Ⅰ　調　査　研　究　報　告

短　報

インフルエンザウイルスと SARS-CoV-2 の fast リアルタイム逆転写 PCR 検出系の妥当性評価

駒林賢一，佐々木美香，瀬戸順次，池田陽子，青木洋子，水田克巳

Validation of the fast real-time reverse transcription PCR detection system for influenza virus and SARS-CoV-2

Kenichi KOMABAYASHI，Mika SASAKI，Junji SETO，Yoko IKEDA，Yoko AOKI，and Katsumi MIZUTA

地方衛生研究所におけるウイルス感染症病原体の検出にはリアルタイム逆転写（RT）PCR 法を用いることが多い．本研究ではインフルエンザウイルスおよび重症急性呼吸器症候群コロナウイルス 2（SARS-CoV-2）それぞれの遺伝子検出系について，国立感染症研究所の病原体検出マニュアルに記載された標準法と，fast リアルタイム RT-PCR 法（改良法）の比較を行った．インフルエンザウイルスの 8 つおよび SARS-CoV-2 の 2 つの検出系について，陽性コントロール希釈系列を標準法及び改良法で測定し，反応系の PCR 効率および検出感度を決定した．改良法では総反応時間 53 分の熱反応条件を両ウイルスともに用いた．改良法の検出感度は標準法に比べ概ね同等以上であった．改良法は定量を伴わない病原ウイルスのスクリーニング検査には有用であり，インフルエンザウイルスおよび SARS-CoV-2 の検査を短時間かつ同一プレート上で実施できるため，検査に要する時間とコストが低減できる可能性がある．

キーワード：fast リアルタイム RT-PCR 法，インフルエンザウイルス，新型コロナウイルス，コスト削減

Ⅰ　はじめに

地方衛生研究所は感染症が発生した際に起因病原体を同定する役割を担っており，正確な検査結果を迅速に提供することが求められる[1)]．ウイルス感染症の場合は遺伝子検査が一般的に用いられ，特に TaqMan プローブを用いたリアルタイム逆転写（RT）PCR 法が主流となっている．現在国立感染症研究所によって示されているウイルスの病原体検出マニュアルでは，スタンダードモードでのリアルタイム RT-PCR 法が標準法として記載されている場合が多く，測定完了までに 1.5～2.5 時間程度を要する．加えて，ウイルス毎に反応液の総量や PCR の温度条件が異なることもあり，複数種のウイルスの検査を並行実施する場合には多くの物的，時間的，人的コストが必要となる．病原体検出マニュアルに記載の方法とは異なる試薬・機器・反応条件を用いる場合は，その使用の妥当性を確認することとなっており，検査方法を改良してコストを抑えることができれば，地方衛生研究所の健康危機管理体制の強化に資することができると考えられる．

本研究では，fast リアルタイム RT-PCR 法の熱反応条件を統一した上で，インフルエンザウイルスと重症急性呼吸器症候群コロナウイルス 2（SARS-CoV-2）検出系のそれぞれの妥当性を評価することで，迅速かつ効率的な遺伝子検出系を構築することを目的とした．

表１　プライマー・プローブ一覧

ターゲット	検出系	オリゴ名	塩基配列	最終濃度（μM）
A型共通M遺伝子[1) 2)]	FluA	MP-39-67For	5'-CCMAGGTCGAAACGTAYGTTCTCTCTATC	0.6
		MP-183-153Rev	5'-TGACAGRATYGGTCTTGTCTTTAGCCAYTCCA	0.6
		MP-96-75ProbeAs	5'-(FAM)ATYTCGGCTTTGAGGGGGCCTG(MGB)	0.1
A型 H1pdm09亜型HA遺伝子[1)]	H1	NIID-swH1 TMPrimer-F1	5'-AGAAAAGAATGTAACAGTAACACACTCTGT	0.6
		NIID-swH1 TMPrimer-R1	5'-TGTTTCCACAATGTARGACCAT	0.6
		NIID-swH1 Probe2	5'-(FAM)CAGCCAGCAATRTTRCATTTACC(MGB)	0.1
A型 H3亜型HA遺伝子[1)]	H3	NIID-H3 TMPrimer-F1	5'-CTATTGGACAATAGTAAAACCGGGRGA	0.6
		NIID-H3 TMPrimer-R1	5'-GTCATTGGGRATGCTTCCATTTGG	0.6
		NIID-H3 Probe1	5'-(FAM)AAGTAACCCCKAGGAGCAATTAG(MGB)	0.1
B型共通NS遺伝子[1)]	FluB	NIID-Type B TMPrimer-F1	5'-GGAGCAACCAATGCCAC	0.6
		NIID-Type B TMPrimer-R1	5'-GTKTAGGCGGTCTTGACCAG	0.6
		NIID-Type B Probe2	5'-(VIC)ATAAACTTYGAAGCAGGAAT(MGB)	0.1
B型ビクトリア系統HA遺伝子[1)]	BVi	Type B HA F3vic v2	5'-CCTGTTACATCTGGGTGCTTTCCTATAATG	0.6
		Type B HA R3vic v2	5'-GTTGATARCCTGATATGTTCGTATCCTCKG	0.6
		FAM-Type B HA Victoria	5'-(FAM)TTAGACAGCTGCCTAACC(MGB)	0.1
B型山形系統HA遺伝子[1)]	BYa	Type B HA F3yam v2	5'-CCTGTTACATCCGGGTGCTTYCCTATAATG	0.6
		Type B HA R3yam v2	5'-GTTGATAACCTKATMTTTTCATATCCTCTG	0.6
		FAM-Type B HA Yamagata2	5'-(FAM)TCAGRCAACTACCCAATC(MGB)	0.1
A型H7亜型HA遺伝子[2)]	H7	NIID-H7 TMPrimer-F1	5'-TGTGATGAYGAYTGYATGGCCAG	0.6
		NIID-H7 TMPrimer-R1	5'-ACATGATGCCCCGAAGCTAAAC	0.6
		NIID-H7 Probe1	5'-(FAM)ATCTGTATTCTATTTTGCATTGCYTC(MGB)	0.1
A型H5亜型HA遺伝子[2)]	H5	H5HA-205-227v2-For	5'-CGATCTAGAYGGGGTGAARCCTC	0.6
		H5HA-326-302v2-Rev	5'-CCTTCTCCACTATGTANGACCATTC	0.6
		H5HA-205-227-For(2010)	5'-CGATCTAAATGGAGTGAAGCCTC	0.15
		H5HA-326-302-Rev(2010)	5'-CCTTCTCTACTATGTAAGACCATTC	0.15
		H5-Probe-239-RVa	5'-(FAM)AGCCAYCCAGCTACRCTACA(MGB)	0.075
		H5-Probe-239-RVb	5'-(FAM)AGCCATCCCGCAACACTACA(MGB)	0.025
N遺伝子[3)]	N2	NIID_2019-nCOV_N_F2	5'-AAATTTTGGGGACCAGGAAC	0.5
		NIID_2019-nCOV_N_R2	5'-TGGCAGCTGTGTAGGTCAAC	0.7
		NIID_2019-nCOV_N_P2	5'-(FAM)-ATGTCGCGCATTGGCATGGA-(TAMRA)	0.2
S遺伝子[3)]	S2	SARS-CoV-2_NIID_S_F1	5'-CAGTCAGCACCTCATGGTGTA	0.4
		SARS-CoV-2_NIID_S_R3	5'-AACCAGTGTGTGCCATTTGA	0.7
		SARS-CoV-2_NIID_S_P2	5'-(ABY)-TGCTCCTGCCATTTGTCATGATGG-(QSY)	0.2

1)：季節性インフルエンザウイルス，2)：鳥インフルエンザウイルス，3)：SARS-CoV-2

Ⅱ　材料と方法

1　リアルタイム RT-PCR 法

Quantitect probe RT-PCR kit（QIAGEN）を用いたスタンダートリアルタイム RT-PCR 法（以下，Q 法）と，TaqMan fast virus 1-step Master Mix（Thermofisher Scientific）を用いた fast リアルタイム RT-PCR 法（以下，T 法）を用意した．Q 法は，国立感染症研究所が示した病原体検出マニュアル（インフルエンザ診断マニュアル第 4 版[2)]，高病原性鳥インフルエンザ（H5N1）診断マニュアル第 3 版[3)]，鳥インフルエンザ A(H7N9)

ウイルス検出マニュアル第 2 版[4]，病原体検出マニュアル 2019-nCoV Ver.2.9.1[5]，「感染研・地衛研専用」SARS-CoV-2 遺伝子検出・ウイルス分離マニュアル Ver.1.1[6]）に従い実施した．検出ターゲット毎のプライマー・プローブと最終濃度を表 1 に示す．T 法は富山県衛生研究所による先行研究[7]を参考に反応液組成と反応条件を設定した．T 法ではプライマーとプローブを Q 法と同じ最終濃度で用いた．Q 法と T 法の反応液組成を図 1 に示す．Q 法の反応液の総量は，インフルエンザウイルスと SARS-CoV-2 でそれぞれ，25μL，20μL であるのに対し，T 法の反応液の総量は全て 20μL とした．全ての反応系において 5μL の陽性コントロール RNA をテンプレートとして用い測定を行った．熱反応条件は，Q 法は 50℃30 分；95℃15 分；95℃15 秒と 56℃75 秒（SARS-CoV-2 は 60℃60 秒）を 45 サイクル（総反応時間 137–147 分 ），T 法は 50℃5 分；95℃20 秒；95℃5 秒と 60℃35 秒を 45 サイクル（総反応時間 53 分），とした．Q 法，T 法での測定はそれぞれ Quant Studio 3 （Thermofisher Scientific），Quant Studio 5 （Thermofisher Scientific）を使用した．

陽性コントロール RNA は季節性インフルエンザウイルス，鳥インフルエンザウイルス，SARS-CoV-2 の各検出系においてそれぞれ 4，2，および 2 種類を用意した（表 2）．

季節性インフルエンザウイルスは MDCK 細胞でウイルスを培養し，培養上清から抽出した RNA を陽性コントロール RNA とした．抽出した RNA の濃度は T 法で Threshold が 0.1 における Cycle threshold（Ct）値を測定して調整した．A 型 2 種，B 型 2 種それぞれ，FluA 検出系の Ct 値が 20 前後，FluB 検出系の Ct 値が 23 前後となるように濃度を調整し，原液とした．

鳥インフルエンザウイルスの陽性コントロール RNA は，国立感染症研究所が配布した添書に従い溶解し，原液とした．

SARS-CoV-2 の陽性コントロール RNA は，1×10^5 コピー/μL を原液とした．

3　Fast リアルタイム RT-PCR 法の妥当性評価

Q 法と T 法の性能を比較するため，同一の陽性コントロール RNA を両法で測定した．

全 8 種の陽性コントロール RNA について，10 倍階段希釈により 8 段階（鳥インフルエンザウイルス A 型

表 2　用いた陽性コントロール RNA

2　陽性コントロール RNA

本稿での略称	ウイルスの種類	RNA 由来
AH1-RNA	A 型 H1pdm 亜型[1)]	2019-2224　MDCK2 代目分離株抽出 RNA
AH3-RNA	A 型 H3 亜型[1)]	2019-0170　MDCK2 代目分離株抽出 RNA
BYa-RNA	B 型山形系統[1)]	2018-0110　MDCK2 代目分離株抽出 RNA
BVi-RNA	B 型ビクトリア系統[1)]	2020-0098　MDCK2 代目分離株抽出 RNA
AH5-RNA	A 型 H5 亜型[2)]	国立感染症研究所配布，合成 RNA（FluA と AH5 の配列を含む）
AH7-RNA	A 型 H7 亜型[2)]	国立感染症研究所配布，合成 RNA（FluA と AH7 の配列を含む）
N2-RNA	SARS-CoV-2	国立感染症研究所配布，合成 RNA
S2-RNA	SARS-CoV-2	国立感染症研究所配布，合成 RNA

