

## 抄 録

## 1 他誌掲載論文

**ラテックス凝集反応を利用した空中Cry j 1の簡易測定法の開発**

高橋裕一, 青山正明

アレルギー 55(1), 28-33, 2006

- (目的) 特別な機械や器具を必要としない簡便な空中スギ花粉アレルギー (Cry j 1) の測定法を開発する。
- (方法) ラテックス粒子に抗Cry j 1ポリクローナル抗体を物理吸着させ, BSAでブロッキング処理し感作ビーズを作成した。Cry j 1濃度は大気試料の2倍希釈系列に感作ビーズを加え2時間静置し得られた凝集の有無から求めた。
- (結果) 日本アレルギー学会提供のスギ花粉エキス標準品ではCry j 1濃度が5 ng/mlまで凝集が認められた。大気試料は20p/m<sup>3</sup>まで測定可能であった。
- (結語) ラテックス凝集反応を利用した空中Cry j 1の簡易測定法を開発した。この方法の長所は、1) 日々の測定が容易である。特に大飛散期の測定が容易である。2) 特殊な装置を必要としない。3) 発症原因物質そのものを測定しているなどである。

**スギ花粉症における花粉飛散開始と症状発現 (特集 花粉症の病態と治療)**

高橋裕一, 青山正明, 安部大介, 佐橋紀男

アレルギー科 21(1), 29-33, 2006

スギ花粉症における花粉飛散開始と症状発現との関係について概説した。初めに、スギ花粉症の初期療法、及び飛散開始日の予測法について解説した。次に、携帯電話ユーザー向けのオーダーメイドな情報、及び日本列島における患者発症日と花粉飛散開始日との関係について述べた。

**An outbreak of measles virus infection due to a genotype D9 at a junior high school  
in Yamagata, Japan in 2004**

**K MIZUTA, C ABIKO, T MURATA, K YAMADA, T AHIKO, M SAKAMOTO,  
S TSUCHIDA, Y MATUZAKI, S HONGO and K KUDO**

Jpn.J.Infect.Dis. 58(2):98-100,2005

We investigated a measles virus (MV) outbreak that occurred at a junior high school in Yamagata, Japan between January and February, 2004. We received throat swab specimens from three patients at this school and carried out virus isolation with Vero/hSLAM cells and virus genome detection by reverse-transcription polymerase chain reaction. As a result, we isolated the virus from one patient and succeeded in amplifying the MV genome from the others. Further sequence analysis of the N gene revealed that these viruses were completely identical, and that their genotype could be characterized as type D9, which has not been reported in Japan previously. We also identified D9 viruses in two students at other junior high schools in Yamagata. These results suggested that D9 strains were imported from a region outside Japan. The genotypes of MVs found in Yamagata have changed in recent years, with D5 predominating in 2001 and H1 predominating in 2002 and 2003 as reported as national surveillance data. Therefore, we should monitor carefully to be sure that D9 strains do not become the next predominant virus. The more the number of measles cases decrease, the more important become the roles of public health laboratories, which genotype MVs and monitor their circulation and transmission pathways.

**Molecular mechanisms of high level tetracycline-resistance in group  
A streptococcal isolates, T serotypes 4 and 11**

**M MATSUMOTO, K SAKAE, M OHTA, M ENDO, R OKUNO, S MURAYAMA, K HIRASAWA,  
R SUZUKI, J ISOBE, D TANAKA, C KATSUKAWA, A TAMARU, M TOMITA, K OGATA,  
T YASUOKA, T IKEBE and H WATANABE**

Int.J.Antimicrobial Agents 25:142-147,2005

The molecular mechanism of high level tetracycline resistance in T serotypes 4 and 11 group A streptococcal (GAS) isolates was examined in 61 tetracycline-resistant isolates in Japan. PCR and sequencing analyses revealed that the T serotype/emm genotype, T4/4 isolates carried tet(O) genes, which were genetically homogenous. The T11/11 and T11/89 isolates carried different subtypes of tet(M) genes, which were present on transposons Tn916 and Tn1545, respectively. In addition, these T11 isolates may have obtained the tet(M) gene after the 1990s, because resistance to tetracycline in T11 isolates was rarely found before then. These results strongly suggested that the T4 and T11 GAS isolates acquired tetracycline-resistance via different molecular mechanisms.

## わが国の健康者における髄膜炎菌の保菌状況

田中 博, 黒木 俊郎, 渡辺 祐子, 浅井 良夫, 大谷 勝実,  
須釜 久美子, 芹川 俊彦, 中嶋 洋, 砂原 千寿子, 帆足 喜久雄,  
山口 仁孝, 久高 潤, 高橋 英之, 井上 博雄, 山井 志朗,  
益川 邦彦, 渡辺 治雄

感染症学雑誌 79,527-533,2005

2000年9月から2003年3月までの期間, 全国10県で健康者における髄膜炎菌の保菌状況を調査した。学生, 社会人, 高齢者, 外国人等の健康者5,886名の口蓋扁桃から髄膜炎菌の分離を試みた結果, 髄膜炎菌は25名(学生21名, 社会人3名, 外国人1名)から分離され, 分離された集団での分離率は0.5%~5%, 全体の平均分離率は0.4%であった。保菌者の年齢は50歳の1名を除いてすべて10歳代後半から20歳代であり, 性別は男性17名, 女性8名であった。分離菌株は血清群別試験でB群(9株)とY群(4株)に群別されたが, 12株は群別できなかった。また, 髄膜炎菌の簡易分類マーカーである $\gamma$ -グルタミールアミノペプチダーゼ活性の認められない菌株が1株存在した。

## 山形市近郊のカゼを考える —2004年ウイルス・マイコプラズマ培養をもとにして—

板垣 勉, 山形県衛生研究所

山形県小児科医会会報 46,68-74,2005

2004年1月より12月までの急性気道感染症1178名の咽頭ぬぐい液・鼻腔吸引液(ウイルス1,178名・同時採取肺炎マイコプラズマ検体102名)を用いてウイルスと肺炎マイコプラズマの分離を行なった。その結果インフルエンザ61株, パラインフルエンザ58株, RSV48株, hMPV21株, ライノウイルス8株, アデノウイルス52株, エンテロウイルス147株, 肺炎マイコプラズマ18株が分離された。エンテロウイルス・アデノウイルス・肺炎マイコプラズマはインフルエンザシーズンにも分離されており注意が必要であった。口腔内所見や症状の一視点から病原体を鑑別することは困難であるが, 季節・口腔内所見・症状・流行状況などを総合的に判断することにより, ある程度の病原体の鑑別は可能であった。

