

I 調 査 研 究 報 告

短 報

山形県特産果物を対象とした残留農薬分析における均一化法の比較

篠原秀幸, 本間弘樹

Comparison of homogenization methods in pesticide residue analysis for Yamagata prefecture specialty fruits

Hideyuki SHINOHARA, Hiroki HOMMA

食品中の残留農薬分析において、作物中の農薬成分の分布は部位により異なるため、分析試料をサブサンプリングする際の試料の均一性が定量精度に影響する。特に果物類等は均一化の際に果皮や種子等の固形分と、果実由来の水分が分離することがある。

そこで、一般的な室温での均一化法とドライアイスを用いた凍結粉砕法で均一化した試料について、粒度分布、一元配置分散分析、変動係数により均一性を比較した。その結果、凍結粉砕法の方が試料の均一性が高く、サブサンプリングに起因する定量値の変動が軽減される可能性が示唆された。

Key words : 残留農薬分析 pesticide residue analysis, 凍結粉砕 freeze grinding method, 一元配置分散分析 one-way analysis of variance

I はじめに

食品中の残留農薬検査では、試料となる作物中の農薬成分の分布が部位により異なるため、分析試料をサブサンプリングする際の試料の均一性が重要となる。

厚生労働省の公示試験法（GC/MSによる農薬等の一斉試験法（農産物））では、試料約1 kgを均一化した後、分析試料として20.0 gをサブサンプリングする^{文献1}。このとき、試料が適切に均一化されていることを前提としている。しかし、果物類を一般的な室温での均一化方法（以下、室温粉砕法）で均一化した場合、果皮や果実、種子で硬度が異なる等の要因により、果皮や種子の一部が細かく粉砕されないことがある。また、果皮等の固形分と果実に由来する水分で比重等が異なるため、一定時間が経過した際にそれらが分離することがある。このような試料ではサブサンプリングした分析試料の組成に偏り

が生じ、定量精度が低下するおそれがある。一方、ドライアイス等で試料を凍結した後に均一化する方法（以下、凍結粉砕法）では試料が粉末状になり、固形分と水分の分離が抑制できると報告されている^{文献2,3}。このことから、果物類の均一化に凍結粉砕法を用いることで、室温粉砕法と比べて試料の均一性が向上すると考えた。

山形県の特産品にはおうとうや西洋なしなどの果物類が挙げられる。これら特産果物の更なる安全性確保を主眼に置き、果物類を対象とした残留農薬検査の精度向上が必要と考えた。そこで、山形県特産果物を対象に凍結粉砕法による均一化を検討し、粒度分布、一元配置分散分析、変動係数により均一性を室温粉砕法と比較した。なお、一元配置分散分析、変動係数の比較では、実残留試料の代わりに、収穫後に農薬を付着させた試料（以下、模擬残留試料）を用いた。

Ⅱ 材料と方法

1. 試料

おうとう、ぶどう、西洋なし、かき、りんご（山形県内で生産または市販されたもの）

2. 試薬等

1) 農薬製剤（括弧内は有効成分）

日産化学工業製トレファノサイド（トリフルラリン）、ストロビーフロアブル（クレソキシムメチル）、テルスターフロアブル（ビフェントリン）、ダウ・アグロサイエンス日本製ダーズバン乳剤（クロルピリホス）、住友化学製マラソン乳剤（マラチオン）、BASF ジャパン製ゴーゴースン（ペンディメタリン）、日本曹達製コテツフロアブル（クロルフェナピル）。

2) 試薬等

富士フィルム和光純薬製農薬混合標準液 PL-1-2、クロルピリホス標準液、フェナントレン d_{10} 標準液、アセトニトリル、アセトン、トルエン、ヘキサン、無水硫酸マグネシウム（以上、全て残留農薬試験用）、クエン酸三ナトリウム二水和物、塩化ナトリウム（以上、全て特級）、関東化学製クエン酸水素二ナトリウム 1.5 水和物（特級）、ジーエルサイエンス製 InertSep GC/NH2（500 mg/ 500 mg/ 6 mL）

