

抄 録

1) 他誌掲載論文

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

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

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

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

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

DESIGN: Case report of laboratory cross-contamination.

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

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

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

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

J Virol. 2018;92:e00682-18.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Epidemiol Infect. 2018;146:1707-1713.

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

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

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

Viruses. 2018;10:417.

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

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

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

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

抄録なし

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

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

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

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

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

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

Vaccine. 2019;37:1109-1117.

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

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

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

Sci Rep. 2019;9:1500.

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

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

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

Vaccine. 2019;37:1964-1971.

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

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

2) 学会発表

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

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

2018.5.6-9, VTEC2018, Florence, Italy.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Methods: We screened a number of EV71 strains and selected virulent EV71 strains belonging to C1, C2, C4, B4 and B5 subgenogroups, respectively. We constructed full-length cDNA of these strains. We prepared the viruses by transfecting in vitro-transcribed RNA into RD-EXT1 KO-SCARB2 cells (RD cells lacking heparan sulfate and overexpressing human SCARB2). EV71 SK-EV006 strain (C2) was purified, inactivated by formalin and mixed with Alhydrogel. We immunized the SCARB2 tg mice twice (at 4- and 8-week-old of age). Sera of the immunized mice were collected and neutralizing titer was determined. The immunized mice were challenged with lethal dose of virulent viruses (at 10-week-old). The mice were observed daily for two weeks.

Results: During passage of the viruses in cultured cells, the virulence of the viruses decrease very rapidly and it was difficult to maintain the virulence. By using RD-EXT1 KO-SCARB2 cells, we were able to propagate virulent

EV71 strains stably. The inactivated EV71 elicited neutralizing antibodies in SCARB2 tg mice. The immunized mice were protected from lethal infection of the viruses with different subgenogroups.

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

パレコウイルス3型による流行性筋痛症・筋炎

水田克巳

第59回日本臨床ウイルス学会シンポジウム，2018年6月9日，於大宮

2008年，山形県内の神経内科医が流行性筋痛症と臨床診断した22名の患者検体について，網羅解析（国立感染症研究所），遺伝子検出・ウイルス分離・中和抗体測定，の組み合わせにより，14名がパレコウイルス3型（HPEV3）に感染していることが判明した．特に7名では，抗体の動きから発症時にHPEV3に感染したと考えられたため，HPEV3による成人の流行性筋痛症として2012年に論文報告し，第53回本学会で発表した．

2011年6-8月に県内の小児においてHPEV3が流行し，同時期に5名の成人筋痛症症例を観察した．ことから，本疾患の再現性を確認するとともに，小児が家庭にウイルスを持ちこみ，感染した親の一部が筋痛症を発症しているのではないかという仮説を提唱し，第54回本学会で報告した．

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

その後，HPEV3の全国的流行があった2014，2016年，流行性筋痛症の散发例を観察したという論文・学会報告が大阪をはじめとして全国からみられるようになり，この疾患は山形の風土病から日本の風土病となった．予後が良好であることから，積極的な診断と治療は不要という考え方もあるかもしれない．しかし，臨床ウイルス学がサイエンスであるならば，この疾患の認知はもとより，臨床及びウイルス学的な診断の普及，症例の蓄積，病態メカニズムの解明，さらには海外にこの疾患が無いのかという問いかけをしていくこと，をめざしていくべきではないだろうか．

山形県衛生研究所の活動を通じて地方衛生研究所の役割を考える

水田克巳

第59回日本臨床ウイルス学会ランチョンセミナー，2018年6月9日，於大宮

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

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

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

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

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

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

第72回日本細菌学会東北支部総会，2018年8月18日，於仙台

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

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

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

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

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

なお、本研究は東北乳酸菌研究会の支援を受けて実施された。

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

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

第66回日本ウイルス学会学術集会，2018年10月28-30日，於京都

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

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

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

usage is an important selection factor for unnatural mutants.

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

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

第66回日本ウイルス学会学術集会，2018年10月28-30日，於京都

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

【Materials and Methods】 NIID-MDCK cells and HPIV3-susceptible Caco-2 cells were co-infected with influenza virus and HPIV3. At 72 hours post-infection, the supernatants of infected cells were harvested and used for the next passages in the respective cells. After each passage, the copy numbers of viral genomes in the cell culture supernatants were determined by a multiplex real-time RT-PCR assay.

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

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

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

第22回日本ワクチン学会学術集会，2018年12月8-9日，於神戸

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

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

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

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

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

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

1 都4県に拡大した麻しんの集団感染を経験して

山田敬子，阿彦忠之，石川仁，水田克巳，瀬戸順次

第77回日本公衆衛生学会，2018年10月24-26日，於郡山

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

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

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

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

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

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

第77回日本公衆衛生学会, 2018年10月24-26日, 於郡山

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

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

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

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

調理加工を行ったツキヨタケ中の有毒成分イルジン S の残存量

大河原龍馬, 篠原秀幸

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

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

2017 年に山形県内で発生したヒスタミン食中毒事例

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

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

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

PCR を用いたトリカブト鑑別法の適用検体の検討

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

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

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

食中毒検体を想定した試料でのトリカブト鑑別法 —第2報—

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

第 45 回山形県公衆衛生学会, 2019 年 3 月 7 日, 於山形

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

残留農薬分析において均一化法が分析値に及ぼす影響

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

第 45 回山形県公衆衛生学会，2019 年 3 月 7 日，於山形

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

テングタケに対する複数の分析法の適用

伊藤育子，太田康介，平健吾，内海浩，阿部英明

第 45 回山形県公衆衛生学会，2019 年 3 月 7 日，於山形

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

2018 年の山形県における百日咳の報告状況について

山田浩貴，小川直美，小松秀一，長岡由香

第 45 回山形県公衆衛生学会，2019 年 3 月 7 日，於山形

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

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

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