## 開業医からみたパラインフルエンザ感染症

板垣 勉, 水田 克巳, 安孫子 千恵子, 村田 敏夫

日本小児科医学会会報 30,163-166,2005

2002年1月より2004年12月までの3年間に急性気道感染症4,250検体から132検体133株のパラインフルエンザウイルスを分離した。初診時の臨床症状・理学所見・経過中の症状変化を分析し、特徴的乾性咳・口腔内所見より流行の推測が可能であった。1型では先行する発熱と気道外症状が多くみられた。最終的下気道炎の発生は19.7%であった。

## Frequent importation of enterovirus 71 from surrounding countries into the local community of Yamagata, Japan between 1998 and 2003

K MIZUTA, C ABIKO, T MURATA Y MATSUZAKI, T ITAGAKI,  
K SANJOH, M SAKAMOTO, S HONGO, S MURAYAMA and K HAYASAKA

J.Clin.Microbiol. 43:6171-6175,2005

Phylogenetic analysis of 45 enterovirus 71 (EV71) isolates for 6 years in Yamagata, Japan, clarified that the annual outbreak of hand-foot-and-mouth disease was due to four genetically distinct subgenogroups, including a novel "B5." Our results suggest that the importation of EV71 from surrounding countries has had a major epidemiological impact on the local community used in our study.

## 2 学会発表

**ESRラジカルイムノアッセイ法による空中カモガヤ花粉抗原(Dac g)の高感度測定法の開発**

高橋裕一, 青山正明

日本花粉学会第46回大会, 2005年9月, 千葉市

(目的) 我々はイネ科花粉症患者の発症原因となるアレルゲンの空中濃度を高感度に、かつ迅速に測定できる方法を検討している。先に共同演者の青山が開発したESRラジカルイムノアッセイ法を用いればスギ花粉のCry j 1を超高感度に測定できることがわかった。今回はカモガヤ花粉抗原について検討した。

(方法および結果) 測定条件を種々検討した結果、以下の手順が最適な手順とわかった。つまり、Dac g 感作プレートに標準液の希釈系列または大気試料抽出液を分注し、2,000倍に希釈したHRP標識抗Dac g抗体を注入し30分反応させた。エルジアF用洗浄液にて洗浄後、p-AP(4mM)、HTIO(0.34mM)と過酸化水素(0.01%)を含む基質緩衝液150  $\mu$ lを加え37°Cで30分反応させた。100mM  $\text{NaN}_3$ で酵素反応を停止させ、酵素反応の結果生成した安定ニトロキシドラジカルの量をESR(FR30, JEOL)にて測定した。この条件で2005年5月25日～6月17日まで採取した大気試料についてDac g濃度とイネ科花粉数を測定したところ弱い正の相関が得られた。Dac gの感度はイネ科花粉1個を検出できる程度であった。反応時間を延長すればさらに高感度な測定が可能になると考えられた。

**大気自動捕集装置による大気試料捕集と空中Cry j 1 測定**沼澤聡明, 高橋裕一, 北浜静夫,  
大野壺永, 青山正明

日本花粉学会第46回大会, 2005年9月, 千葉市

**【はじめに】**

我々は、空中花粉アレルゲンを効率良く捕集し、迅速にアレルゲン濃度を測定する方法を検討している。東亜DK K製の浮遊粒子状物質測定装置(DUB-12)で捕集した大気試料中のCry j 1をELISA法にて測定した。得られた値を同一敷地内で測定したリアルタイム花粉モニター(KH-3000)で得られた値と比較した。

**【方法】**

大気試料はDUB-12で6時間間隔(0～6時, 6～12時, 12～18時, 18～24時)で捕集した。DUB-12はテープ状濾紙に粒子状物質を捕集する装置である。捕集流量は1m<sup>3</sup>/hrである。捕集後の濾紙は試料ごとにカットし0.1% BSAを含む0.125M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ の60  $\mu$ lで2時間抽出した。抽出後の試料はELISA法にて定量した。抗体は林原生化学工業製の抗Cry j 1 mAb(固相化抗体 013, 酵素抗体 053)をそれぞれ5  $\mu$ g/ml, 0.5  $\mu$ g/mlに希釈して用いた。

**【結果及び考察】**

2005年春のスギ花粉飛散ピーク期では空中Cry j 1濃度とKH-3000からの値は、両者のピークが一致する場合もあったが、大きく食い違う場合もあった(4月8日の6時～12時)。後者の理由としては、①KH-3000は花粉以外の大気浮遊粒子もカウントすること、②Cry j 1測定では花粉粒子以外に微粒子状のCry j 1も測定することなどによると考えられる。

## 山形県に採取木として導入されているスギの花粉中のCry j1量とクローン内変異

渡部 公一, 沼澤 聡明, 小野瀬 浩司, 高橋 裕一

日本花粉学会第46回大会, 2005年9月, 千葉市

【目的】林業においては成長・形質・諸被害への耐性に優れた品種を選抜し、種子を生産してきた。近年、スギ花粉中のアレルゲン含量に大きな個体間差があることが明らかになった。そこで、山形県の採種園を構成している主要クローンのCry j1含量を調査し、クローン間での違いがどれだけあるかを調べた。また、環境要因の影響を調べるため、一個体のスギから育成した2年生挿し木苗から採取した花粉を試料として調査した。

【方法】山形県のスギ採種園(羽黒町)を構成している精英樹55クローンから1クローン当たり3~15本のスギの花粉を採取し供試材料とした。それとは別に、Cry j1含量が極めて少ないと確認されたスギの一個体から24本の挿し木苗を作り、2年生時にジベレリン処理して採取した花粉中のCry j1量を測定した。