1)：季節性インフルエンザウイルス，2)：鳥インフルエンザウイルス

インフルエンザウイルス（Type A、H1、H3、TypeB、BY、BV、H7）

	Q法[1]	T法[2]
Master mix	12.5	5.0
Primer Forward（10μM）[3]	1.5	1.2
Primer Reverse （10μM）[3]	1.5	1.2
Probe （5μM）[3]	0.5	0.4
RT mix	0.25	—
RNase inhibitor（20U/μL）	0.1	—
Nuclease free water	3.65	7.2
Template RNA	5.0	5.0
Total	25.0	20.0

インフルエンザウイルス（H5）

	Q法	T法
Master mix	12.5	5.0
H5HA-205-227v2-F[4]	1.5	1.2
H5HA-205-227-For(2010) [4]	0.375	0.3
H5HA-326-302v2-R [4]	1.5	1.2
H5HA-326-302Rev(2010) [4]	0.375	0.3
H5-Probe-239-RVa [4]	0.375	0.3
H5-Probe-239-RVb [4]	0.125	0.1
RT mix	0.25	—
RNase inhibitor（20U/μL）	0.1	—
Nuclease free water	2.9	6.6
Template RNA	5.0	5.0
Total	25.0	20.0

SARS-CoV-2（N2）

	Q法	T法
Master mix	10.0	5.0
Primer Forward（10μM）[5]	1.0	1.0
Primer Reverse （10μM）[5]	1.4	1.4
Probe （5μM）[5]	0.8	0.8
RT mix	0.2	—
Nuclease free water	1.6	6.8
Template RNA	5.0	5.0
Total	20.0	20.0

SARS-CoV-2（S2）

	Q法	T法
Master mix	10.0	5.0
Primer Forward（100μM）[6]	0.08	0.08
Primer Reverse （100μM）[6]	0.14	0.14
Probe （100μM）[6]	0.04	0.04
Nuclease free water [6]	0.74	0.74
RT mix	0.2	—
Nuclease free water	3.8	9.0
Template RNA	5.0	5.0
Total	20.0	20.0

図１　反応液　１ウェルあたりの組成（μL）

1)：Quantitect probe RT-PCR kit を使用したスタンダードリアルタイム逆転写 PCR 法
2)：TaqMan fast virus 1-step Master Mix を使用した fast リアルタイム逆転写 PCR 法
3)，4)，5)，6)：それぞれあらかじめ混合して，Primer Probe Mix として用意し，反応液の調製時に使用した．

H5 亜型および A 型 H7 亜型は 7 段階）の希釈を用意し，1 濃度につき 3 ウェル（検出が確実な低希釈域の場合）または 6 ウェル（検出限界濃度付近の高希釈域の場合）を測定した．測定結果は Q 法，T 法それぞれ Threshold が 0.01，0.1 における Ct 値を取得した．測定結果から検量線を作成して傾きを求め，反応効率の指標とした．また，6 ウェル全てが検出できた陽性コントロール RNA の希釈のうち最も低い濃度を求め，検出限界濃度とした．

Ⅲ　結果

1　季節性インフルエンザウイルスの検出系の比較

図 2A および 2B に季節性インフルエンザウイルスの検出系の測定結果を示す．一般的に PCR 反応効率は 90～110%が理想的な範囲とされ，検量線の傾きでは-3.10～-3.58 に相当する [8]．16 個の検量線のうち，11 個では検量線の傾きが理想的な範囲にあった（図 2A，B）．AH1-RNA を用いた T 法の FluA 検出系は検量線の傾きが理想的な範囲を逸脱した．H1 検出系および BVi 検出系の傾きも逸脱したが，Q 法より T 法の方が理想値に近い値を示した．相関係数は全ての検出系において 0.99 以上であった．検出限界は H3 検出系および BVi 検出系において T 法の方が低濃度を示し，他の検出系は同等であった．

2　鳥インフルエンザウイルスの検出系の比較

図 2C に鳥インフルエンザウイルスの検出系の測定結果を示す．8 個の検量線のうち，7 個では検量線の傾きが理想的な範囲にあった（図 2C）．AH7-RNA を用いた T 法の FluA 検出系は検量線の傾きが理想的な範囲を逸脱した．相関係数は全ての検出系において 0.99 以上であった．検出限界は AH5-RNA を用いた

図2A

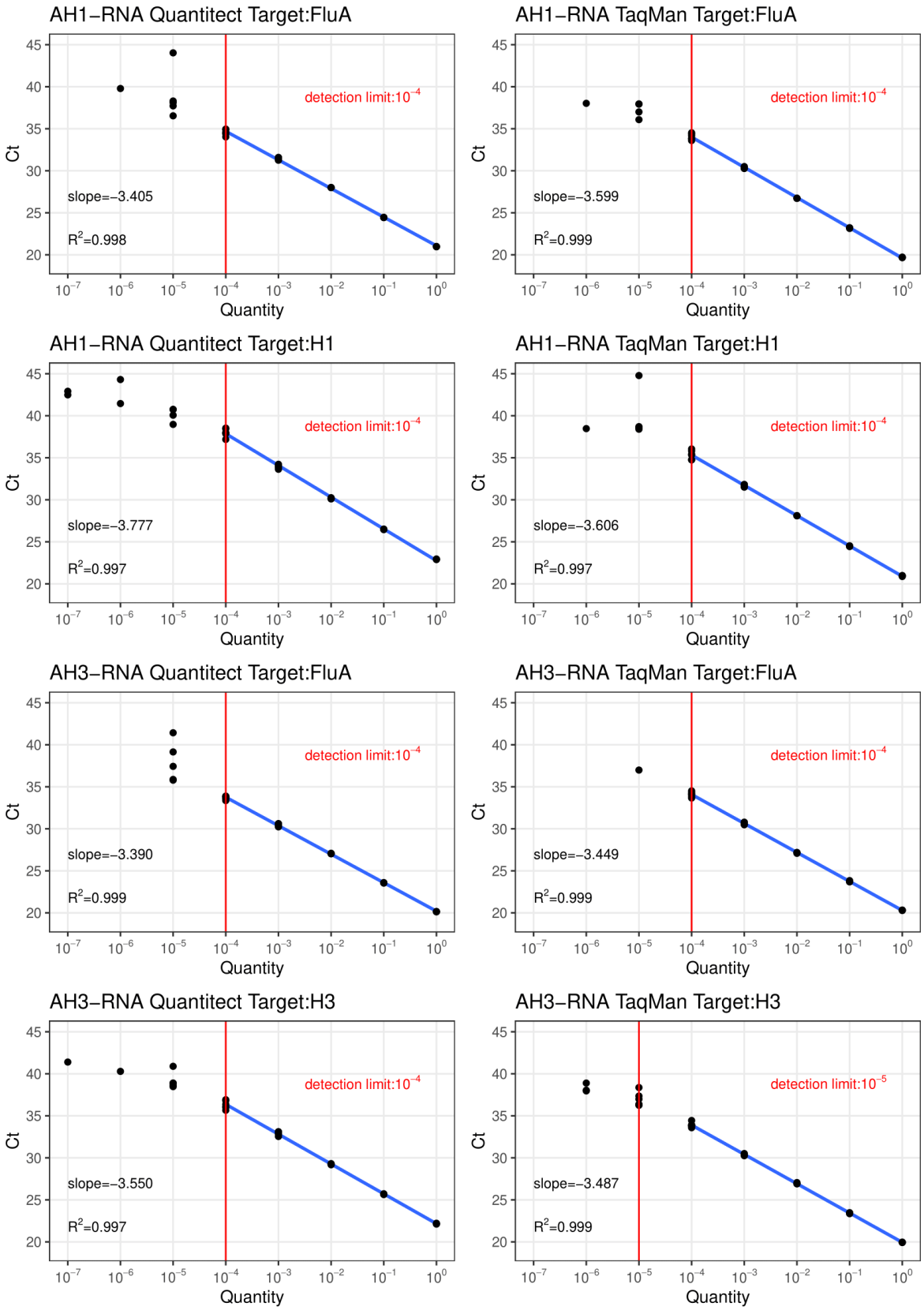
AH1−RNA Quantitect Target:FluA
slope=−3.405
R²=0.998
detection limit:10⁻⁴
AH1−RNA TaqMan Target:FluA
slope=−3.599
R²=0.999
detection limit:10⁻⁴
AH1−RNA Quantitect Target:H1
slope=−3.777
R²=0.997
detection limit:10⁻⁴
AH1−RNA TaqMan Target:H1
slope=−3.606
R²=0.997
detection limit:10⁻⁴
AH3−RNA Quantitect Target:FluA
slope=−3.390
R²=0.999
detection limit:10⁻⁴
AH3−RNA TaqMan Target:FluA
slope=−3.449
R²=0.999
detection limit:10⁻⁴
AH3−RNA Quantitect Target:H3
slope=−3.550
R²=0.997
detection limit:10⁻⁴
AH3−RNA TaqMan Target:H3
slope=−3.487
R²=0.999
detection limit:10⁻⁵
Ct
Quantity

図2B

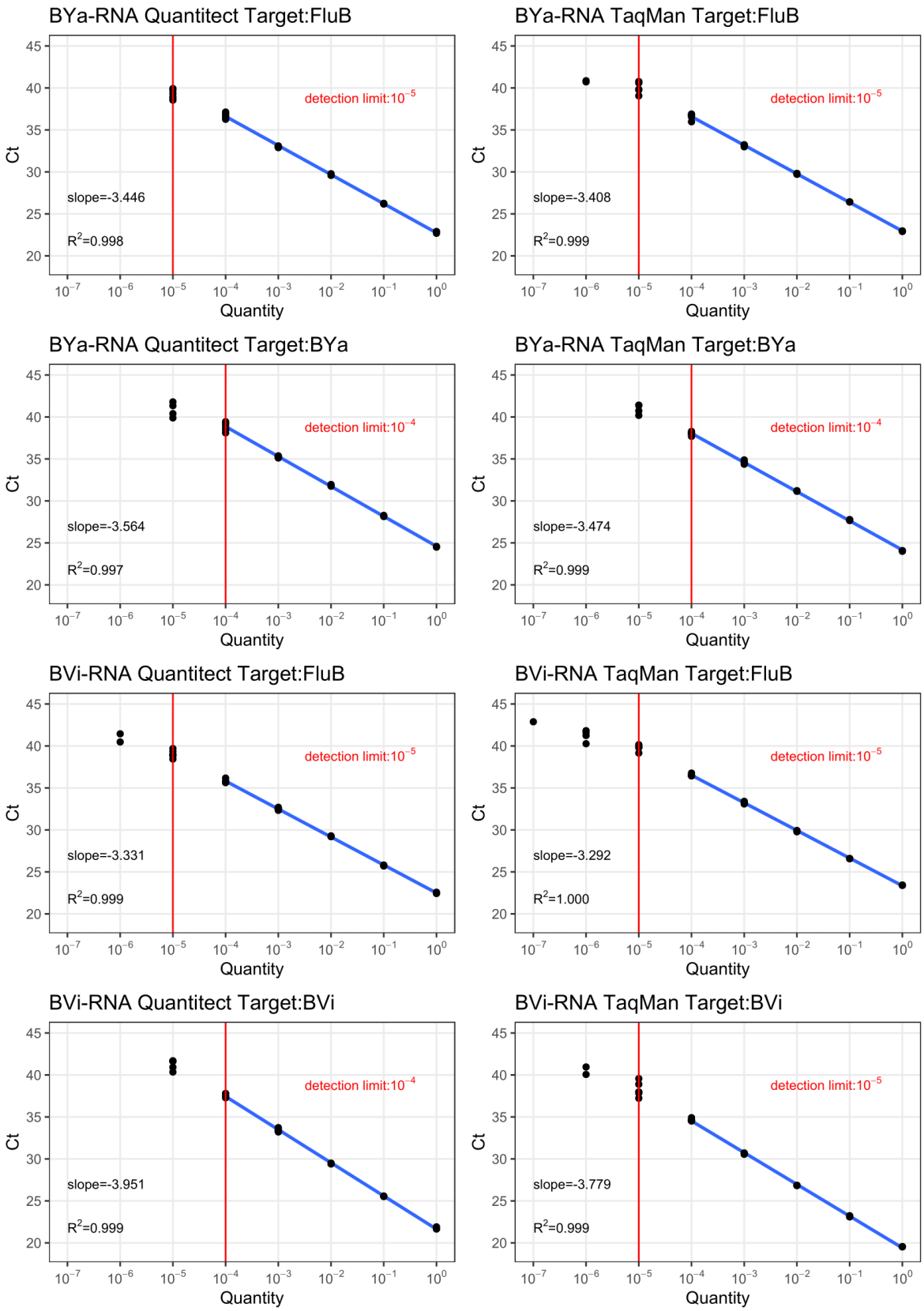
BYa-RNA Quantitect Target:FluB
detection limit:10^-5
slope=-3.446
R^2=0.998
BYa-RNA TaqMan Target:FluB
detection limit:10^-5
slope=-3.408
R^2=0.999
BYa-RNA Quantitect Target:BYa
detection limit:10^-4
slope=-3.564
R^2=0.997
BYa-RNA TaqMan Target:BYa
detection limit:10^-4
slope=-3.474
R^2=0.999
BVi-RNA Quantitect Target:FluB
detection limit:10^-5
slope=-3.331
R^2=0.999
BVi-RNA TaqMan Target:FluB
detection limit:10^-5
slope=-3.292
R^2=1.000
BVi-RNA Quantitect Target:BVi
detection limit:10^-4
slope=-3.951
R^2=0.999
BVi-RNA TaqMan Target:BVi
detection limit:10^-5
slope=-3.779
R^2=0.999
Ct
Quantity

