のヒダが生物発光するため、発光の有無で食用キノコとの判別ができると考えられる。そこで、デジタルカメラを用いた露光撮影による発光の可視化に着目した。暗所を作り、カメラのシャッター時間等を調整し、発光画像を撮影する方法であり、撮影機材があれば容易に判別できる。ただし、本法で発光を確認できない場合は、食用キノコと判別されるため、画像解析によりツキヨタケの発光を数値化し、本法による判別性を明らかにすることを目的とした。

山形県内山林の複数地点でツキヨタケを採取した。検体数は171個で、最大径は3.8~20 cmであった。撮影BOXにカメラを設置し、消灯後、発光画像を撮影した。撮影は検体採取後12時間以内に実施した。画像解析ソフトを用いて、撮影した発光画像内の発光領域を特定し、その領域の平均輝度を算出した。検体の傘面積及び最大径は、検体画像を同解析ソフトで解析し、算出した。

全期間で平均輝度はばらつきが大きかった。採取日によって平均輝度の中央値が異なった。また、同日採取した検体でも平均輝度がばらついた。なお、同じ採取地点でもばらつきが大きく、特定の地点のみ平均輝度が小さいとは言えなかった。子実体の大きさと発光に関する関係は見られなかった。

169検体の発光画像に蛍光色を視認でき、その蛍光色の領域は、いずれもヒダにあった。画像解析で平均輝度を算出できたのは169検体であり、いずれも蛍光色を視認できた検体であった。169検体の画像解析ではいずれもヒダに発光領域を特定でき、ノイズの影響はなかった。蛍光色を視認できなかった2検体では、平均輝度を算出できなかった。

発光画像の平均輝度が検体によってばらついていることから、ツキヨタケの個体によって発光に強弱があると考えられる。しかし、発光が比較的弱くとも、今回の撮影条件で99%の高い確率で発光を確認でき、ツキヨタケを判別できた。

有毒キノコ「ドクササコ」の定量分析法開発と調理加工品への適用に関する研究

石田恵崇, 大内仁志, 菅敏幸, 篠原秀幸, 長岡由香

第37回日本中毒学会東日本地方会, 2024年2月3日, 於つくば

ドクササコは、ハツタケ類などの可食キノコと誤認され、たびたび食中毒を引き起こす。主な中毒症状は四肢末端の発赤、腫脹および疼痛で、適切な処置を施さなければ数カ月にわたり症状が続く場合もある。

このほか、特徴的な経過として、誤食から発症まで最大で1週間の無症状期間があること、局所麻酔剤を除くあらゆる鎮痛剤が無効であることなどが知られている。關らは血液吸着療法 (direct hemoperfusion; DHP) が、他の報告に比べ顕著に症状を改善することを見出し、病悩期間の短縮に寄与したと報告している。以上のことから、ドクササコ中毒発生時には迅速な確定診断を行い、適切な治療をいち早く選択・開始することが患者の苦痛軽減に直結すると考える。本研究ではドクササコ中毒発生時に病因物質を特定するための機器分析法を開発し、その実用性を確認することを目的とした。

ドクササコの有毒成分であるアクロメリン酸A、Bおよびクリチジンの3成分について、それぞれキノコ子実体から単離精製を行い、得られた精製物により、LC-MS/MSの測定条件を最適化して、多成分同時分析法を新規開発した。本分析法の精度を確認するため、添加回収試験を実施したところ、回収率、併行精度ともに良好な結果が得られ、定量限界はいずれの成分も0.25 µg/gと推定された。また、ドクササコの模擬調理加工品3種（天ぷら、煮物、しょう油汁）について、本分析法が適用可能であるか検討を行ったところ、全ての調理法において3成分を検出することができ、分析に影響する妨害ピークは見られなかった。以上の結果から、本分析法により未調理品や調理残品を試料として原因キノコを特定可能であると判断した。さらに、汁物調理品において有毒成分の大半が汁中に溶出していることを見だし、この性質を利用して食用キノコ中にドクササコが混入している場合でも迅速なスクリーニングが可能であると明らかにした。