【結果】供試した精英樹304本のCry j1量の平均は花粉1g当たり429 $\mu$ gであり、個体間での最小値は5 $\mu$ g、最大値は956 $\mu$ gであった。クローン間で比較すると最小68 $\mu$ g、最大745 $\mu$ gで約11倍の差があった。1g当たり400 $\mu$ g以上のCry j1を多く含むスギが全体の73%を占めていた。このことから花粉量の多少を考慮しなければ、採種園の構成クローンをアレルゲン含量が少ない精英樹に入れ替えることによって、花粉症対策としての効果が期待されると考える。

## ESRラジカルイムノアッセイ法, ラテックス凝集反応による空中Cry j1, Cry j2測定と症状スコアとの関係

高橋 裕一, 青山 正明, 安部 大介

第55回日本アレルギー学会秋季学術大会, 2005年10月, 盛岡市

(目的) 日々の空中Cry j1濃度, 空中Cry j2濃度を測定し同一地域で得られた患者の症状スコア, スギ花粉数との関係を調べ情報の有用性を検討した。

(方法) 大気試料は日ごとに採取した。ESRラジカルイムノアッセイ法(ESR法)によるCry j1の測定は先に報告した方法(アレルギー 2004; 53: 1088-1090.)に従った。ラテックス凝集反応(ラ法)はサイクロンサンプラー(Burkard M90: サイクロン法)で採取した大気試料抽出液を倍々に希釈し林原製の抗Cry j1抗体で感作したラテックスと反応させ, 2時間後の凝集の有無を肉眼で判定した。患者の発症状況は昨年と同様に携帯電話ユーザーからのデータを利用した。ダーラム法で採取した試料の一部もラ法の試料とした。

(結果及び考察) Cry j2はMOPS緩衝液では不安定ですみやかに失活した。PBS中では, 室温下で少なくとも一晩は安定であった。空中Cry j1とCry j2の測定値を比較検討すると, 乖離例が認められたことから, Cry j2の情報も価値があると思われる。ダーラム法とサイクロン法で採集したラ法の結果は, 比較的良い一致をみた。ダーラム法の試料を用いれば既存の設備でCry j1やCry j2濃度の測定が可能と考えられる。

## 山形県内陸部における空中真菌及びアルテルナリアアレルギーの調査

鈴木道子, 高橋裕一, 安枝浩, 齊藤明美

第55回日本アレルギー学会秋季学術大会, 2005年10月, 盛岡市

【目的】山形県内陸部の空中真菌の種類調査, 及びアルテルナリア胞子(ア胞子)の季節変動, アルテルナリアアレルギー(Alt Ag)の日内変動を検討した。

【方法】真菌数測定は, ポテトデキストロース寒天培地5枚を, 置賜保健所屋上に10分間放置し, 捕集後25°Cの恒温器で3日~7日間培養後, 種類を同定した。ア胞子の調査はバーカード捕集器で行った。同時に捕集した試料の一部でAlt Agを測定した。試料はニトロセルロース膜に転写し, 抗アルテルナリア抗体(ウサギ血清)を用いて酵素免疫学的な処理を行い時間ごとのスポットをカウントした。

【結果】空中真菌はアルテルナリア, ペニシリウム, クラドスポリウム等の属が認められた。ア胞子は7月~8月に多くかった。10月にはほとんど認められなかった。Alt Agは午後と22時~6時に多くみられた。

## LC/MS/MSを用いた食中毒サンプル等のアコニチン系アルカロイドの迅速分析

笠原義正, 伊藤健, 早坂晃一

第126年会日本薬学会, 2006年3月, 仙台市

我々は既に健康危機管理の観点からトリカブト属植物の若葉の誤食による中毒原因を特定するために, その毒成分である4種のアコニチン系アルカロイドをHPLC-UVやGC/MSで迅速に測定する方法を検討してきた。しかし, 夾雑物の多いトリカブトの葉や中毒患者の胃の洗浄液などの迅速分析が困難であった。

そこで, LC/MS/MSを用いてアコニチン系アルカロイドの迅速で高感度な分析方法を検討したので報告する。

山形市および寒河江市から採取したトリカブト属植物を用い, 固相抽出(Waters社製OASIS HLB)によりアコニチン系アルカロイドを抽出し, 試験溶液とした。食中毒関連のサンプルについても同様に行った。装置は, HPLCにAgilent社製1100シリーズ, MS/MSにApplied Biosystems社製API2000を用いた。イオン化法はESI法でポジティブモードによるマルチプルリアクションモニタリング(MRM)を用いた。HPLCカラムは逆相系ODSを使用し, 移動相は5 mM酢酸アンモニウム:THF:アセトニトリルのグラジェントを用いた。

上記測定条件で4種のアコニチン系アルカロイドが20分以内に良好なピークとして分離した。検量線は絶対検量線法で5-100ppbの範囲で直線性が得られた。トリカブトと誤認されやすいニンソウに添加したものの回収率は各アコニチン系アルカロイドで90%以上と良好であった。またHPLC-UV法では夾雑物の影響で分析できなかったトリカブトの葉および患者の胃洗浄液からも検出可能であった。この分析法は, 従来のHPLC-UV, GC/MS法に比べて, 感度が高く, 前処理方法が簡便である。そのため, 迅速確実な方法が求められる健康危機管理の観点から, 有用な方法であることがわかった。

## スギヒラタケ成分中のUPLC/TOF MSによるメタボロミクス解析

佐々木 秀輝, 穂山 浩, 近藤 一成,  
天倉 吉章, 笠原 義正, 米谷 民雄

第126年会日本薬学会, 2006年3月, 仙台市

2004年秋に, スギヒラタケ摂取によると見られる原因不明の急性脳症が60数例報告された. 本研究ではスギヒラタケ中に含まれている代謝産物を網羅的に分析し, 採取地域による代謝産物の差を主成分分析により検出し, その差異を地域間で比較することにより原因成分を推測した.