図2C

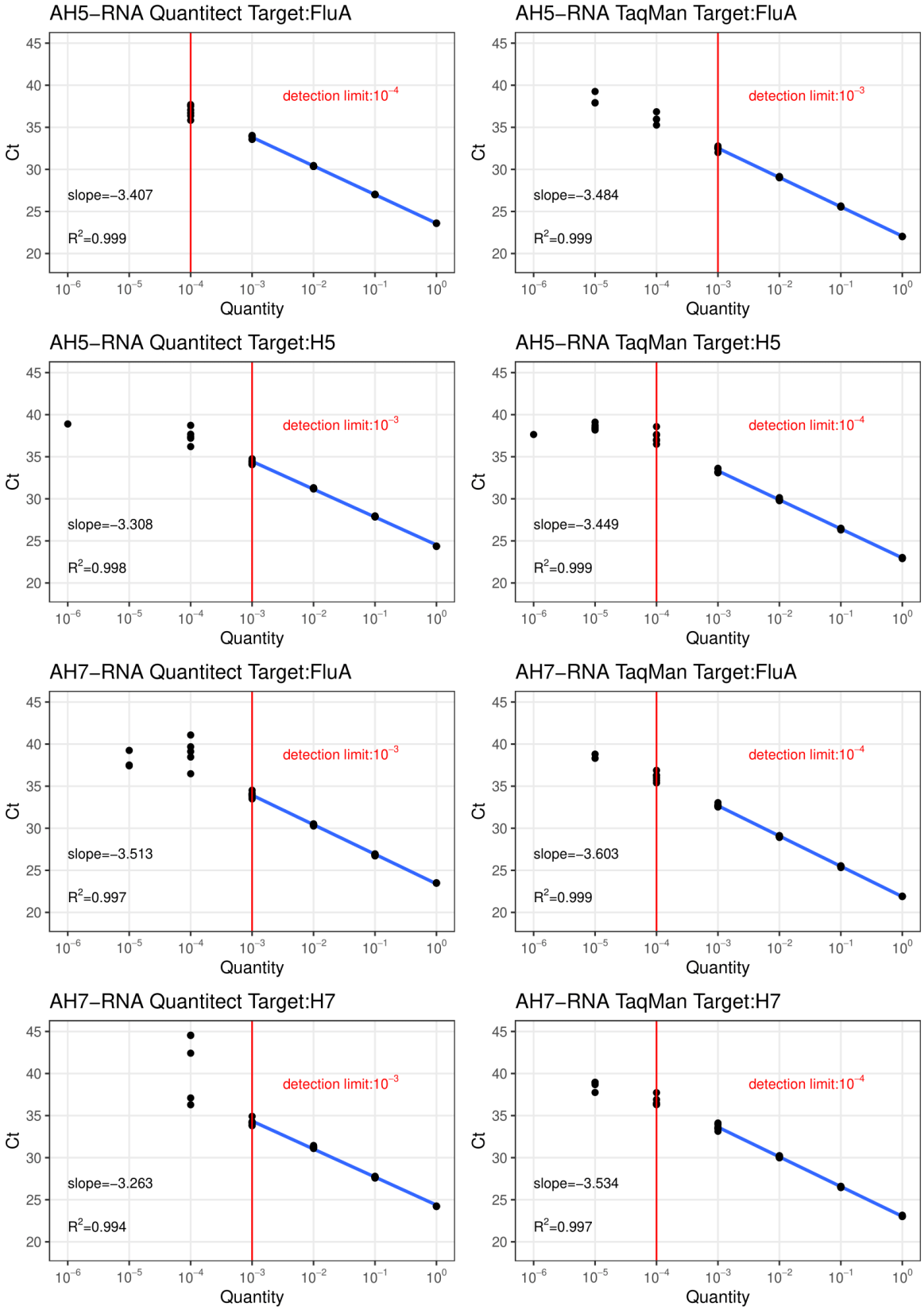
AH5−RNA Quantitect Target:FluA
detection limit:10−4
slope=−3.407
R2=0.999
AH5−RNA TaqMan Target:FluA
detection limit:10−3
slope=−3.484
R2=0.999
AH5−RNA Quantitect Target:H5
detection limit:10−3
slope=−3.308
R2=0.998
AH5−RNA TaqMan Target:H5
detection limit:10−4
slope=−3.449
R2=0.999
AH7−RNA Quantitect Target:FluA
detection limit:10−3
slope=−3.513
R2=0.997
AH7−RNA TaqMan Target:FluA
detection limit:10−4
slope=−3.603
R2=0.999
AH7−RNA Quantitect Target:H7
detection limit:10−3
slope=−3.263
R2=0.994
AH7−RNA TaqMan Target:H7
detection limit:10−4
slope=−3.534
R2=0.997
Ct
Quantity

図2D

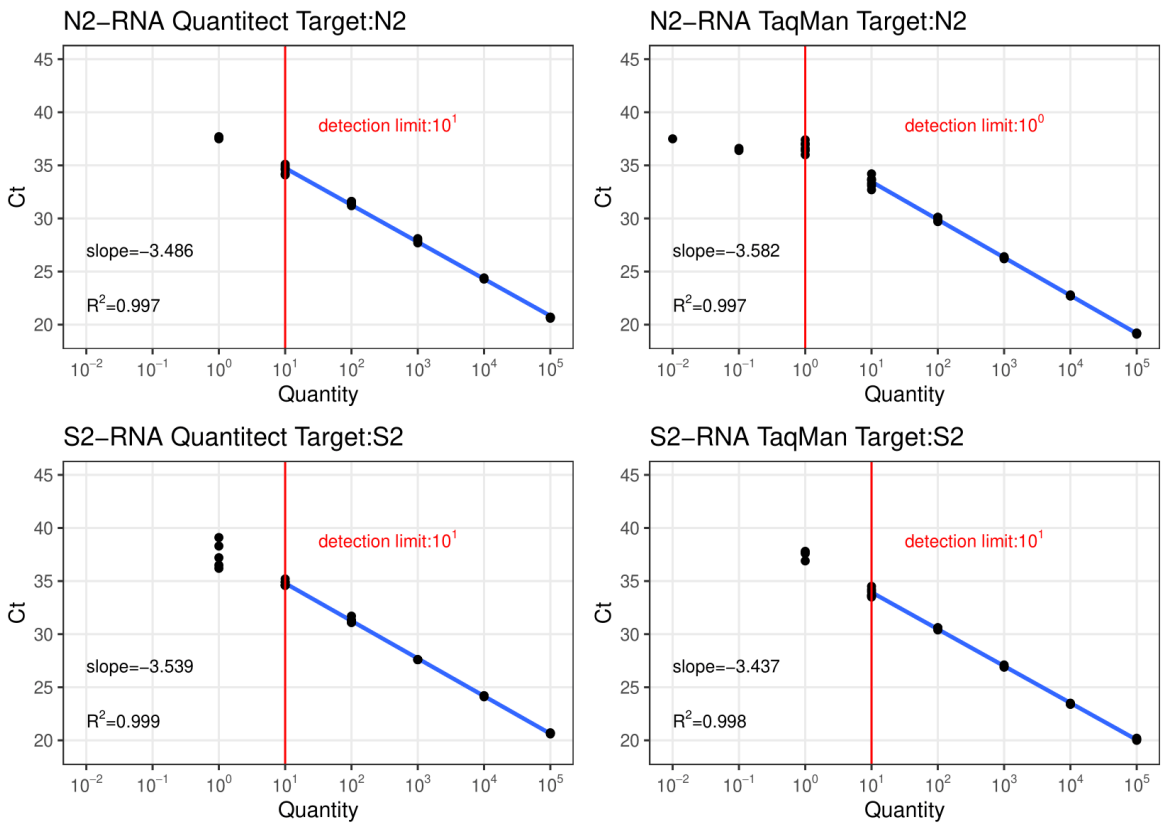

図２　２つのリアルタイム RT-PCR 法による陽性コントロール RNA 希釈系列の測定結果

縦軸は Ct 値，横軸は RNA の量を表す．黒丸のプロットが検出結果，青の直線は検量線を表す．赤の縦線と赤文字の detection limit は検出限界の RNA 量を示す．いずれも検出限界以上の濃度かつバラつきが少ない範囲の結果を用いて検量線を作成した．A：季節性インフルエンザウイルス A 型のゲノム RNA である AH1-RNA，AH3-RNA を用いて，10^{0}～10^{-7}倍の 8 段階の希釈系列を測定し，10^{0}～10^{-4}倍の希釈系列の測定結果を用いて検量線を作成した．B：季節性インフルエンザウイルス B 型のゲノム RNA である BYa-RNA，BVi-RNA を用いて，10^{0}～10^{-7}倍の 8 段階の希釈系列を測定し，10^{0}～10^{-4}倍の希釈系列の測定結果を用いて検量線を作成した．C：鳥インフルエンザウイルス A 型の陽性コントロール RNA である AH5-RNA，AH7-RNA を用いて 10^{0}～10^{-6}倍の 7 段階の希釈系列を測定し，10^{0}～10^{-3}倍の希釈系列の測定結果を用いて検量線を作成した．D：SARS-CoV-2 の陽性コントロール RNA である N2-RNA，S2-RNA を用いて 10^{5}～10^{-2} copy/μL の 8 段階の希釈系列を測定し，10^{5}～10^{1} copy/μL の希釈系列の測定結果を用いて検量線を作成した．slope：傾き，R^{2}：相関係数，detection limit：検出限界．

FluA 検出系では Q 法の方が低濃度を示し，AH5-RNA を用いた H5 検出系，AH7-RNA を用いた FluA および H7 検出系では T 法の方が低濃度を示した．