3. 測定機器・分析条件

1) フードプロセッサー

Cuisinart 社製 DLC-NXJ2SS

2) 粒度分布測定装置

日機装製マイクロトラック MT3300ExII

試料は十分混和した後、湿式測定（分散媒：水）で粒径範囲 0.02～2000 μm の粒度分布を測定した。

3) ガスクロマトグラフ質量分析計

Agilent Technologies 社製ガスクロマトグラフ質量分析計（ガスクロマトグラフ：Agilent 7890A，オートサンプラー：Agilent 7693A，質量分析計：Agilent 5975A），カラム：Agilent Technologies 社製 HP-5MS UI（内径 0.32 mm，長さ 30 m，膜厚 0.25 μm ），昇温条件：70 $^{\circ}\text{C}$ （2 min）→25 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ →150 $^{\circ}\text{C}$ （0 min）→3 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ →200 $^{\circ}\text{C}$ （0 min）→8 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ →280 $^{\circ}\text{C}$ （10

min），注入口温度：250 $^{\circ}\text{C}$ ，イオン源温度：230 $^{\circ}\text{C}$ ，四重極温度：150 $^{\circ}\text{C}$ ，インターフェイス温度：280 $^{\circ}\text{C}$ ，キャリアーガス：ヘリウム，注入方法：スプリットレス，注入量：2.0 μL

4. 模擬残留試料の作製

精製水 1500 mL に 2.1) の農薬製剤をそれぞれ 0.5 mL ずつ加えて攪拌した。藤田らの方法^{文献 4}を参考に、この薬液に試料約 3 kg を数秒間浸漬した後、薬液をよく切って 2 日間自然乾燥した。

5. 模擬残留試料の均一化

4. で作製した模擬残留試料 3 kg について食品衛生検査指針を参考に可食部を分離した後、無作為に約 1 kg ずつ 2 回分取し、以下の方法で処理した。なお、均一化時間はいずれも 5 分とした。

1) 室温粉碎

試料約 1 kg を室温にてフードプロセッサーで粉碎、均一化した。

2) 凍結粉碎

千葉ら、佐々野らの方法^{文献 2, 3}を参考に、試料約 1 kg に等量のドライアイスを加えて予備凍結した後、フードプロセッサーで粉碎、均一化した。

6. 凍結粉碎法における均一化時間の検討

ぶどうをモデル試料として、試料約 1 kg を凍結粉碎法により均一化した。均一化開始から 5, 10, 20, 30 分経過後に試料約 10 g を分取し、粒度分布を測定した。得られた粒度分布を統計的手法によって解析し、各均一化時間で比較した。

7. 均一性の評価

1) 外観

各均一化法で処理した試料の外観について、果物の種子や果皮等の固形分と果実に由来する水分の分離を目視で確認した。

2) 粒度分布

各均一化方法により処理した試料約 1 kg から約 10 g を分取し、粒度分布を測定した。得られた粒度分布を統計的手法によって解析し、果物毎に均一化法間で比較した。

3) 一元配置分散分析および変動係数の算出

均一化した試料約 1 kg を等量ずつ 10 分割し、そのうち 5 分割を無作為に選択、それぞれから 10.0 g ずつ 2 回分取した。均一化方法毎に計 10 試料について図 1 に従い試験溶液を調製した後、ガスクロマトグラフ質量分析計で測定し、各農薬成分のクロマトグラムからピーク面積を求めた。得られたピーク面積から農薬成分それぞれについて一元配置分散分析によって区分間/区分内の分散比 F を求め、区分数 5、併行数 2、有意水準 5% に対する棄却限界値 (5.192) と比較した^{文献 5, 6}。加えて、10 試料のピーク面積の変動係数を算出し、均一化法間で比較した。