凍結乾燥粉末を10 mg 秤量後, 1 mlのメタノールを加え, 10分間超音波で抽出した後, 上清を試料としUPLC/TOF MSで分析した. UPLC条件: (システム) Acquity UPLC, (カラム) Acquity BEH C18 100 x 2.1 mm I.D., 1.7  $\mu$ , (移動相) 5 mM酢酸アンモニウム水溶液とメタノールによるグラジェント, (流速) 0.3ml/min, (カラム温度) 40°C, (注入量) 5  $\mu$ l. TOF条件: (システム) LCT-Premier, Wモード (分解能約10,000), ESIポジティブによるイオン化, ロックスプレー使用 (0.1 $\mu$ g/ml Leu-enkephaline), 脱溶媒ガス温度300°C, 脱溶媒ガス流量1,200l/Hr, キャピラリー電圧4,000V, スキャン時間0.2sec.

UPLC/TOF MSで検出できた全てのピークレスポンスをMarkerLynxソフトウェアで計算し, 主成分分析を行った. この結果, 「スギヒラタケ群と市販きのこ群 (シイタケ, マイタケおよびシメジ)」とが群で分けられ, さらにスギヒラタケ群は「脳症報告例なし」, 「数件の報告例がある」, 「(死者を含む) 多数の報告例がある」の3群に分類できた. 「多数の報告例がある」地域群のスギヒラタケで共通して検出され, 他の群で検出されないピークを抽出したところ, m/z 344.244 (M+NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) が特徴的な成分であると考えられた. 組成分析の結果からC<sub>18</sub>H<sub>30</sub>O<sub>5</sub>・NH<sub>4</sub>と推定された. フラグメント情報からは水酸基およびカルボキシル基が存在すると見られ, 過酸化脂質・プロスタグランディン様物質が推測された.

## 最近分離された肺炎マイコプラズマの薬剤感受性

岡崎 則男, 大屋 日登美, 成田 光生,  
大谷 勝実, 佐々木 次雄

第79回日本感染症学会総会, 2005年4月, 名古屋市

2000年4月~2004年3月に, 北海道, 山形県, 神奈川県及び高知県で分離された87株の肺炎マイコプラズマ (肺炎マ) の薬剤感受性を調べ, 併せてマクロライド (Mac) 耐性菌の遺伝子変異を解析した. 肺炎マ分離株13株 (15.3%) がMac耐性であった. これらの耐性株のうち, 10株は23S rRNA遺伝子の2063位のアデニン (A) がグアニン (G) に置換 (A2063G) しており, 他の3株はA2063C, A2064GあるいはC2617Gであった. 1998年以前の肺炎マ分離株296株にMac耐性株は認められなかったことから, 今回の成績は国内においてMac耐性肺炎マが最近数年間で急増したことを示すものと思われた.



## 本邦における *Helicobacter pylori* 分離株の *cagA*・*babA*・*sabA* 遺伝子陽性率の検討

邵 力, 武田弘明, 大谷勝実, 福井忠久,  
石井健一, 川田純男, 深尾 彰

第47回日本消化器病学会, 2005年10月, 神戸

【背景・目的】*Helicobacter pylori* (Hp) 菌体接着因子 *sabA* は最近 *in vitro* で Hp における重要な毒素因子であることが証明された。しかし、臨床的に得られた Hp 株における陽性率はいまだ不明である。そこで我々は簡便で確実性のある multiplex PCR 法を確立し、胃粘膜病変を有する患者から分離された Hp156 株における *cagA*・*babA*・*sabA* 遺伝子陽性率を調査した。【方法】Hp10 株から分離された *sabA* 遺伝子の全塩基配列に基づき、*sabA* を検出するための PCR プライマーをデザインし、その有効性を検討した。さらに、*cagA*・*babA*・*sabA* を同時に検出するための multiplex PCR 法を確立した。またこの方法を用いて、胃・十二指腸潰瘍患者から分離された 156 Hp 株についてこれら 3 つの遺伝子の陽性率を調査した。【結果】*sabA* プライマー使用下では、無作為抽出した分離 Hp 株 15 株全てで *sabA* 陽性であったが陰性コントロール群は全て陰性であり、特異性の高さが示された。また、過去に報告されているプライマーでは 60 株中 31 株のみ *sabA* 陽性であったが、今回作成したプライマーでは 58 株が陽性であり、同時に感度も高い結果となった。multiplex PCR と single PCR についての一致性を検討したところ *cagA* ( $\kappa=1.00$ ), *babA* ( $\kappa=0.52$ ), *sabA* ( $\kappa=0.58$ ) であった。multiplex PCR を用いた分離 156 株の陽性率は *cagA* 98.1%, *babA* 92.3%, *sabA* 94.2% であった。【結語】*cagA*・*babA*・*sabA* を同時に検出するための簡便で確実な multiplex PCR 法を開発した。また、同方法を用い、本邦での分離 Hp 株における *cagA*・*babA*・*sabA* 遺伝子の保有状況を検討したところ、いずれもきわめて高い陽性率であることが明らかとなった。

## 山形県における過去10年間のつつが虫病発生状況

大谷 勝実

第49回山形県獣医技術研修会, 2005年6月, 山形市

山形県のつつが虫病患者発生届出は、過去10年間で94人あった。患者発生時期は5月を中心とした春～初夏の時期に多く、10月を中心とした秋にも発生が少しみられた。これはツツガムシの幼虫の活動時期と一致するためと考えられる。患者の性別は男33人、女61人で理由は不明であるが女性の患者が多い。患者は県内4地域全てからあるが、人口比で見ると患者発生に地域的な偏りがあり、最上地方に発生が多く認められた。抗体価から推定される感染病原体の血清型は、Karpが69人と最も多く、次いでGilliamが15人であった。その他にShimokoshiが3人、Kawasakiが1人みられ、不明のものが6人あった。PCRは平成11年以降の56人の患者（平成17年の患者2人を含む）中45人で実施し、25人（55.6%）から病原体遺伝子が検出された。PCRによる遺伝子検出は早期診断に極めて有効であり、今後検出率の向上に向けた検討が必要である。

## 牛から分離された腸管出血性大腸菌O157およびO26の細菌学的、 分子遺伝学的性状

大谷 勝実, 池田 辰也, 瀬川 俊夫, 高橋 雅輝, 浅見 成志,  
佐藤 博, 神田 隆, 井田 正巳, 佐藤 克巳,  
中本 成彦, 重茂 克彦, 品川 邦汎