ツブ貝による有症苦情事例検体の理化学検査（第2報）

櫻井千優，石田恵崇，長岡由香

第50回山形県公衆衛生学会，2024年3月4日，於山形，（誌上发表）

エゾバイ科エゾボラ属およびエゾバイ属の巻貝の多くは、唾液腺に有毒成分テトラミンを有しており、その一部はツブ貝として食用にされている。本研究では、令和3年に山形県内で起きた有症事例検体のドリップ液の分析および貝類のマトリックス存在下でのテトラミンの熱安定性についての検討をおこなった。

ドリップ液の分析では令和3年の有症事例検体を解凍し、得られたドリップ液を検体とした。煮汁中のテトラミンの熱安定性確認では、黒バイ貝を用いて既存の調理法の分量で煮汁を作製し、その煮汁にテトラミンを添加後、再度約100℃で10分、20分、30分間加熱したものと、加熱しないもの（各n=3）をそれぞれ検体とした。検体はそれぞれ不溶物を除去後、分析に供した。

ドリップ液の分析の結果、テトラミンが検出された。テトラミンは水溶性の化合物であることから、凍結および解凍により細胞が破壊され、細胞中の水分とともに溶出したと推定した。このことから、ドリップ液の分析でもテトラミン中毒を推定可能であると考えた。また、煮汁中のテトラミンの熱安定性を確認した結果、煮汁中のテトラミンの濃度は加熱時間によらずほぼ一定であった。このことから、テトラミンは貝類のマトリックス存在下でも加熱による影響を受けず、安定であることが示唆された。

LC-MS/MSによるフグ毒分析法の確立

太田康介, 真田拓生, 櫻井千優, 酒井真紀子, 長岡由香

第50回山形県公衆衛生学会, 2023年3月4日, 於山形

フグには猛毒のテトロドトキシン (TTX) が含有されることが知られている。厚生労働省は有毒物質の程度により人の健康を損なう恐れのない部位をフグの種類 (漁獲海域) ごとに定めているにも関わらず, フグによる食中毒は毎年報告されている。山形県内においても直近10年間で2件の報告があることから, 今後の食中毒発生等に備えて液体クロマトグラフ・タンデム質量分析計 (LC-MS/MS) によるTTX分析法を検討した。TTX分析法について添加回収試験, 試験法の妥当性評価の結果から, 十分な分析性能を有することを確認した。

アナライトプロテクタントを用いた食品中の残留農薬試験法の妥当性評価

渡辺知也, 酒井真紀子, 和田章伸, 石田恵崇, 篠原秀幸,
渡部淳, 佐藤昌宏, 櫻井千優, 伊東ゆき菜, 長岡由香

第50回山形県公衆衛生学会, 2024年3月4日, 於山形

食品中の残留農薬分析においては, 検液中の夾雑物 (マトリックス) により, 農薬成分が同濃度であっても, 溶媒のみで調製した標準液 (Solv.標準液) とマトリックスを含む標準液 (Mtx.標準液) とではピークレスポンスが異なる場合がある。当所ではこの問題に対し, 分析対象農薬が検出されないことを確認した食品の抽出液を使用してMtx.標準液を調製している (従来法) が, 抽出液作製に多大なコスト, 時間を要している。そのため, 省コスト, 省力化を目的として, 疑似的なマトリックスであるアナライトプロテクタント (AP) を抽出液の代わりに添加する方法を検討した。

試験対象項目は, 従来法で妥当性を確認したアセフェート及びメタミドホスとした。これらが検出されないことを確認した「なす」を試料として, 基準値添加, 10併行, 1日の添加回収試験により妥当性を評価した。APはポリエチレングリコール300を使用し, 標準液に添加したものをAP標準液とした。試料の前処理は当所の標準作業手順書に従った。得られた検液は, GC-FPDを用いて測定した。

AP標準液を用いて検量線を作製したところ, アセフェート, メタミドホスともに直線性は良好であり, Solv.標準液と比較してピーク形状の改善と面積値の増加が見られた。また, 面積値がMtx.標準液と同程度であったことから, AP標準液の定量精度について検討した。妥当性評価試験の結果, アセフェート, メタミドホスともに評価基準を満たしており, 本法の妥当性を確認できた。

AP液の使用により，検査1回当たり約7000円の省コスト効果があることが判明した．一方，作業時間は，抽出液調製に5～6時間程度かかるのに対し，AP液の調製は1～2時間程度で調製可能であるため，作業を省力化できる．