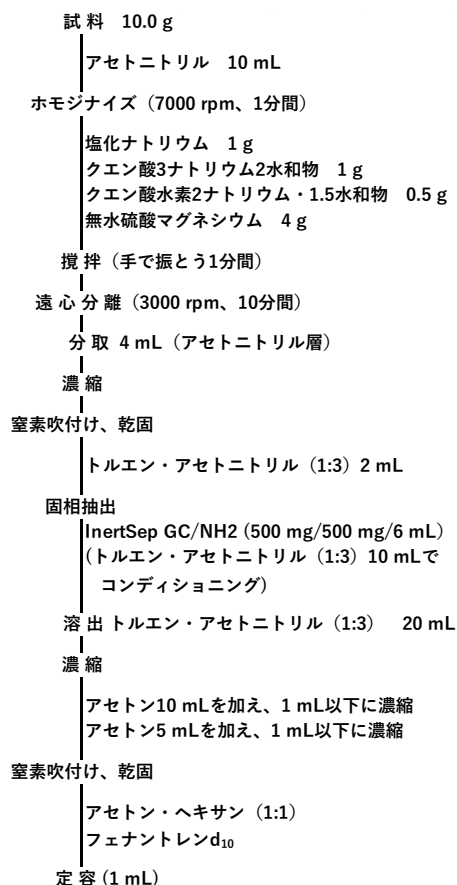


図 1 試験溶液の調製

Ⅲ 結果

1. 凍結粉碎法における均一化時間の検討

各均一化時間で得られた粒度分布について、シャ

ピロ・ウィルク検定を行い各分布の正規性を確認したところ、すべての粒度分布で正規性が棄却された（データ示さず）。そこで、ノンパラメトリック検定であるクラスカル-ウォリス検定により分布の差を比較した。その結果、各均一化時間における粒度分布に差はなかった。外観では均一化時間 5 分で試料全体が粉末状に均一化されており、それ以降では変化がなかった。

2. 均一性の評価

1) 試料の外観

室温粉碎法による均一化では特にぶどう、西洋なしで固形分と水分の分離が顕著だった。かき、おうとうは果実に粘性があり、室温で粉碎すると一部が塊状となり、細かく粉碎することが困難だった。りんごは固形分と水分の顕著な分離はなかったが果皮の一部が粉碎されずに残っていた。

一方、凍結粉碎法で処理した場合には全ての果物が粉末状に均一化され、固形分と水分の分離は見られなかった。ただし、おうとうでは試料の一部が塊状になっていた。

2) 粒度分布

得られた全ての粒度分布についてシャピロ・ウィルク検定により正規性を確認した（図 2）。その結果、全ての粒度分布で正規性が棄却されたため、ノンパラメトリック検定であるコルモゴロフ=スミルノフ検定を用いて果物毎に均一化方法間の粒度分布を比較した。優位水準 0.01 で分布形状に差があったのはかき、りんごだった。おうとうを除く果物において、室温粉碎法と比べ凍結粉碎法で均一化した際に粒径が小さい粒子の頻度が増加する傾向があった。

3) 一元配置分散分析および変動係数

室温粉碎法ではおうとう 1 成分、凍結粉碎法ではおうとうを含む 3 試料延べ 8 成分で分散比 F が棄却限界値以上であった（表 1）。変動係数はおうとう（ピフェントリン、かき（クレソキシムメチル）を除き室温粉碎法に比べ凍結粉碎法の方が小さい値を示した（表 2）。