第9回腸管出血性大腸菌感染症シンポジウム, 2005年6月, 盛岡市

腸管出血性大腸菌 (STEC) O157は, 高率に牛が保有していることが認められている。ウシ由来STECの細菌学的及び分子遺伝学的性状を明らかにすることは, ヒトのSTEC感染症の疫学上重要である。全国各地のウシから分離したSTEC O157 92株及びO26 22株について血清型, 病原因子遺伝子型, 薬剤耐性プロファイルを精査し, パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) により遺伝学的関連性を検討した。STEC O157の血清型はO157:H7 (86株), O157:H- (3株), O157:H12 (3株) であった。O157:H7及びO157:H-ではすべて*stx*及び*eaeA*陽性であった。O157:H12 (3株) は*stx*及び*eaeA*陰性であった。STEC O26の血清型はO26:H- (13株), O26:H11 (7株), O26:H40 (2株) であった。O26:H-及びO26:H11はすべて*eaeA*陽性だったが, *stx*はH-の11株, H11の5株が陽性であった。O26:H40 (2株) は*stx*, *eaeA*陰性であった。O157は70/92株が感受性で, 22株がABPC, SM, TCに対し1~3剤耐性であった。O26は17/22株が感受性で, 5株がABPC, SM, TCに対し1~3剤耐性であった。PFGE解析では, それぞれ分離された菌株の地域及び農場などによって特有のパターンが観察されたが, 地域をまたがって共通なバンドパターンが存在することはなく, それぞれの地域で特有のSTECが保持されていることが推定された。

## 山形県におけるヒトメタニューモウイルスの疫学

水田 克巳, 安孫子 千恵子, 村田 敏夫, 青木 洋子,  
板垣 勉, 松崎 葉子, 本郷 誠治

第59回日本細菌学会東北支部総会, 2005年8月, 山形市

【目的】山形県におけるヒトメタニューモウイルス(hMPV)の疫学解明。

【対象と方法】2004年1月から2005年5月に病原体定点で採取した2,753検体からマイクロプレート法によりウイルス分離を実施した。hMPV分離株について, F蛋白領域の一部 (381塩基) の遺伝子解析を行った。

【結果と考察】VERO E6細胞により, 2004年は2-4月の検体から21株, 2005年は3-5月の検体から, 15株のhMPVを分離した (6月1日現在)。これらのことから, hMPVは山形県内で3-5月頃, 5歳以下の小児を中心に流行することが明らかになりつつある。2004年の分離株の遺伝子解析を実施した結果, 21株中17株は塩基配列が完全に一致し, すべての株間の相同性は95%以上となっており, 少なくとも2004年は同じGenogroupの株が流行していたことがわかった。

## 2004年に流行したC型インフルエンザウイルスの性状解析

松 寄 葉 子, 菅 原 勘 悦, 高 下 恵 美, 村 木 靖,  
本 郷 誠 治, 水 田 克 巳, 西 村 秀 一

第59回日本細菌学会東北支部総会, 2005年8月, 山形市

【目的】 これまでに明らかになったC型インフルエンザの疫学的特徴として次の3点が挙げられる。1) ほぼ1年おきに流行がおきる。2) 抗原性の異なる複数のグループが共存している。3) 遺伝子再集合が頻繁におきている。昨年報告した2002年の流行に引き続き, 2004年に山形, 宮城の両県で合計78株のC型ウイルスを分離する大きな流行を捉えることができた。このC型ウイルスの抗原解析ならびに遺伝子解析を行ったので, その結果を報告する。

【対象と方法】 ウイルス分離: 各地の医療機関を受診した患児から採取した咽頭拭い液をMDCK細胞に接種することによる。抗原解析: 抗HE単クローン抗体を用いたHI試験。遺伝子解析: RT-PCRによる増幅産物を用いて7つの遺伝子分節の配列を決定。系統樹はN-J法により作成。

【結果と考察】 分離状況: 山形県では2004年の4月と5月に31株, 宮城県では1月末から6月にかけて47株のC型ウイルスが分離された。抗原解析: C型ウイルスは5つの抗原グループ(山形/81, 愛知/81, MS/80, サンパウロ/82, 神奈川/76)に分けることができる。これまでに解析した58株は, 48株が神奈川/76グループで7株が山形/81, 1株がMS/80グループであった。また, 山形で10年ぶりにサンパウロ/82グループが2株分離された。遺伝子解析: 主流株である神奈川/76グループの各遺伝子分節は, 2002年に流行したウイルスと同じであった。山形/81グループは, 96, 98, 2000年に主流株であったウイルスと同じであり, 少数ながら共存を続けていることが明らかになった。山形で2株分離されたサンパウロ/82グループの遺伝子分節の構成は, 10年前に分離されたものとは全く異なっていた。NPとM遺伝子は1999年にマレーシアから帰国した旅行者から分離された株と酷似し, 残りの4分節は神奈川/76グループに由来する新しい遺伝子再集合体であることが判明した。海外から侵入したC型ウイルスが既存のウイルスとリアソートメントを起こして拡がっている可能性が示唆された。

## Norovirus(NV)感染後のウイルス排泄期間

村 田 敏 夫, 水 田 克 巳, 勝 島 矩 子,  
松 寄 葉 子, 村 木 靖, 本 郷 誠 治

第59回日本細菌学会東北支部総会, 2005年8月, 山形市

<目的> 2002年1月, 県内の温泉旅館においてNorovirus(以下Noro)による集団感染事例が発生した。旅館従業員について検便を行ったところ, 複数の従業員から複数回にわたりNV遺伝子が検出された。NVの排泄期間を検討するために, 旅館従業員と小児の急性胃腸炎患者を対象に追跡調査を行った。

<対象と方法> 集団発生事例の旅館従業員5名から採取した糞便16検体と, 医療機関を受診した小児の急性胃腸炎患者27名から採取した糞便86検体を材料とした。検体からRT-PCR法でNV遺伝子の検出を行った。