3　SARS-CoV-2 の検出系の比較

図 2D に SARS-CoV-2 の検出系の測定結果を示す．4 個の検量線のうち，3 個 では検量線の傾きが理想的な範囲にあった（図 2D）．T 法の N2 検出系は検量線の傾きが理想的な範囲を逸脱した．相関係数は全ての検出系において 0.99 以上であった．検出限界は N2 検出系において T 法の方が低濃度であり，S2 検出系は同等であった．

Ⅳ　考察

本研究ではインフルエンザウイルスと SARS-CoV-2 それぞれの遺伝子検査において，従来法である Q 法と fast リアルタイム RT-PCR 法である T 法との比較を行った．53 分で検査結果を得られる T 法において検量

線の傾きが理想値を逸脱するものが Q 法よりも多かったが，T 法の検出感度の多くは Q 法と同等あるいはそれ以上であることが示された．

T 法のインフルエンザウイルスおよび SARS-CoV-2 の検出感度は Q 法より優れている可能性がある．検出感度が良い検査系の方がより少ない量の病原体を検出できるため，病原体のスクリーニング検査において有用と考えられる．ただし，鳥インフルエンザ A 型 H5 亜型でウイルス量が少ない検体の場合，FluA 検出感度の低さから，H5 検出系だけが陽性となり，再検査となるケースが生じる可能性がある．

T 法を用いたインフルエンザウイルスおよび SARS-CoV-2 検出系の一部は Q 法より定量性が劣っている可能性がある．季節性および鳥インフルエンザウイルス検出系において，Q 法に比べて T 法では反応液量が 5μL 少ないこと，および PCR のアニーリング温度が 4℃高いこと，の 2 点が PCR の反応効率を下げ，検量線の傾きが理想的範囲を逸脱した要因であった可能性が考えられる．そのため T 法を用いた FluA，H1，BVi，N2 検出系についてはスクリーニング検査のために用いられるべきなのかもしれない．

本研究により，インフルエンザウイルスと SARS-CoV-2 の遺伝子検出系を単一 PCR プレート上で検査できることが示された．2022/23 シーズンのようなインフルエンザと COVID-19 の同時流行時に T 法は有用と考えられる．また，国内で鳥インフルエンザ H5N1 が発生した際に，必要に応じて同一プレートに鳥インフルエンザ用の反応液を追加可能な点においても T 法は有用性が高いと考えられる．

本研究では 2 つの限界がある．1 つは，インフルエンザウイルスの陽性コントロール RNA はコピー数が不明なことである．1 反応あたり数コピー程度の RNA が検出限界であることが多いが，本研究における検出限界のコピー数は不明である．2 つ目は，Q 法，T 法それぞれ Quant Studio 3，Quant Studio 5 を使用したことである．陽性コントロール RNA の希釈後の時間経過による劣化を避ける目的で 2 台の機器を用いて測定を行った．

結論として，TaqMan Fast virus 1-step master mix を用いた fast リアルタイム RT-PCR 法によるインフルエンザウイルスおよび SARS-CoV-2 の遺伝子検出系は，定量を伴わない病原ウイルスのスクリーニング検査を実施する上では有用であり，両ウイルスの検査を 53 分で，かつ同一プレート上で実施できるため，検査に要する時間とコストを低減できる可能性がある．

Ⅴ 謝辞

本研究を実施するにあたり，fast リアルタイム RT-PCR 法について情報提供をしていただいた愛知県衛生研究所の安達啓一先生，妥当性評価の方法についてアドバイスをいただいた国立感染症研究所の竹前喜洋先生に深く御礼を申し上げます．

Ⅵ 文献

1) 厚生労働省健康局長，「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律等の一部を改正する法律」の一部の施行について（通知），健発 0327 第 11 号 令和 5 年 3 月 27 日

2) 国立感染症研究所，インフルエンザ診断マニュアル第 4 版 <http://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/influenza20190116.pdf>， 2023 年 7 月 14 日アクセス

3) 国立感染症研究所，高病原性鳥インフルエンザ（H5N1）診断マニュアル第 3 版 <https://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/avian_influenza_2003.pdf>，2023 年 7 月 14 日アクセス

4) 国立感染症研究所，鳥インフルエンザ A(H7N9)ウイルス検出マニュアル第 2 版 <https://www.niid.go.jp/niid/images/flu/H7N9manual/h7n9_manual_v2.pdf>，2023 年 7 月 14 日アクセス

5) 国立感染症研究所，病原体検出マニュアル 2019-nCoV Ver.2.9.1 <https://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/2019-nCoV20200319.pdf>，2023 年 7 月 14 日アクセス

6) 国立感染症研究所，「感染研・地衛研専用」SARS-CoV-2 遺伝子検出・ウイルス分離マニュアル Ver.1.1 <https://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/SARS-CoV-2_gene_detect_and_isolation_manual_Ver1_1.pdf>，2023 年 7 月 14 日アクセス

7) 板持雅恵，米田哲也，成相絵里ら，麻疹ウイルスと風疹ウイルスを対象としたリアルタイム PCR の迅速化，富山県衛生研究所年報（平成 29 年度）. 41:105-8.

8) ThermoFisher scientific，リアルタイム PCR における検量線による効率，感度および再現性の評価，<https://www.thermofisher.com/blog/learning-at-the-bench/qpcr-basic46/#PCR>，2023 年 7 月 14 日アクセス

短　報

DNA バーコーディング法による巻貝の鑑別およびテトラミンの定量分析

櫻井千優，真田拓生，和田章伸，長岡由香

Identification of snails by DNA barcoding methods and quantitative analysis of tetramethylammonium ion

Chihiro SAKURAI, Takuo SANADA, Akinobu WADA and Yuka NAGAOKA

令和 3 年 4 月，購入した巻貝を喫食した 2 名が，めまいやしびれを訴える有症事例が山形県内で発生した．提供された喫食残品について，DNA バーコーディング法による鑑別を試みた結果，エゾボラ属の種である可能性が示唆された．また，毒性成分であるテトラミンを 180 μg/g±23 μg/g 含有しており，喫食量からテトラミンの摂取量は 18 mg±2 mg, 29 mg±4 mg と推定した．

キーワード： DNA バーコーディング DNA barcoding，テトラミン Tetramethylammonium ion
液体クロマトグラフ–タンデム質量分析法 Liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC–MS/MS)

Ⅰ　はじめに

テトラミン（テトラメチルアンモニウムイオン）はエゾバイ科エゾボラ属・エゾバイ属巻貝の多くの種の唾液腺に含まれる食中毒の原因物質である．テトラミンによる食中毒の主な症状は，激しい頭痛，めまい，船酔い感，酩酊感，足のふらつき，眼底の痛み，眼のちらつき，嘔吐感であるが，通常数時間で回復し死亡することは無いとされている [1), 2)]．テトラミンは，唾液腺に局在しており，これを取り除くことで食中毒を予防できることが多いが，唾液腺を取り除かずに中毒する例が全国的に散発している．実際，テトラミン食中毒は平成 15 年から令和 4 年で推定事例も含めて全国で 68 件発生している [2)]．

山形県内では，令和 3 年 4 月，購入した巻貝を喫食した 2 名がめまいやしびれを訴え，医療機関を受診した事例が発生した．患者らは，他 2 名と夕食で購入した巻貝，ホタテを喫食したが，巻貝の喫食は患者らだけであった．ゆでて内臓を外した剥き身の巻貝を，1 名（30 代女性）は 5 個，もう 1 名（30 代男性）は 8 個喫食しており，喫食して約 1 時間半から 2 時間後に症状を呈し，救急外来を受診した．この状況からテトラミン食中毒が疑われた．山形県水産研究所は残品の貝殻から形態学的鑑別を行ったが，産地が不明であったため種の特定までは至らず，原因食品が不明となり有症事例扱いとなった．

当所では，調理済み残品の巻貝（以下，有症事例検体）の提供を受け，DNA バーコーディング法 [3)] による種の鑑別および LC-MS/MS を用いてテトラミンの定量分析を行った．

Ⅱ　実験方法

1　試料

有症事例検体は，管轄保健所より提供を受けたものを使用した．比較用としてホタテおよびクロバイを県内の小売店より購入した．試料はいずれも冷凍状態であったため，4 ℃で解凍した後に使用した．

2　DNA バーコーディング法による種の鑑別

有症事例検体は $n = 2$，ホタテおよびクロバイは各

n = 1 で筋肉部 25 mg を分取し, NucleoSpin® Tissue Kit（MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG 社製）のプロトコルに従い DNA 抽出を行った.

DNA 増幅では, GoTaq® G2 Hot Start Green Master Mix（Promega 社製）を使用した. プライマーにはミトコンドリア DNA にコードされるシトクロムオキシターゼサブユニットI（COI）遺伝子の一部領域を増幅する LCO1490 と HC02198[4]を使用し, 全体量が 25.0 µL になるように反応液を調製した（表 1）. 調製した反応液を適宜希釈した後, 表 2 の条件で増幅し, DNA 増幅産物の有無を, 2%アガロースゲルを用いた電気泳動により確認した. 得られた増幅産物は, NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up kit（タカラバイオ（株）製）にて精製し, ファスマック（株）の受託解析サービスを使用してシーケンス解析を行った. 得られた配列を, National Center for Biotechnology Information（NCBI）（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/, 令和 5 年 7 月 12 日確認）のデータベース上で BLAST 検索を行った.

3　テトラミンの定量分析

1）試薬

テトラミン標準品は塩化テトラメチルアンモニウム（純度 98+%）（Acros Organics 社製）を用いた. ぎ酸アンモニウムは特級（富士フイルム和光純薬（株）製）, ぎ酸, メタノールおよびアセトニトリルは LC/MS 用（富士フイルム和光純薬（株）製）を用いた. メンブレンフィルターは DISMIC® 13HP045AN（孔径 0.45 µm, 親水性 PTFE 製）（東洋濾紙（株）製）を用い, 遠心式限外ろ過フィルターは Amicon® Ultra -10K（MERCK 社製）を用いた.

2）装置

LC-MS/MS は, LC 部に AB SCIEX 社製 Exion LC™ AC, MS 部に同社製 QTRAP®4500 を使用した.