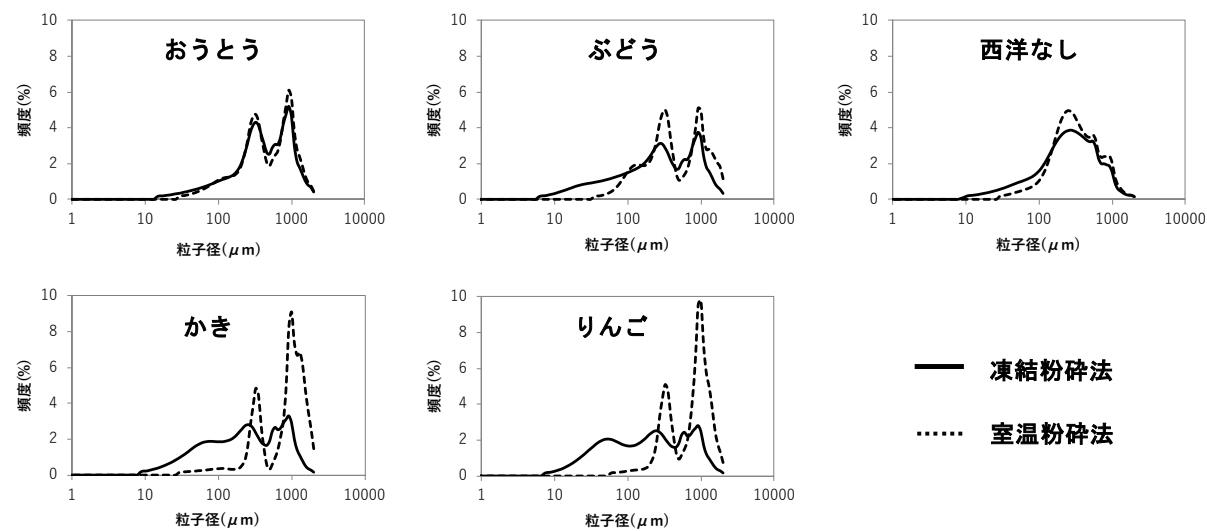


図 2 各作物における均一化後の粒度分布

表 1 各作物における均一化法毎の分散比 F

農薬成分	分散比F									
	おうとう		ぶどう		西洋なし		かき		りんご	
	凍結	室温	凍結	室温	凍結	室温	凍結	室温	凍結	室温
トリフルラリン	4.095	1.809	0.803	1.203	1.484	1.233	0.817	0.817	0.479	0.432
マラチオン	1.382	<u>7.249</u>	1.245	0.562	2.679	1.405	0.234	1.186	<u>5.919</u>	0.868
クロルピリホス	<u>15.380</u>	1.606	1.505	1.197	1.705	1.507	0.233	1.591	<u>11.848</u>	0.446
ベンディメタリン	<u>12.650</u>	1.711	0.075	1.041	3.259	1.771	0.199	2.259	<u>5.965</u>	0.419
クレソキシムメチル	1.696	4.243	2.911	0.576	1.031	0.714	0.599	3.865	1.652	1.439
クロルフェナビル	<u>6.340</u>	1.298	3.102	0.418	2.420	1.191	0.234	1.562	2.833	0.612
ピフェントリン	<u>5.296</u>	2.836	3.102	0.553	<u>5.875</u>	0.964	0.432	1.268	1.553	0.630

*下線:棄却限界値(5.192)以上となった項目

表 2 各作物における均一化法毎のピーク面積の変動係数 CV %

農薬成分	変動係数CV%									
	おうとう		ぶどう		西洋なし		かき		りんご	
	凍結	室温	凍結	室温	凍結	室温	凍結	室温	凍結	室温
トリフルラリン	14	19	4.0	14	4.9	10	15	37	6.1	13
マラチオン	7.7	13	2.9	10	4.4	12	13	25	12	14
クロルピリホス	11	15	3.8	15	6.8	16	13	24	14	15
ベンディメタリン	13	16	2.5	16	6.9	18	13	27	10	17
クレソキシムメチル	6.0	7.8	3.6	16	5.2	7.5	<u>15</u>	<u>10</u>	11	13
クロルフェナビル	11	13	4.4	17	5.5	14	13	19	10	15
ピフェントリン	<u>16</u>	<u>10</u>	2.1	15	5.1	25	11	17	10	16

*下線:室温粉砕法に比べ凍結粉砕法で大きい値となった項目

Ⅳ 考察

室温粉碎法による均一化において、特にぶどうや西洋なしでは果皮と果実の硬度差が大きく水分量が多いため、果皮等の固形分が分離しやすい。一方、凍結粉碎法では試料中の水分を凍結させることにより、水分と固形分の分離を抑制している。また、果物のように水分を多く含む食品では粉碎時に水が可塑剤として働くが、凍結により可塑性が失われ、試料全体が脆化する^{文献 7}。そのため、凍結粉碎法では果皮等の固形分を微細に粉碎でき、試料の均一性が向上すると推察される。しかし、おうとうを凍結粉碎した際に目視で試料の一部が塊状になっていた。凍結粉碎法では基本的に試料を粉碎前に予備凍結するが、荒木らの報告によると、作物によっては試料の一部が粉碎されずに塊状に残ることがある^{文献 8}。その場合、試料を予備凍結せずにドライアイスと共に均一化すると改善する可能性があり、作物によっては予備凍結の方法を検討する必要がある。

一元配置分散分析で、凍結粉碎法の方が室温粉碎法より分散比 F が棄却限界値を超える農薬成分が多かった。この理由として、分散比 F を算出する際の区分間および区分内の変動の大きさが影響していると考えられる。変動係数は凍結粉碎法の方が室温粉碎法の場合よりもサンプリングした 10 試料のピーク面積のばらつきが小さく、分散分析における区分間および区分内の変動も小さくなる傾向があった。しかし、分散比を求めると、各変動の値が小さいために両者の差が大きく影響し、分散比 F が棄却限界値を超える場合があったと推察される。

今回、山形県の特産果物を対象に凍結粉碎法による均一化の検討を行い、得られた試料の均一性を評価した。凍結粉碎法はサンプリングに伴うピーク面積のばらつきが小さく、定量精度が高い可能性が示唆された。よって、果物類の残留農薬検査において凍結粉碎法を用いることで、より精確な検査結果が