<結果と考察> 旅館従業員5名からは, 最長で18日後までNV遺伝子が検出された。小児の急性胃腸炎患者では, およそ1週間から2週間のあいだNV遺伝子が検出され, 1ヶ月以上検出された小児が3例認められた。有症者の多くは, 胃腸炎症状が数日で改善することから, 症状改善後も長期間ウイルスを排泄することによって新たな感染源となっていることが予測された。

## と畜場に搬入されたウシにおける腸管出血性大腸菌O157およびO26の保有状況

大谷 勝実, 池田 辰也, 瀬川 俊夫, 高橋 雅輝,  
浅見 成志, 佐藤 博, 神田 隆, 井田 正巳,  
佐藤 克巳, 中本 成彦, 重茂 克彦, 品川 邦汎

第59回日本細菌学会東北支部総会, 2005年8月, 山形市

腸管出血性大腸菌 (STEC) は, 高率にウシが保有していることが報告されており, 本菌のレザボアとして重要視されている. 今回, と畜場に搬入されるウシのSTEC O157およびO26の保有状況について, 全国的調査を行った. 2004年7月から2005年2月にかけて, 全国の各と畜場に搬入されるウシの直腸内容物および口腔内唾液について STEC O157およびO26の保菌状況を調べた. その結果, 直腸内容物551検体中STEC O157は60検体 (10.9%) が陽性, STEC O26は7検体 (1.3%) が陽性であり, 口腔内唾液531検体では, STEC O157は11検体 (2.1%), STEC O26は2検体 (0.4%) が陽性であった. 全体的にウシのSTEC O157保有率は高く, 前回の全国調査に比べ上昇傾向が認められた. さらに, STEC O157陽性牛53頭から分離したO157 92株, およびSTEC O26陽性牛からの分離菌22株について, 血清型, 病原因子遺伝子型, 薬剤耐性プロファイル, PFGE解析をおこなったので, その結果も併せて報告する.

## リバース・ジェネティクスによるC型インフルエンザウイルスの作製

村木 靖, 村田 敏夫, 菅原 勘悦,  
高下 恵美, 松崎 葉子, 本郷 誠治

第59回日本細菌学会東北支部総会, 2005年8月, 山形市

【背景と目的】われわれは, クローン化したcDNAを293T細胞にトランスフェクションすることにより, C型インフルエンザのウイルス様粒子 (VLP) の作製に成功した. さらにこの系を用いて, 粒子の裏打ちをするM1蛋白の24位のアミノ酸 (AlaまたはThr) がVLPの形態 (繊維状または球形) に関与することを報告した. 今回は, この変異が感染性ウイルスの形態や増殖に及ぼす影響を検討するために, リバース・ジェネティクスでM1蛋白の24位に変異を持つC型ウイルスを作製した.

【材料と方法】C/AA/1/50株の7本のRNA遺伝子のcDNAを, それぞれウイルスRNA発現用プラスミドにクローニングした. これらをウイルス蛋白発現用プラスミドとともに293T細胞にトランスフェクションした. 同様にM1蛋白の24位にAla→Thrの変異を導入した変異ウイルス (MG96A) を作製した.

【結果と考察】1. MG96AはRecombinantのC/AA/1/50 (wild type, WT) と同様の効率で作製できた. 2. 発育鶏卵で増殖させたWTは桿状から繊維状形態を示したが, MG96Aは球形であった. 3. HNV-II細胞で増殖したWTの形態は桿状から繊維状であった. MG96Aは, 球形の粒子の他に多形性を示すものも多く見られた. 全体として発育鶏卵由来の粒子ほどの形態上の差異は観察されなかった. 粒子の形態は宿主の因子によっても影響を受けることが示唆された. 4. HNV-II細胞ではWTはMG96Aの5倍程度よく増殖した. 現在, 感染細胞内でのウイルス蛋白の合成や挙動を比較している.

## Reverse genetics study of influenza C virus

Y MURAKI, T MURATA, K SUGAWARA, E TAKASHITA, Y MATSUZAKI and S HONGO

XIII International Congress of Virology San Francisco California USA, July, 2005

### Background

We previously reported plasmid-driven system for generation of influenza C virus-like particles (VLPs), by expression an artificial vRNA-like reporter gene and nine viral proteins from cloned cDNAs. Using this system, we suggested that an amino acid at residue 24 of the influenza C virus M1 protein is a key determinant for morphology (filamentous/spherical) of the virus, based on the following observations: 1) cords 50-300 nm in length, were observed on the transfected 293T cells when M1 protein having Ala at residue 24 was expressed, 2) no cords were detected when M1 protein having Thr at the residue was expressed, and 3) morphology of the generated VLP was filamentous in the case of 1), whereas VLPs in 2) displayed spherical.

To investigate the role of the amino acid substitution in virus morphology and replication, we attempted to generate recombinant influenza C viruses, which have Ala or Thr at residue 24 of M1 protein, by plasmid-based reverse genetics.

### Methods

Full-length cDNAs of seven RNA genomes of C/Ann Arbor/1/50, a representative strain which has Ala at residue 24 of M1 protein, were individually amplified by PCR and cloned between RNA polymerase I promoter and terminator of the Pol I vector. The resulting plasmids were transfected into 293T cells together with virus protein-expressing plasmids. At 48 h p.t., virus titer in the supernatant of the 293T cells was determined using embryonated chicken eggs. To generate a mutant virus (MG96A) having Thr at residue 24 of M1 protein, a mutant M gene cDNA was cloned and transfected.

### Results

1. Recombinant C/Ann Arbor/1/50 (wild type) virus was obtained at 103.0 EID<sub>50</sub> /ml when nine virus proteins (PB2, PB1, P3, NP, HE, M1, CM2, NS1 and NS2) were expressed together with seven RNA genomes in the cells.
2. When PB2, PB1, P3, NP proteins and seven RNA genomes were expressed, the recombinant wild type virus was recovered at 101.5 EID<sub>50</sub> /ml.
3. MG96A was rescued at efficiency similar to that of the wild type virus.
4. Cords were frequently observed on recombinant wild type-infected HMV-II cells, though no cords were detected on MG96A-infected cells.
5. Growth characteristics and morphologies of the recombinant viruses will be described.