3）分析条件

LC-MS/MS の分析条件は食品衛生検査指針 [5]に従った（表 3）

表 1　DNA 増幅液調製

GoTaq G2 Hot Start Green Master Mix	12.5	µL
Forward primer[4]	1.5	µL
Reverse primer[4]	1.5	µL
Nuclease-Free Water	9.0	µL
DNA抽出液	0.5	µL
Total	25.0	µL

表 2　DNA 増幅の反応条件

95 ℃	3 min	
95 ℃	1 min	×35
40 ℃	1 min	
72 ℃	1.5 min	
72 ℃	7 min	
12 ℃	∞	

表 3　LC-MS/MS 分析条件

≪LC部≫	カラム	: Atlantis HILIC Silica（2.1×150 mm, 3 µm）
	移動相	: A－50 mmol/Lぎ酸アンモニウム（pH 3.5） B－アセトニトリル
	グラジエント (B液)	: 90%（0 min）－90%（5 min）－60%（20 min）－60%（30 min）－90%（30.01 min）－90%（45 min）
	流速	: 0.2 mL/min
	カラム温度	: 40 ℃
	注入量	: 3 µL
≪MS部≫	イオン化モード	: ESI （Positive）
	測定イオン （*m/z*）	: （定量）74.1→58.0, （確認）74.1→42.0
	スプレー電圧	: 5500 V
	ターボガス温度	: 400 ℃

4)　試験液の調製

有症事例検体には，唾液腺が存在していたため，試料は唾液腺も含めて細切均一化したものを用いた．試験液の調製は，食品衛生検査指針 [5]に従い，試行回数 $n = 3$ で行った．すなわち，試料 2.0 g を，メタノール 25 mL 中でホモジナイズ後，超音波抽出を 15 分，2500 rpm で 10 分遠心分離し，上澄み液を分取した．残留物にメタノール 20 mL を加え，再度超音波抽出，遠心分離を行い，得られた上澄み液を，先に分取した上澄み液と合わせてメタノールで 50 mL に定容した．これを孔径 0.45 μm のメンブレンフィルターでろ過し，50%メタノールで 10 倍希釈した後，遠心式限外ろ過フィルターに通し，4℃, 3500 rpm で 30 分限外ろ過を行った．得られたろ液を 50%メタノールで 100 倍希釈し，試験液とした．

5)　ドリップ液の分析

冷凍保存していた検体を解凍する際に水分（ドリップ液）が出たため，ドリップ液の分析も行った．試験液の調製は，ドリップ液 2.0 mL を用い，以降は 4）試験液の調製に従った．

Ⅲ　結果および考察

1　DNA バーコーディング法による種の鑑別

増幅産物を電気泳動した結果，ホタテでは約 300 bp，クロバイでは約 700 bp にバンドを確認した．有症事例検体もクロバイと同様に約 700 bp にバンドを確認した（図 1）．

これらの増幅産物についてシーケンス解析を行い，NCBI での BLAST 検索の結果，有症事例検体は *Neptunea subdilatata*（ナデガタチョウセンボラ），*N. constricta*（チヂミエゾボラ）といったエゾボラ属の種と相同性が高かった（表 4）．しかし，相同性が 100%のものはなく，種の特定には至らなかった．比較で使用したホタテはイタヤガイ属，クロバイはバイ属などと相同性が高かった（表 5, 6）．

今回用いたプライマーが増幅する領域は，COI遺伝子の一部領域で，動物や真核生物の DNA バーコーディング法において一般的に用いられる領域である．今回，相同性が 100%のものがなかったことから，他の領域に関しても DNA バーコーディング法により確認することで，総合的に判断し，種を同定する必要があると考える．

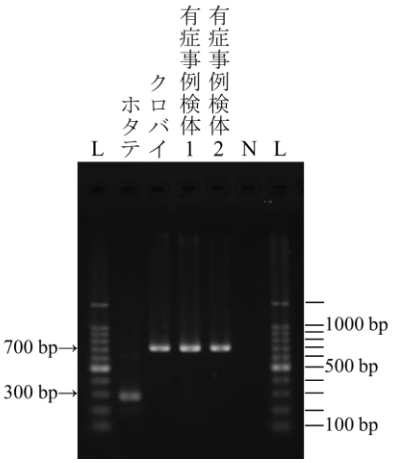

図 1　電気泳動の結果

Lane L: 100 bp DNA Ladder

Lane N: Negative Control

表 4　NCBI での BLAST 検索結果（有症事例検体）

学名	和名	科	属	相同性（%）	識別番号
Neptunea subdilatata	ナデガタチョウセンボラ	エゾバイ	エゾボラ	95.69	EU883630.1
N. constricta	チヂミエゾボラ	エゾバイ	エゾボラ	94.12	AB185305.1
N. constricta	チヂミエゾボラ	エゾバイ	エゾボラ	93.92	AB185310.1
N. constricta	チヂミエゾボラ	エゾバイ	エゾボラ	93.92	AB185309.1
N. constricta	チヂミエゾボラ	エゾバイ	エゾボラ	93.92	AB185299.1

表 5　NCBI での BLAST 検索結果（ホタテ）

学名	和名	科	属	相同性（%）	識別番号
Chlamys islandica	アイスランドホタテガイ	イタヤガイ	イタヤガイ	96.77	EU127910.1
Pecten maximus	ヨーロッパホタテ	イタヤガイ	イタヤガイ	83.04	LR736844.1
P. maximus	ヨーロッパホタテ	イタヤガイ	イタヤガイ	81.87	LR736852.1
P. maximus	ヨーロッパホタテ	イタヤガイ	イタヤガイ	81.42	LR736842.1
P. maximus	ヨーロッパホタテ	イタヤガイ	イタヤガイ	80.97	LR736846.1

表 6　NCBI での BLAST 検索結果（クロバイ）

学名	和名	科	属	相同性（%）	識別番号
Babylonia formosae habei	タイワンバイ	バイ	バイ	96.90	AY819773.1
B. lani	ランゾウゲバイ	バイ	バイ	88.77	HQ424448.1
Hemipolygona armata	–	イトマキボラ	ヘミポリゴナ	83.79	KT753974.1
Tudivasum armigerum	–	オニコブシガイ	トゥディヴァスム	83.59	MF782559.1
T. armigerum	–	オニコブシガイ	トゥディヴァスム	83.59	MF782558.1

2　テトラミンの定量分析の結果

有症事例検体を分析した結果，テトラミン標準品と同様の保持時間にピークが見られ，有症事例検体はテトラミンを 180 µg/g±23 µg/g 含有していることが判明した（図 2（B））．管轄保健所からの聞き取りによると，1 名（30 代女性）は 5 個，もう 1 名（30 代男性）は 8 個巻貝を喫食しており，喫食した巻貝 1 個当たりの重量を 20 g と仮定すると，テトラミンの摂取量は 18 mg±2 mg（30 代女性），29 mg±4 mg（30 代男性）と推定した．テトラミンの中毒量は，約 10 mg[6]，数十 mg[7), 8)]，50 mg 以上 [9)]，350 ~ 450 mg[10)]と様々な報告があり，個人差が大きいと推察される．

また，ドリップ液を分析した結果，有症事例検体と同様にテトラミン標準品と同様の保持時間にピークが見られ，ドリップ液全量中にテトラミンが 445 µg 含まれていることが判明した（図 2（C））．テトラミンは，水溶性の化合物であることから，凍結および融解により細胞が破壊され，細胞中の水分とともに出てくることでドリップ液中に存在したと推定した．

今後摂取量の推定には喫食部位に加えて，ドリップ液も分析する必要がある．

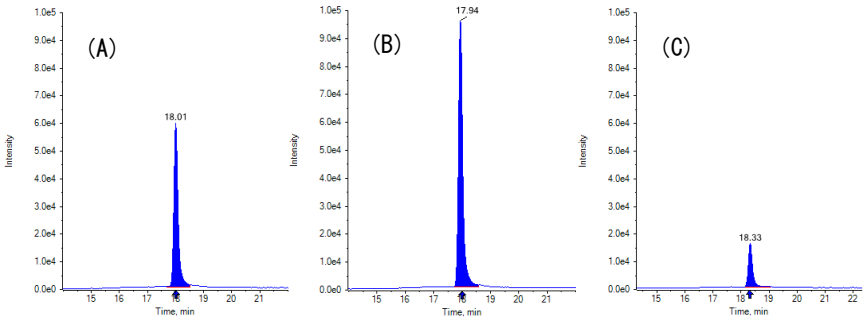

図 2　LC-MS/MS 分析結果（*m/z*;74.1 > 58.0 テトラミン）；
(A)テトラミン標準液(5 ng/mL)，(B) 有症事例検体，(C)ドリップ液

Ⅳ　文献

1) 小山完二，急性中毒標準診療ガイド（日本中毒学会編），じほう，東京, 668-669 (2008).

2) 厚生労働省 HP 食中毒統計資料，自然毒のリスクプロファイル（令和 5 年 6 月 14 日閲覧）

3) 熊澤慶伯ら，名古屋市産淡水貝類の DNA バーコ

ーディング, なごやの生物多様性, **6**:1-14 (2019).
4) O. Folmer, *et al*., DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates, *Mol. Mar. Biol. and Biotechnology*, **3(5)**, 294-299 (1994).
5) 食品衛生検査指針 理化学編 2015（公益社団法人）日本食品衛生協会, 848-853 (2015).
6) 新藤哲也ら, イオンクロマトグラフィーによる巻貝（軟体動物）中テトラミンの分析及び調理による消長, 食品衛生学雑誌, **41**, 11-16 (2000).
7) 小林香夫, 巻貝によるテトラミン中毒, 食品衛生学雑誌, **31**, 424-425 (1990).
8) 成田弘子, 巻貝による食中毒, 食品衛生学雑誌, **26**, 549 (1985).
9) 藤井令子ら, テトラブロモフェノールフタレインエチルエステルを用いた巻貝中テトラミンの比色定量法, 食品衛生学雑誌, **33**, 237-240 (1992).
10) 橋本芳郎, 魚貝類の毒, 学会出版センター, 東京, 24-26 (1977)

Ⅴ 謝辞

有症事例検体をご提供いただいた村山保健所生活衛生課の皆様に心から感謝申し上げます.

抄　録

1）他誌掲載論文

Seroprevalence of coxsackievirus A21 neutralizing antibodies in Yamagata, Japan between 1976 and 2019; coxsackievirus A21 has rarely affected young children

Tanaka W, Komabayashi K, Ikeda Y, Aoki Y, Itagaki T, Mizuta K

J Med Virol. 2022;94:2877-2881.

Although coxsackievirus A21 (CV-A21) has been associated with an acute respiratory infection (ARI) as well as poliomyelitis-like paralysis, reports of CV-A21 detection have been quite limited both globally and in Japan. CV-A21 strains were isolated from five sporadic pediatric cases with ARI in 2019 in Yamagata, Japan. Neutralizing antibodies (NT Abs) were then measured against CV-A21 using sera collected in 1976, 1985, 1999, 2009, and 2019 in Yamagata, to clarify the longitudinal epidemiology of CV-A21. The total Ab-positive rate in each year was 15.2% (35/233), 10.7% (30/281), 14.3% (28/196), 3.1% (7/236), and 1.3% (3/226), respectively. Ab-positive rates generally increased with age, especially between 1976 and 1999. Among the total Ab-positive cases, the Ab titers were relatively low; 50 cases belonged to the 1:8-1:16, 40 to 1:32-1:64, 12 to 1:128-1:256, and 1 to 1:1024< groups, respectively. No Ab-positive cases under the age of 10 were observed in any of the years analyzed. In conclusion, this study and previous works suggested that CV-A21 is a unique enterovirus, which is not transmitted readily among young children but causes sporadic ARI cases mainly among those ≥15 years of age in the community.

A hydroxypropyl methylcellulose plaque assay for human respiratory syncytial virus

Takumi-Tanimukaia Y, Yamamoto S, Ogasawara N, Nakabayashi S, Mizuta K, Yamamoto K, Miyata R, Kakuki T, Jitsukawa S, Sato T, Tsutsumi H, Kojima T, Takano K, Yokota S

J Virol Methods. 2022;304:114528.

Quantifying proliferative virus particles is one of the most important experimental procedures in virology. Compared with classical overlay materials, newly developed cellulose derivatives enable a plaque-forming assay to produce countable clear plaques easily. HEp-2 cells are widely used in plaque assays for human respiratory

syncytial virus (RSV). It is crucial to use an overlay material to keep HEp-2 cell proliferation and prevent RSV particles from spreading over the fluid. Among four cellulose derivatives, carboxymethyl cellulose sodium salt (CMC), hydroxypropyl methylcellulose (HPMC), microcrystalline cellulose (MCC), and hydroxyethyl cellulose (HEC), we found that HPMC was the optimal overlay material because HPMC maintained HEp-2 cell proliferation and RSV infectivity. Although MCC was unsuitable for RSV, it assisted the plaque-forming by human metapneumovirus in TMPRSS2-expressing cells. Therefore, depending on the cells and viruses, it is necessary to use different overlay materials at varying concentrations.

A seroepidemiologic study of a measles outbreak, Yamagata Prefecture, Japan, 2017: the estimation of spreaders using serological assays in a measles elimination setting

Seto J, Aoki Y, Tanaka S, Komabayashi K, Ikeda T, Mizuta K

J Infect Chemother. 2022;28:1018-1022.