得られ、食の安全性の担保に寄与するものと考えられる。今後は他の作物および農薬成分でも検討を行い検査への導入を目指していく。

Ⅴ 謝辞

本研究の実施にあたりご協力いただきました山形県工業技術センター高橋俊祐研究員に感謝いたします。

本研究は、大同生命厚生事業団主催平成 30 年度地域保健福祉研究助成により実施した。

Ⅵ 文献

1. 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知，食安発第 0124001 号，平成 17 年 1 月 24 日。
2. 千葉美子，滝沢裕，大内亜沙子 他：宮城県保健環境センター年報，33，41-45，2015。
3. 佐々野遼一，小西賢治，柏木春奈 他：食品衛生学会第 106 回学術講演会要旨集。
4. 藤田俊一，和田豊，高橋義行：植物防疫，67，55-61，2013。
5. 起橋雅浩，尾花裕孝，堀伸二郎 他：食品衛生学雑誌，51，253-257，2010。
6. 宮本伊織，角谷直哉，山野哲夫：大同生命厚生事業団主催平成 27 年度地域保健福祉研究助成 研究報告。
7. 羽倉義雄：日本食品工学会誌，10，199-206，2009。
8. 荒木啓佑，江崎康司，佐野達也 他：平成 28 年川崎市健康安全研究所年報，105-107。

短 報

山形県における性感染症の発生動向について(2006-2019 年)

小川直美, 細谷翠, 小松秀一, 長岡由香

Occurrence trend of sexually transmitted disease
in Yamagata prefecture (2006-2019)

Naomi OGAWA, Midori HOSOYA, Shuichi KOMATSU, and Yuka NAGAOKA

山形県感染症発生動向調査において、2006 年から 2019 年に報告された性感染症の報告について分析した。定点把握疾患は全体的に報告数が減少または横ばいであったが、性器クラミジア感染症と性器ヘルペスウイルスの報告数は、20 代後半から 30 代では報告数は増加傾向がみられた。梅毒は、近年女性の報告数が増加しており、そのほとんどが 20 代から 30 代であることから先天性梅毒の発生が危惧される。

Key Words : 感染症発生動向調査, 性感染症, 梅毒

I はじめに

性感染症は自覚症状が軽度または無症状のことが多く、本人が感染に気付かない場合も多い。また、感染の自覚があっても、医療機関を受診することに抵抗感を覚える患者も多く、早期の治療に結びつきにくい一面がある。そのため、適切な医療を受けられないままパートナーへの感染や母子感染、不妊につながるなど、問題が大きい。

性感染症の発生状況は、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（平成十年法律第百十四号）第十四条の規定に基づく発生動向調査により把握されている。

今回我々は、山形県感染症発生動向調査により得られた情報を分析し、県内の性感染症の発生動向についてまとめたので報告する。

（National Epidemiological Surveillance of Infectious Disease : NESID）を用いて集計を行い、疾患ごとに年齢分布や男女比、病型などについて分析した。

対象疾患と県内の定点医療機関数は以下の通り。

1) 対象疾患

① 定点把握感染症（月報対象）

- ・性器クラミジア感染症
- ・性器ヘルペスウイルス感染症
- ・尖圭コンジローマ
- ・淋菌感染症

② 全数把握感染症

- ・梅毒

2) 定点医療機関数（STD 定点）

10 医療機関（婦人科、泌尿器科）

II 方法

山形県感染症発生動向調査において、2006 年から 2019 年に県内の医療機関から報告された性感染症の症例について、感染症サーベイランスシステム

III 結果

1) 定点把握疾患

山形県内における性器クラミジア感染症、性器ヘルペスウイルス感染症、尖圭コンジローマ、淋菌感

感染症の発生動向の推移を、図 1, 2 に示した。なお、山形県の STD 定点医療機関は、泌尿器科に比べて婦人科が多いため、定点当たり報告数は男性が少なく、女性が多くなる傾向がある。性器クラミジア感染症は、女性の定点当たり報告数が、最も多かった 2013 年に全国平均の 1.5 倍となるなど、全国平均を上回ることが多かった。しかし、2016 年以降減少傾向となり、2018-19 年は全国平均を下回った。性器ヘルペスウイルス感染症は女性の報告数が増加傾向であり、2009 年以降ほとんどの年で全国平均を上回っていた。尖圭コンジローマと淋菌感染症は男女ともに横ばいか減少傾向で推移していた。(図 1)