### Conclusion

Infectious influenza C virus has been successfully rescued by plasmid-based reverse genetics

## マイコプラズマ感染症の臨床診断は難しい

板垣 勉, 大谷 勝実, 池田 辰也, 最上 久美子

第15回外来小児科学会, 2005年8月, 大阪市

「目的」 感染症サーベイランスへのマイコプラズマ肺炎の登録が最近増加している。分離培養法・二段階PCR法・免疫カードマイコプラズマ（迅速診断）の再評価を試みた。

「対象」 平成15年10月より16年12月までに乾性咳を訴えて来院した抗生剤未服用者168名の咽頭ぬぐい液・鼻汁吸引液を用いて分離培養と二段階PCR法について検討し、同時に迅速診断を行なった49名とPCR法について検討した。

「結果」 PCR法では増菌前20検体、増菌後26検体が陽性、培養法では24検体で陽性で一致率98.8%と良好であるが、最初のPCR法では6検体（23.1%）の偽陰性を示した。PCR法と迅速診断49例の年齢別陽性率は0～2歳0.0%・60%、3～5歳19.0%・42.9%、6歳以上33.0%・38.9%でPCR法では年齢と共に漸増し迅速診断では漸減した。一致率・感度・特異度は51.0%・40.0%・53.8%と低かった。

「考察」 感染症サーベイランス登録数は迅速診断を導入してから5歳未満児で急激に増加し、一般に流行の少ない初春から夏にかけての平成16年度登録数はヒトメタニューモウイルス・インフルエンザC型・パラインフルエンザ3型の当医院の分離数と類似しており、過剰診断の可能性について述べた。感染力の弱いマイコプラズマであるが、抱っこなどの生活習慣から濃厚な感染・再感染の場が乳幼児期に多くあり、低年齢児では抗体保有率が高く維持されることが推測された。迅速診断がライン化・半定量化できるものに改良されると良いと思われ、迅速診断・PCR法のそれぞれに欠点があることを理解して診断する必要があると考えた。

## 山形県の掛け流し温泉における病原微生物汚染実態調査

最上 久美子, 村田 敏夫, 大谷 勝実

第32回山形県公衆衛生学会, 2006年3月, 山形市

厚生労働科学研究費補助金・健康科学総合研究事業「掛け流し式温泉における適切な衛生管理手法の開発等に関する研究」の一環として行ったもので、山形県内の「掛け流し式温泉」の微生物汚染実態調査についてまとめた。調査対象温泉施設は、毎日完全換水をしている村山地区3施設（A, B, C）、最上地区2施設（D, E）、庄内地区2施設（F, G）及び置賜地区2施設（H, I）の計9施設とした。調査は平成17年9月に行った。検査は浴槽に入る湯口水及び浴槽水を対象とし、営業終了時に採水した。検査項目はレジオネラ属菌数、アメーバ数、一般細菌数、従属栄養細菌数、大腸菌群数、大腸菌数、緑膿菌数、黄色ブドウ球菌数及び抗酸菌とした。レジオネラ属菌が検出された施設については随時再調査（検査項目はレジオネラ属菌数、一般細菌数及び従属栄養細菌数）を行った。レジオネラ属菌は、湯口では施設Eからのみ検出された。浴槽からは、施設D, E, F, G, H及びIの6施設で検出され、検出数は $10^1$ 台が3施設、 $10^2$ 台が2施設、 $10^3$ 台が1施設であった。アメーバの検出はレジオネラ属菌の検出と関連性がみられた。一般的な汚染の指標となる一般細菌、従属栄養細菌は施設Eを除く施設の湯口での菌数は、 $10^2$ /ml以下であったが、施設Eの従属栄養細菌は $10^4$ /mlであった。浴槽では一般細菌が $10^1$ /ml～ $10^5$ /ml、従属栄養細菌が $10^3$ /ml～ $10^6$ /mlと施設により菌数の幅が大きかった。大腸菌、緑膿菌及び黄色ブドウ球菌は全ての施設とも湯口からは検出されなかった。浴槽では、大腸菌が6施設で、緑膿菌、黄色ブドウ球菌は7施設で検出された。抗酸菌は全ての施設とも湯口、浴槽から検出されなかった。レジオネラ属菌が検出された施設は、浴槽の清掃の徹底等により、3施設でレジオネラ属菌の不検出又は大幅な減少が認められた。

## 山形のカゼを考える

板 垣 勉, 衛生研究所微生物部

東北外来小児科研究会, 2005年7月, 山形市

2004年1月より12月までの急性気道感染症1,178名(ウイルス1,178名・肺炎マイコプラズマ102名)の咽頭ぬぐい液と鼻汁吸引液を用いてウイルスの分離と肺炎マイコプラズマの分離を行なった。その結果インフルエンザ(A/B/C)61株・パラインフルエンザ58株・アデノウイルス52株・RSV48株・hMPV21株・ライノウイルス8株・ピコルナウイルス147株・HSV10株・肺炎マイコプラズマ18株の417株が分離された。これらウイルスの分離時期と臨床診断について分析した。

## 2004年のC型インフルエンザの流行と新しい遺伝子再集合の出現

松 壽 葉 子, 菅 原 勘 悦, 高 下 恵 美, 村 木 靖, 本 郷 誠 治,  
水 田 克 巳, 高 尾 信 一, 島 田 慎 一, 鈴 木 宏, 西 村 秀 一

第53回日本ウイルス学会, 2005年11月, 東京

【目的と意義】これまでに明らかになったC型インフルエンザの疫学的特徴として次の点が挙げられる。1) ほぼ1年おきに流行がおきる。2) 抗原性の異なる複数のグループが共存している。3) 遺伝子再集合によって新しく出現した遺伝子再集合体が次の流行株になる傾向が認められる。2004年に山形, 宮城を含む全国9ヶ所の検体から100株を超すC型ウイルスを分離した。全国規模の流行があったものと推定され, 抗原解析と遺伝子解析を行った。その過程で新しい遺伝子再集合体の出現を確認したので併せて報告する。

【対象と方法】ウイルス分離: 各地の医療機関を受診した患児から採取した咽頭拭い液をMDCK細胞に接種することによる。抗原解析: 抗HE単クローン抗体を用いたHI試験。遺伝子解析: RT-PCRによる増幅産物を用いてHE, M, NS遺伝子の全塩基配列とPB2, PB1, P3, NP遺伝子の部分配列を決定した。系統樹はN-J法により作成。