Introduction: In regions where the endemic measles virus has been eliminated, early detection of contagious patients is important for preventing the spread of measles and sustaining elimination. To investigate whether serological assays can be used for the estimation of highly infectious patients with measles, we performed a seroepidemiologic study of a measles outbreak in Yamagata Prefecture, Japan, in 2017.

Methods: We tested plaque reduction neutralization (PRN), IgG avidity, and gelatin particle agglutination (PA) assays in 31 patients with measles, subdivided into two super-spreaders, three spreaders, and 26 non-spreaders. Simultaneously, these results were compared with the cycle threshold (Ct) of a semi-quantitative real-time reverse transcription PCR for the measles virus from throat swab specimens.

Results: In the PRN assay, one super-spreader and two spreaders lacked protective antibodies. The IgG avidity assay showed that two super-spreaders and one spreader had low avidity. The PA assay indicated that two super-spreaders and two spreaders lacked protective antibodies. Comparison of the results of the three serological assays and Ct revealed that patients whose antibody titers were judged as low in the IgG avidity and PA assays showed low Ct (i.e., high viral load), whereas non-spreaders tended to show low viral load.

Conclusions: Our preliminary seroepidemiologic analysis of a population of 31 patients with measles suggests that PA and IgG avidity assays may be used for the identification of super-spreader/spreader candidates. However, further investigations are necessary to validate the robustness of these serological assays in detecting contagious measles cases.

Recombinant parechovirus A3 possibly causes various clinical manifestations, including myalgia; findings in Yamagata, Japan in 2019

Mizuta K, Itagaki I, Chikaoka S, Wada M, Ikegami T, Sendo D, Iseki C, Shimizu Y, Abe S, Komabayashi K, Aoki Y, Ikeda T

Infect Dis. 2022;1-19.

Background: Parechovirus A3 was first reported in 2004 and has been recognized as a causative agent of mild and severe infections in children. Since we first reported an outbreak of adult parechovirus A3-associated myalgia in Yamagata, Japan in 2008, this disease has since been recognized across Japan, but has not yet been reported from other countries.

Aim: We analysed 19 cases of parechovirus A3 infections identified in Yamagata in 2019 to further clarify the epidemiology of this disease.

Methods: We performed phylogenetic analyses of parechovirus A3 isolates and analysed the clinical manifestations and the genomic clusters.

Results: There were two clusters, with cluster 2019B replacing 2019 A around October/November. Phylogenetic analysis revealed that 2019B cluster strains and Australian recombinant strains, which appeared between 2012 and 2013, were grouped in one cluster at non-structural protein regions, suggesting that the ancestor to these regions of 2019B cluster strains were Australian recombinant lineage strains. The strains from both clusters caused various infections in children including myalgia. These findings strongly support that parechovirus A3 strains cause myalgia and other paediatric infections irrespective of the virus strains involved, including recombinant strains.

Conclusions: We have reported repeatedly sporadic cases of myalgia and here showed that recombinant strains also cause myalgia. We hope our experiences will help better understand these infections and possibly result in detection of more cases in the world.

Analytical estimation of maximum fraction of infected individuals with one-shot non-pharmaceutical intervention in a hybrid epidemic model

Fujiwara N, Onaga T, Wada T, Takeuchi S, Seto J, Nakaya T, Aihara K

BMC Infect Dis. 2022;22:512.

Background: Facing a global epidemic of new infectious diseases such as COVID-19, non-pharmaceutical interventions (NPIs), which reduce transmission rates without medical actions, are being implemented around the world to mitigate spreads. One of the problems in assessing the effects of NPIs is that different NPIs have been

implemented at different times based on the situation of each country; therefore, few assumptions can be shared about how the introduction of policies affects the patient population. Mathematical models can contribute to further understanding these phenomena by obtaining analytical solutions as well as numerical simulations.

Methods and results: In this study, an NPI was introduced into the SIR model for a conceptual study of infectious diseases under the condition that the transmission rate was reduced to a fixed value only once within a finite time duration, and its effect was analyzed numerically and theoretically. It was analytically shown that the maximum fraction of infected individuals and the final size could be larger if the intervention starts too early. The analytical results also suggested that more individuals may be infected at the peak of the second wave with a stronger intervention.

Conclusions: This study provides quantitative relationship between the strength of a one-shot intervention and the reduction in the number of patients with no approximation. This suggests the importance of the strength and time of NPIs, although detailed studies are necessary for the implementation of NPIs in complicated real-world environments as the model used in this study is based on various simplifications.

Suitability of NIID-MDCK cells as a substrate for cell-based influenza vaccine development from the perspective of adventitious virus susceptibility

Hamamoto I, Takahashi H, Shimasaki N, Nakamura K, Mizuta K, Sato K, Nishimura H, Yamamoto N, Hasegawa H, Odagiri T, Tashiro M, Nobusawa E

Microbiol Immunol. 2022;66:361-370.

The practical use of cell-based seasonal influenza vaccines is currently being considered in Japan. From the perspective of adventitious virus contamination, we assessed the suitability of NIID-MDCK cells (NIID-MDCK-Cs) as a safe substrate for the isolation of influenza viruses from clinical specimens. We first established a sensitive multiplex real-time PCR system to screen for 27 respiratory viruses and used it on 34 virus samples that were isolated by passaging influenza-positive clinical specimens in NIID-MDCK-Cs. Incidentally, the limit of detection (LOD) of the system was 100 or fewer genome copies per reaction. In addition to influenza viruses, human enterovirus 68 (HEV-D68) genomes were detected in two samples after two or three passages in NIID-MDCK-Cs. To further investigate the susceptibility of NIID-MDCK-Cs to adventitious viruses, eight common respiratory viruses were subjected to passages in NIID-MDCK-Cs. The genome copy numbers of seven viruses other than parainfluenza 3 decreased below the LOD by passage 4. By passaging in NIID-MDCK-Cs, the genome numbers of the input HEV-D68, 1 × 108 copies, declined to 102 at passage 3 and to under the LOD at passage 4, whereas those of the other six viruses were under the LOD by passage 3. These results implied that during the process of isolating influenza viruses with NIID-MDCK-Cs, contaminating viruses other than parainfluenza 3 can

be efficiently removed by passages in NIID-MDCK-Cs. NIID-MDCK-Cs could be a safe substrate for isolating influenza viruses that can be used to develop cell-based influenza vaccine candidate viruses.

山形県における時空間三次元地図を用いた新型コロナウイルス感染症流行可視化の取り組み

瀬戸順次, 鈴木恵美子, 山田敬子, 石川仁, 加藤裕一, 加藤丈夫, 山下英俊, 阿彦忠之, 水田克巳, 中谷友樹

日本公衆衛生雑誌. 2023;70:185-196.

目的　感染症の流行状況を的確に示すためには，時・場所・人の 3 つの情報の要約が求められる．本報告では，新型コロナウイルス感染症（COVID-19）が山形県において「いつ・どこで・どのように」広がっているのかを可視化した COVID-19 時空間三次元マップ（時空間マップ）を用いて実施した公衆衛生活動の概要を紹介することを目的とした．

方法　山形県および山形市（中核市）のプレスリリース情報を基に感染者の疫学情報をリスト化し，無料統計ソフトを用いて時空間マップ（自由に回転，拡大・縮小が可能な 3 次元グラフィクスを含む html ファイル）を作成した．時空間マップの底面には，山形県地図を配置した．各感染者は，XY 平面の居住地市町村（代表点から規定範囲でランダムに配置）と Z 軸の発病日（推定を含む）の交点にプロットした．また，色分けにより，感染者の年齢群，感染経路を示した．さらに，県外との疫学的関連性を有する感染者には，都道府県名等を挿入した．完成した時空間マップは，山形県衛生研究所ホームページ上で公開し，随時更新した．

活動内容　2020 年 8 月に時空間マップの公開を開始し，以降，山形県で経験した第六波までの流行状況を公開した．その中で確認された，第一波（2020 年 3〜5 月）から第五波（2021 年 7〜9 月）までに共通していた流行の特徴をまとめ，ホームページ上に掲載した．あわせて，その特徴を踏まえた感染対策（山形県外での流行と人の流れの増加の把握，飲食店クラスターの発生抑止，および家庭内感染の予防）を地域住民に提言した．2022 年 1 月以降の第六波では，10 歳未満，10 代，そして子育て世代の 30 代の感染者が増加し，保育施設・小学校におけるクラスターも増えていたことから，これら施設においてクラスターが発生した際の家庭内感染の予防徹底を呼びかけた．

結論　時・場所・人の情報を含む COVID-19 流行状況をまとめた図を作成・公開する中で得られた気づきを基に，地域住民に対して具体的な感染対策を提言することができた．本報告は，自治体が公表している感染者情報を用いた新たな公衆衛生活動の方策を示した一例と考えられる．

山形県における結核菌ゲノム解析を用いた結核分子疫学調査

瀬戸順次, 和田崇之, 村瀬良朗, 三瓶美香, 下村佳子, 細谷真紀子, 水田克巳, 御手洗聡, 阿彦忠之

感染症学雑誌. 2023;97:6-17.

背景：本邦では結核菌ゲノム解析と実地疫学を組み合わせた積極的結核疫学調査の有用性評価は行われていない.

方法：2009～2020 年の山形県における反復配列多型（VNTR）分析に基づいた網羅的な結核分子疫学調査結果により見出されたクラスターのうち，2020 年の結核患者 8 人を含む 8 クラスター（19 人）を対象に結核菌ゲノム比較を実施し，保健所の実地疫学調査結果と併せて評価した.

結果：結核菌ゲノム比較の結果，近縁株（一塩基多型 5 カ所以内，もしくは 6～12 カ所かつ患者間に疫学的関連性を確認）は 19 株中 9 株（47.4%）に留まり，半数の 4 クラスターにのみ近縁株が含まれた. また，近縁株患者 9 人中 6 人（66.7%）で患者間の疫学的関連性が見出されていた一方，分離された菌が患者間の最近の結核感染伝播を示唆しない非近縁株（一塩基多型 13 カ所以上）であった 10 人は，全例が疫学的関連性不明であった（$p < 0.01$）.

結論：高精細な識別能を有する結核菌ゲノム解析は，VNTR 分析によりクラスターを形成した菌株から，患者間の疫学的関連性を強く示唆する近縁株を選別することができた．その特長は，保健所の感染伝播経路調査に要する人的・時間的資源を必要な結核患者に集中させることを可能とし，効率的かつ高精度の積極的結核疫学調査に貢献するものと考えられた.

Measles Outbreak Response Activity in Japan, and a Discussion for a Possible Strategy of Outbreak Response Using Cycle Threshold Values of Real-Time Reverse Transcription PCR for Measles Virus in Measles Elimination

Seto J, Aoki Y, Komabayashi K, Yamada K, Ishikawa H, Ichikawa T, Ahiko T, Mizuta K

Viruses. 2023;15:171.

Measles is a highly contagious, but vaccine-preventable disease caused by the measles virus (MeV). Although the administration of two doses of measles vaccines is the most effective strategy to prevent and eliminate measles, MeV continues to spread worldwide, even in 2022. In measles-eliminated countries, preparedness and response to measles outbreaks originating from imported cases are required to maintain elimination status. Under these circumstances, real-time reverse transcription (RT) PCR for MeV could provide a diagnostic method capable of

strengthening the subnational capacity for outbreak responses. Real-time RT-PCR can detect MeV RNA from patients with measles at the initial symptomatic stage, which can enable rapid public health responses aimed at detecting their contacts and common sources of infection. Furthermore, low cycle threshold (Ct) values (i.e., high viral load) of throat swabs indicate high infectiousness in patients with measles. The high basic reproduction number of measles suggests that patients with high infectiousness can easily become super-spreaders. This opinion proposes a possible strategy of rapid and intensive responses to counter measles outbreaks caused by super-spreader candidates showing low Ct values in throat swabs. Our strategy would make it possible to effectively prevent further measles transmission, thereby leading to the early termination of measles outbreaks.