【結果と考察】分離状況: 2004年の1月から6月までの間に, 宮城47, 山形31, 福岡7, 新潟5, 広島5, 神奈川2, 大阪2, 福島1, 埼玉1の計101株のC型ウイルスが分離された。抗原解析: C型ウイルスは5つの抗原グループ(山形/81, 愛知/81, MS/80, サンパウロ/82, 神奈川/76)に分けることができる。これまでに解析した79株は, 65株が神奈川/76グループで10株が山形/81, 2株がMS/80グループであった。また, 山形で10年ぶりにサンパウロ/82グループが2株分離された。遺伝子解析: 山形/81グループの遺伝子分節の構成は, 96, 98, 2000年に流行した同グループのものと同じであった。神奈川/76グループは, 2002年にそれまでの山形/81グループにかわって流行株になったが, HE遺伝子以外を山形/81グループからもらった遺伝子再集合体であった。2004年も引き続き同じウイルスによる流行であることが明らかになった。山形で2株分離されたサンパウロ/82グループの遺伝子分節の構成は, 10年前に山形で分離されたものとは全く異なっていた。NPとM遺伝子は1999年にマレーシアから帰国した旅行者から分離された株と酷似し, 残りの4分節は神奈川/76グループに由来する新しい遺伝子再集合体であることが判明した。海外から侵入したC型ウイルスが既存のウイルスとリアソートメントを起こして広がったとみられ, 今後このウイルスが流行する可能性が考えられた。

## 山形県におけるヒトメタニューモウイルスの疫学

水田 克巳, 安孫子 千恵子, 青木 洋子, 板垣 勉,  
勝島 矩子, 松崎 葉子, 本郷 誠治

第32回山形県公衆衛生学会, 2006年3月, 山形市

### 【目的】

ヒトメタニューモウイルス (hMPV) は2001年に初めて報告されたウイルスであり, 山形の流行状況については全くわかっていない. そこで我々は, 2004~05年の県内におけるhMPVの疫学調査を実施したので報告する.

### 【対象と方法】

2004年1月から2005年12月までに急性気道感染症として病原体定点を訪れた患者 (96%が15歳以下) の鼻咽頭拭い液, 4,112検体からウイルス分離を実施した. ウイルス分離株については, F遺伝子 (441塩基対) について塩基配列を決定し, 遺伝子解析を行った.

### 【結果と考察】

2004年は2-4月に18株, 2005年は3月-11月に60株のhMPVが分離された (図1-A). これらのことから, hMPVの流行については, 冬季を中心とした流行の報告が多いが, 夏季にも流行しうることがわかった.

遺伝子解析をした結果, これまでに報告されている遺伝子型, A1, A2, B1, B2のうちA1を除く3つの遺伝子型が県内で検出された (図2). 2004年はB2を主体とした流行が, 2005年はA2, B1, B2が混合して流行していた (図1-A).

特に5株以上のhMPVが分離された2つの保育園と1つの小学校についてみると, 保育園①では2004年にB2, 2005年の5月にA2, 7-8月にB2が検出されており, 少なくとも1つの保育園で遺伝子型の異なるhMPVの持ち込みが繰り返しおきていること (複数の患者発生から施設内流行が確認できるのは7-8月分のみ) が示唆された (図1-B). 保育園②, 小学校③では, それぞれ2005年4月, 5-6月にかけてA2による流行がおきていた (図1-C, D). これらの結果から, 同一施設における1つの遺伝子型のhMPVの流行は1ヶ月程度続くこと, 異なる遺伝子型の侵入によるhMPVの施設内流行が繰り返しおこりうるということがわかった.

また, 同一患者による2回感染例1例, 家族内感染が疑われる2例を経験した. 2004年3月にB2に感染した3歳女兒が, 2005年4月にB1に感染していた. いっぽう, 2005年の5月と8月に, 5歳の子どもが発熱した翌日に母親が, 2歳の子どもが発熱した2日後に父親がそれぞれ高熱を発し, ウイルスが分離された. 遺伝子型はそれぞれA2とB2であり, 配列はどちらも親子から分離されたウイルス間で100%一致した.

hMPVはこれまで知られていなかったウイルスであったが, 2年間の疫学調査の結果, 県内で季節を問わず小児を中心に流行し, 特に保育園や小学校における施設内流行があること, 家族内感染があることが明らかとなった.

最後に, 感染症発生動向調査事業にご協力いただいた皆様に感謝します.

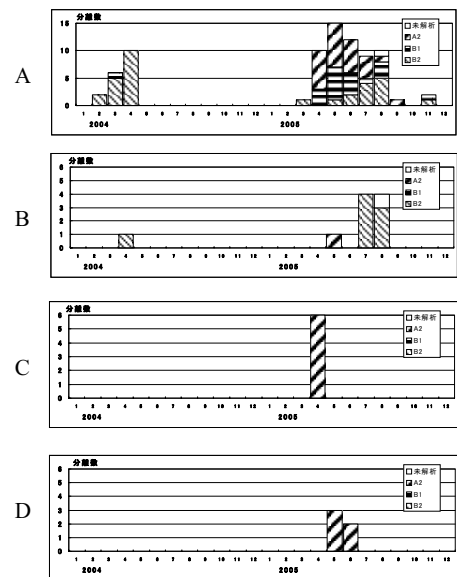


図1 2004-05年の山形県におけるヒトメタニューモウイルスの月別遺伝子型別分離数  
A:全ウイルス, B:保育園①, C: 保育園②, D: 小学校③

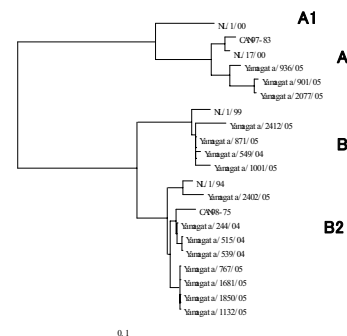


図2 山形で2004-05年に分離されたヒトメタニューモウイルス代表株の進化系統樹