Antiviral susceptibilities of distinct lineages of influenza C and D viruses

Takashita E, Murakami S, Matsuzaki Y, Fujisaki S, Morita H, Nagata S, Katayama M, Mizuta K, Nishimura H, Watanabe S, Horimoto T, Hasegawa H

Viruses. 2023;15:244.

The emergence and spread of antiviral-resistant influenza viruses are of great concern. To minimize the public health risk, it is important to monitor antiviral susceptibilities of influenza viruses. Analyses of the antiviral susceptibilities of influenza A and B viruses have been conducted globally; however, those of influenza C and D viruses are limited. Here, we determined the susceptibilities of influenza C viruses representing all six lineages (C/Taylor, C/Yamagata, C/Sao Paulo, C/Aichi, C/Kanagawa, and C/Mississippi) and influenza D viruses representing four lineages (D/OK, D/660, D/Yama2016, and D/Yama2019) to RNA polymerase inhibitors (baloxavir and favipiravir) by using a focus reduction assay. All viruses tested were susceptible to both drugs. We then performed a genetic analysis to check for amino acid substitutions associated with baloxavir and favipiravir resistance and found that none of the viruses tested possessed these substitutions. Use of the focus reduction assay with the genotypic assay has proven valuable for monitoring the antiviral susceptibilities of influenza C and D viruses as well as influenza A and B viruses. Antiviral susceptibility monitoring of all influenza virus types should continue in order to assess the public health risks posed by these viruses.

Another advantage of multi-locus variable-number tandem repeat analysis that can putatively subdivide enterohemorrhagic Escherichia coli O157 strains into clades by maximum a posteriori estimation

Hirai S, Yokoyama E, Ando N, Seto J, Hazama K, Enomoto K, Izumiya H, Akeda Y, Ohnishi M

PLoS One. 2023;18:e0283684.

Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 (O157) strains can be subdivided into clades based on their single-nucleotide polymorphisms, but such analysis using conventional methods requires intense effort by laboratories. Although multi-locus variable-number tandem repeat analysis (MLVA), which can be performed with low laboratory burden, has been used as a molecular epidemiological tool, it has not been evaluated whether MLVA can be used the clade subdivision of O157 strains like it can for that of other pathogenic bacteria. This study aimed to establish a method for subdividing O157 strains into clades using MLVA data. The standardized index of association, ISA, for O157 strains isolated in Chiba prefecture, Japan (Chiba isolates) revealed the presence of unique tandem repeat patterns in each major clade (clades 2, 3, 7, 8, and 12). A likelihood database of tandem repeats for these clades was then constructed using the Chiba isolates, and a formula for maximum a posteriori (MAP) estimation was constructed. The ratio of the number of O157 strains putatively subdivided into a clade by MAP estimation from MLVA data relative to the number of O157 strains subdivided using single-nucleotide polymorphism analysis (designated as the concordance ratio [CR]) was calculated using the Chiba isolates and O157 strains isolated in Yamagata prefecture (Yamagata isolates). The CRs for the major Chiba and Yamagata isolate clades, other than clade 2, were 89%-100%. Although the CR for clade 2 Chiba isolates was >95%, that of the Yamagata isolates was only 78.9%. However, these clade 2 CRs were not significantly different from one another, indicating that clade 2 strains can be subdivided correctly by MAP estimation. In conclusion, this study expands the utility of MLVA, previously applied predominantly for molecular epidemiological analysis, into a low-laboratory-burden tool for subdividing O157 strains into phylogenetic groups.

Longitudinal antigenic and seroepidemiological analyses of parechovirus A1 in Yamagata, Japan

Mizuta K, Itagaki T, Katsushima F, Katsushima Y, Sasaki M, Komabayashi K, Ikeda Y, Aoki Y, Matsuzaki Y

J Med Virol. 2023;95:e28696.

To investigate the antigenic changes in parechovirus 1 (PeVA1), seroepidemiological analyses were performed against the Harris strain (Harris), isolated in 1956, and PeVA1/Yamagata.JPN/2021-4785, isolated in 2021, using immune sera and 207 and 237 human serum specimens collected in 2021 and 1976, respectively. Although rabbit immune sera showed the highest neutralization antibody (NT-Ab) titers against the immunized viruses at 1:12 800-1:102 400, they were cross-reactive at 1:400-1:800. All 62 Yamagata isolates obtained between 2001 and 2021 (Yamagata strains), belonging to phylogenetic lineage 1B, reacted more strongly (mostly 4-64 times) to antiserum

against PeVA1/Yamagata.JPN/2021-4785 than to antiserum against Harris, belonging to phylogenetic lineage 1 A. Human serum specimens obtained in 2021 showed higher NT-Ab titers against PeVA1/Yamagata.JPN/2021-4785, whereas those obtained in 1976 had similar NT-Ab titers against both strains. These findings suggested that Yamagata strains and Harris were antigenically cross-reactive, although there were differences. There are still high NT-Abs titers present against Harris in 2021 in particular, indicating that PeVA1 has been in circulation with high immunity in the population. In conclusion, this study suggested that PeVA1 has been endemically perpetuated with only minor antigenic changes as well as with high immunity over several decades in the community.

ドクササコに含有される有毒成分の精製および多成分同時分析法に関する研究

石田恵崇, 大内仁志, 菅敏幸, 篠原秀幸, 中島克則, 長岡由香

食品衛生学雑誌. 2022;63:79-84.

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する手法について検討を行った．シリカゲル，ODS，イオン交換樹脂を固定相としたカラムクロマトグラフィーおよび分取 TLC を組み合わせることにより各成分を高純度で得ることに成功した．続けて，得られた精製物を用いて LC-MS/MS の測定条件を最適化し，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，回収率が 80.8-112.4%，併行精度が 1.4-3.8%と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．以上を踏まえ，ドクササコ中毒発生時，本分析法により原因キノコを迅速かつ高精度に特定可能であると判断した．

2) 学会発表

1976年から2019年の山形におけるコクサッキーウイルス A21型の血清疫学

水田克巳

第63回日本臨床ウイルス学会，2022年6月18-19日，於東京

【目的】コクサッキーウイルス A21 (CVA21)の検出報告は 1980-2021 年に日本国内で 30 例(山形の 2019 年の 5 例含む)であり，国外からの報告も稀である.我々は，2019 年 9-10 月に，急性気道感染症の小児患者 5 名から CVA21 を山形県で初めて分離した(Jpn J Infect Dis.2021;74:172-4)ため，今回，山形県民の CVA21 中和抗体保有状況を調査することにした.

【方法】CVA21 山形分離株を抗原とし，1976･1985･1999･2009･2019 年に感染症流行予測調査事業のために採取された血清を段階希釈して混合･反応させ，RD-18S 細胞に接種して抗体価を測定した.
【結果と考察】年別の抗体陽性率は，それぞれ 15.2% (35/233)，10.7% (30/281)，14.3% (28/196)，3.0% (7/236)，1.3% (3/226)であった.年齢層別にみると，陽性率は年齢とともに上昇傾向(特に 1976-1999 年)にあった.全体を通じ，10 歳未満で抗体保有者はおらず，10 歳代の抗体保有者も少数であった.イギリスや日本で若年者の抗体保有率が低く年齢とともに上昇したという同様の報告があり，CVA21 の検出報告は少年刑務所･自衛隊･高校生などからなされている.今回のデータとこれらの報告から，一般的にエンテロウイルス感染症は小児の感染症と考えられているが，CVA21 は小児より年齢が高い世代において感染症や集団感染をおこしやすいウイルスであることが示唆された.
[非会員研究協力者:板垣勉(山辺こどもｸﾘﾆｯｸ)，田中和佳，駒林賢一，池田陽子，青木洋子(山形衛研)] 本研究は，東北乳酸菌研究会の支援を受けて実施された.

地方衛生研究所における急性脳炎・脳症及び急性弛緩性麻痺の病原体検査の状況について

四宮博人，山下育孝，水田克巳，高崎智彦，貞升健志，皆川洋子，田中義人，多屋馨子，青木紀子

第63回日本臨床ウイルス学会，2022年6月18-19日，於東京

急性脳炎・脳症及び急性弛緩性麻痺(以下，AFP)は 5 類感染症全数把握疾患であり，届出基準に病原体検査は必須ではないため，原因病原体については必ずしも十分に捉えていないことも多い．地方衛生研究所（以下，地衛研）におけるこれらの神経系疾患の病原体検査の実態を明らかにし，病原体不明急性脳炎・脳症・AFP の病原体検索を目指すことを目的に，これらの病原体検査について調査を実施した．多くの地衛研において，急性脳炎・脳症（5 類）届出症例の検査，及び病原体定点からの検体に「脳炎・脳症」と記載されたものについて病原体検査が実施されていた．2017 年～2019 年の急性脳炎・脳症届出症例の 72.7%について何らかの病原体検査が実施されており，病原体としては 15 種類程度の検査が実施され（多い順に，エンテロウイルス，HSV-1,2，HHV6,7，ヒトパレコウイルス，ライノウイルス，アデノウイルス，ムンプスウイルス，インフルエンザウイルス，VZV，CMV，ロタウイルス，RS ウイルス，ヒトメタニューモウイルス，パルボウイルス，ノロウイルスなど)，地衛研で検査された 1,687 症例中の 47.9%から何らかの病原体が検出されていた．一方，AFP についても，2018 年～2019 年に届出のあった症例について，病原体検査された症例数と陽性症例数について調査し，地衛研で病原体の検索がされた 86 症例からのべ 140 のウイルスが検出されており，コクサッキーウイルス，ライノウイルス，EV-D68，EBV，CMV，HHV6, 7 の検出が多かった．EV-D68 は 22 症例(25.6%)から検出され，大部分は鼻咽頭検体から検出されていた．今後の治療や予防・原因究明に役立てるためには，正確な臨床情報と疫学情報のさらなる把握及び病原体検索の実施，そして臨床・検査側双方のコミュニケーションが必要と考えられる．

1976 年から 2019 年の山形におけるコクサッキーウイルス A21 型の血清疫学

水田克巳，田中和佳，駒林賢一，池田陽子，青木洋子，板垣勉

第 74 回日本細菌学会東北支部総会，2022 年 8 月 22-23 日，於福島

【背景】コクサッキーウイルス A21 (CVA21)の検出報告は 1980-2021 年に日本国内で 30 例(山形の 2019 年の 5 例含む)しかなく，国外からの報告も稀である．我々は，2019 年 9-10 月に，急性気道感染症の小児患者 5 名から CVA21 を山形県で初めて分離した(Jpn J Infect Dis.2021;74:172-4)ため，今回，山形県民の CVA21 中和抗体保有状況を調査することにした．
【方法】CVA21 山形分離株を抗原とし，1976･1985･1999･2009･2019 年に感染症流行予測調査事業のために採取された血清を段階希釈して混合･反応させ，RD-18S 細胞に接種して中和抗体価を測定した．
【結果】年別の抗体陽性率は，それぞれ 15.2% (35/233)，10.7% (30/281)，14.3% (28/196)，3.0% (7/236)，1.3% (3/226)であった．年齢層別にみると，陽性率は年齢とともに上昇傾向(特に 1976-1999 年)にあった．全体を通じ，10 歳未満で抗体保有者はおらず，10 歳台の抗体保有者も少数であった．
【考察】イギリスや日本で若年者の抗体保有率が低く年齢とともに上昇したという同様の報告があり，CVA21 の検出報告の多くは成人散発事例や少年刑務所・自衛隊・高校生の集団発生などからなされている．一般的にエンテロウイルス感染症は小児の感染症と考えられているが，今回のデータとこれらの報告から，CVA21 は高校生以上の世代において感染症や集団感染をおこしやすいウイルスであることが示唆された．
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．

山形県におけるゲノム解析を取り入れた結核分子疫学調査

瀬戸順次，和田崇之，村瀬良朗，下村佳子，細谷真紀子，御手洗聡，阿彦忠之

第 97 回日本結核・非結核性抗酸菌症学会総会，令和 4 年 7 月 1-2 日，於旭川

結核菌ゲノム解析を取り入れた結核分子疫学調査の有用性を評価した報告は少ない．われわれは，2020 年に山形県で登録された結核患者由来結核菌 49 株の反復配列多型（VNTR）分析を実施し，2006 年以降の菌株と VNTR クラスター（クラスター）を形成した 8 株が属した 8 クラスター20 株（クラスターサイズ 2～3）のゲノム解析を実施した．結果，ゲノム比較が可能であった 7 クラスター17 株のうち 9 株（52.9%）がゲノム解析において近縁株と判断され，由来患者 9 人のうち 6 人（66.7%）は，クラスター内の特定の患者との関連性が見出されていた．一方，ゲノム比較により近縁株ではないと判断された 8 株の由来患者は，全例が関連性不明だった．以上より，結核菌ゲノム解析は，保健所の感染伝播経路追究に係る人的・時間的資源を真に関連性を追究すべき結核患者に集中させることを可能にし，効率的かつ精度の

高い分子疫学調査を進めるうえでの強力な後ろ盾になると考えられた．

エクセル VBA を用いた新型コロナウイルス検査台帳システムの構築

瀬戸順次，水田克巳

第 81 回日本公衆衛生学会総会，2022 年 10 月 7-9 日，於甲府

【目的】保健所からの新型コロナウイルス検査依頼に係る事務処理の自動化のため，エクセル Visual Basic Application（以下，VBA）を用いた検査台帳システムを構築すること．
【方法】2020 年 4 月以降，PCR 検査担当者及び事務担当者の要望を聞き取りながら，検査依頼受付から結果報告に至るまでの事務処理の各工程を自動化する検査台帳システムを構築した．また新規検査・解析が導入された際には，随時，システムの仕様を変更した．
【結果】2020 年 4 月，新型コロナウイルス検査依頼の急増に伴い，感染症法に係る検査票様式を用いた紙ベースでの検査受付・結果報告という従来の方法が立ち行かなくなった．そこで，保健所からの依頼を，エクセル一覧表形式に変更した．併せて，エクセル VBA を用いたプログラミングにより，①検査対象者のイニシャル付与及び同一対象者複数検体確認，②PCR 検査リスト作成，③県庁報告用リスト作成，④PCR 検査結果取り込み，⑤保健所別報告書作成，及び⑥検査ノート貼付用シール作成，の 6 つの工程を，それぞれボタン 1 つで実施可能となるよう整備した．また，2021 年 1 月には変異株スクリーニング検査が開始されたため，N501Y，E484K，L452R 検査結果を保健所及び県庁に報告するための仕様を追加した．さらに，2021 年 5 月には，当所において新型コロナウイルスゲノム解析が可能となったため，当該解析結果入力に対応した仕様に修正した．以上の検査台帳システムの構築に際し，費用はかからなかった．また，システムの導入により，概算で 1 日あたり 1～2 時間の人的労力の節減につながった．
【結論】COVID-19 パンデミック下では，想像をはるかに超える数の PCR 検査をしながら，新たな検査・解析法に対応していく必要に迫られている．そのような中，検査台帳システムの構築は，検査員が検査・解析に集中できる環境の整備につながった点において，意義深いものであったと考えられた．また，自動化による労力の節減及び人的ミスの未然防止は，COVID-19 対応のみならず，公衆衛生行政における危機対応全般への汎用性があると思われる．従って，プログラミング技術を有する者の確保または育成が，今後の公衆衛生行政における効率的な危機対応を考えるうえでの一つの鍵になると考えられた．

山形県衛生研究所における 2019-2022 年の呼吸器ウイルスの検出状況

駒林賢一，佐々木美香，池田陽子，瀬戸順次，青木洋子，板垣勉，水田克巳

第 49 回山形県公衆衛生学会，2023 年 3 月 1 日，於山形

【緒言】山形県では感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律に基づき，感染症発生動向調査を実施している．この調査の一環として当所では呼吸器ウイルスの検索に力を入れており，病原体定点医療機関から提供された小児の呼吸器由来検体を中心に検査を行っている．本研究では風邪様症状の原因である呼吸器ウイルス 11 種類について，新型コロナウイルス感染症（COVID-19）の発生前後で検出状況を比較することを目的とした．

【方法】2019 年 1 月 4 日（第 1 週）から 2022 年 11 月 5 日（第 44 週）に山辺こどもクリニックを受診した患者から採取した呼吸器検体（鼻汁，咽頭拭い液，喀痰）を対象とした．

ヒトライノウイルス（HRV）及びヒトコロナウイルス（HCoV）4 種類（OC43，NL63，HKU1，229E）は遺伝子検査により検体由来 RNA から検出した．HRV はコンベンショナル RT-PCR（cRT-PCR）法あるいはリアルタイム RT-PCR 法により検査した．4 種類の HCoV は，リアルタイム RT-PCR 法により検査した．

RS ウイルス（RSV），ヒトパラインフルエンザウイルス（HPIV）4 種類（1～4 型），ヒトメタニューモウイルス（hMPV）のは細胞培養でスクリーニングし，遺伝子検査により培養上清由来 RNA から検出した．RSV は HEF 細胞，HEp-2 細胞，RD-18S 細胞，GMK 細胞のいずれかに，HPIV2 および HPIV4 は LLC-MK2 細胞に，hMPV は VeroE6 細胞に細胞変性効果が見られた場合に，cRT-PCR 法により各ウイルスに特異的な遺伝子を検出して同定した．HPIV1 および HPIV3 は LLC-MK2 細胞がモルモット赤血球に吸着を示した場合に各ウイルスに特異的な遺伝子を cRT-PCR 法により検出して同定した．

週毎の検出率（陽性数÷検体数×100），3 週移動平均（3 週の検出率の和÷3）を算出し，山形県で COVID-19 患者が初確認された 2020 年第 13 週前後で検出状況を比較した．

【結果】呼吸器検体は計 1980 検体（2019-2022 年それぞれ 868，444，376，292 検体）であった．週の平均検体数は県内 COVID-19 発生前，後それぞれ，16.4，6.8 検体であった．

COVID-19 発生前の 2019 年第 1 週～2020 年第 12 週は 11 種類のウイルスを検出した．2019 年第 1-52 週，2020 年第 1-12 週それぞれ，10 種（HRV，HCoV-OC43，HCoV-NL63，HCoV-HKU1，4 種類の HPIV，RSV，hMPV），8 種（HRV，4 種類の HCoV，HPIV1，RSV，hMPV）であった．

COVID-19 発生後の 2020 年第 13 週から 2022 年第 44 週は HCoV-229E と HPIV2 を除く 9 種類を検出した．2020 年第 13-53 週，2021 年第 1-52 週，2022 年第 1-44 週それぞれ，2 種類（HRV，HCoV-NL63），6 種類（HRV，HCoV-OC43，HCoV-NL63，HPIV3，HPIV4，RSV），5 種類（HRV，HCoV-HKU1，HPIV1，RSV，hMPV）であった．

【考察】新型コロナウイルスの感染防止策により風邪ウイルスの伝播が減少し，2020 年 13 週以降に検出されるウイルスの種類が減少したと考えられた．ただし，検体数の減少により小さい流行を検出しにくくなる可能性を考慮すべきである．呼吸器ウイルスの流行は 2021 年以降増加してきているが，通常毎年流行する呼吸器ウイルス（HCoV-OC43，HCoV-NL63，HPIV3）が 2022 年は未検出であり，COVID-19 発生前の種類には戻っていない．ウイルスに対する人間の免疫はそれらの流行が途切れることによって低下するため，今後は呼吸器ウイルスの流行拡大を監視していく必要がある．結論として，風邪様症状を起こす呼吸器ウイルスは COVID-19 パンデミック下で流行が激減したが，2021 年以降は戻りつつある各ウイルス感染症の流行の動向に注視していくべきである．

機械学習を用いたインフルエンザウイルスの培養細胞に対する細胞変性効果の有無の判定

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

第49回山形県公衆衛生学会，2023年3月1日，於山形

【目的】臨床検体からウイルスを培養する際，ウイルスがもたらす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．しかし，CPEの判定には熟練を要する．そのため，本研究では，機械学習を用いたインフルエンザウイルスCPEの自動判定を試みた．

【方法】山形県衛生研究所（山形）でMDCK細胞を用いて培養したインフルエンザウイルスのCPE画像399枚およびインフルエンザウイルス未感染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，新たに撮影したインフルエンザ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）における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%であり，新潟と宮城の特異度が低かった．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，特異度は4日目までは64.7%，5日目以降は10.5%であった（$P<0.01$）．新潟では，機材の関係で学習用データの撮影倍率（4倍）とは異なる倍率（10倍）で画像が撮影されていた．

【考察】機械学習によるインフルエンザウイルス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インフルエンザウイルス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インフルエンザウイルス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，まず，山形の環境で撮影した画像を学習用データとして用いたこと，および学習用データと異なる撮影倍率の画像を用いたことによる判定への影響が考えられた．そのため，今後，新潟，宮城においても自施設で学習用データの取り込みや推論を実施可能な環境を整えていく必要がある．また，時間経過とともに劣化していくインフルエンザウイルス未感染MDCK細胞の像がCPEと誤認されている可能性も考えられた．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．そのため，インフルエンザウイルスの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．総じて，各地方衛生研究所における機械学習環境の整備および検査体制の改善により本機械学習の感度が維持され，特異度が上昇していくものと推察された．

ヨウシュヤマゴボウに含有される毒性成分の精製及び一斉分析法に関する研究

成田弥生，篠原秀幸，長岡由香

第59回全国衛生化学技術協議会年会，2022年10月31日-11月1日，於川崎

ヨウシュヤマゴボウは北アメリカ原産の植物で国内に広く分布している．全草に毒性成分フィトラッカサポニンを含んでおり，喫食により腹痛や嘔吐等の消化器症状を呈し，最悪の場合死に至る．フィトラッカサポニンは市販標準品の入手が困難であり，全国でも機器分析による食中毒原因特定や中毒量に関する報告が少ない．これまで本県で発生した食中毒では，機器による毒性成分の分析が行えず，患者への聴き取り調査から食中毒原因を特定していた．

そこで，本研究では，ヨウシュヤマゴボウ食中毒発生時の原因究明を目的としたフィトラッカサポニンの機器分析法を検討した．まず、ヨウシュヤマゴボウに含有される毒性成分のうち，主要成分とされるフィトラッカサポニンB,E,Gの単離精製を試みたところ，当該3成分を純度99%以上で単離した．これらを標準品として，機器分析条件および試料前処理方法を検討し，当該3成分の一斉分析法を確立した．以上のことから，ヨウシュヤマゴボウ食中毒発生時において，機器分析による原因究明が可能と考える．

ツブ貝による有症事例検体の理化学検査

和田章伸，真田拓生，佐藤昌宏，櫻井千優，長岡由香

第49回山形県公衆衛生学会，2023年3月1日，於山形

令和3年に山形県で発生したツブ貝による有症事例検体に含まれる毒性成分を測定した．添加回収試験により妥当性を確認した試験法で試験液を調製し，LC-MS/MSで分析した結果，有症事例検体中のテトラミン含有量は180 mg/kgであった．患者はツブ貝を5～6個喫食したことから，ツブ貝1個当たりの重量を20 gと仮定すると，テトラミンの摂取量は18～29 mgと推定された．既往の文献で報告されている中毒量と比べると，今回の摂取量はやや低かった．その原因として，検体を解凍した際に，水分とともにテトラミンが流出したため，測定値が実際の含有量よりも低くなった可能性が考えられた．