男性の報告数を年代別にみると、性器クラミジア感染症の報告は 20 代後半から 30 代で多く、この年代の報告数は 2013 年頃からやや増加傾向にある。性器

ヘルペスウイルス感染症と尖圭コンジローマは報告数が少なく、はっきりした傾向はみられなかった。淋菌感染症は 2012 年頃までは、20 代から 30 代に報告数のピークがみられたが、それ以降はピーク年代の報告数が減少し、はっきりしたピークがみられなかった。女性の報告数を年代別にみると、最も報告数の多い性器クラミジア感染症では、全調査期間で 20 代から 30 代前半に報告数のピークがみられ、10 代後半の報告も多かった。性器ヘルペスウイルス感染症は、2014 年ごろまでは報告数のピークが 20 代にあったが、2015 年以降は 30 代がピークであり、ピーク年齢の後方スライドがあった。尖圭コンジローマと淋菌感染症は 2014 年ごろまでは 20 代の報告数が多かったが、2015 年以降は減少し、全体的に報告が少なくなっている。(図 2)

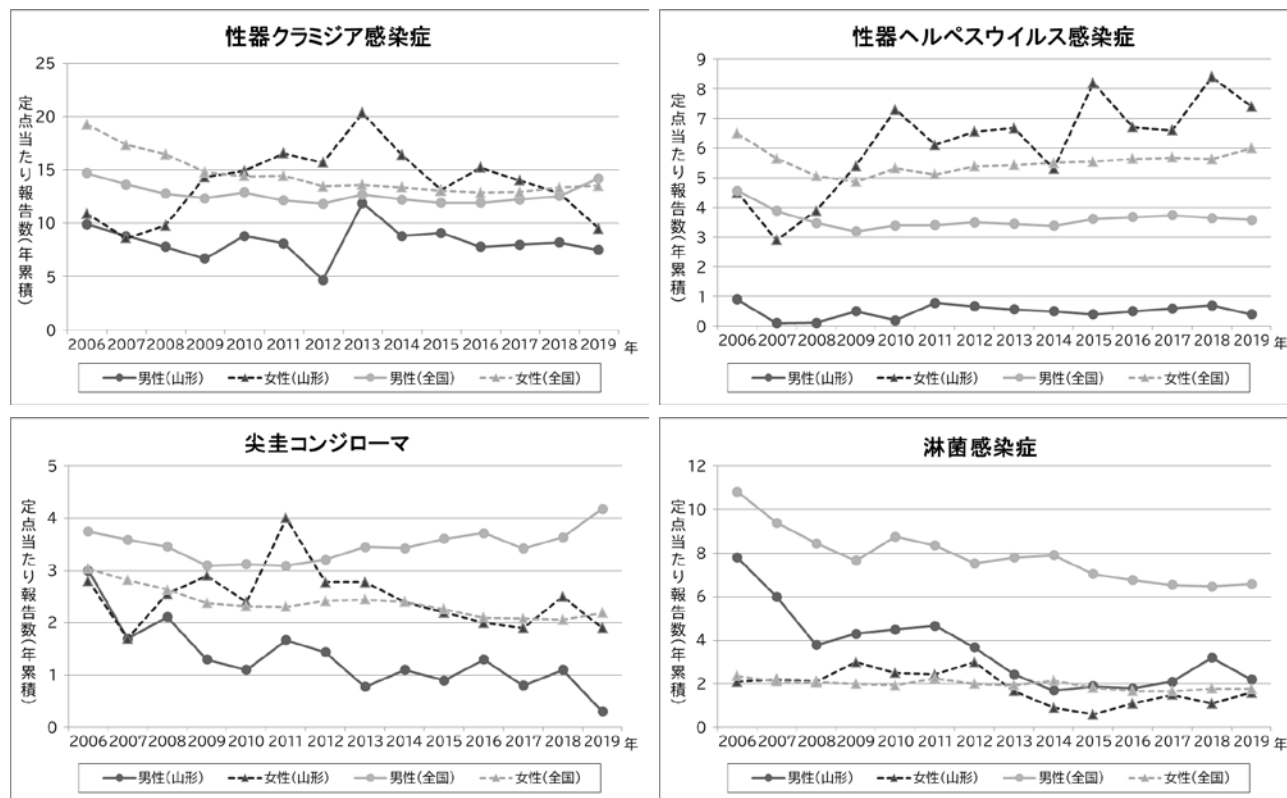


図 1 定点当たり報告数の推移

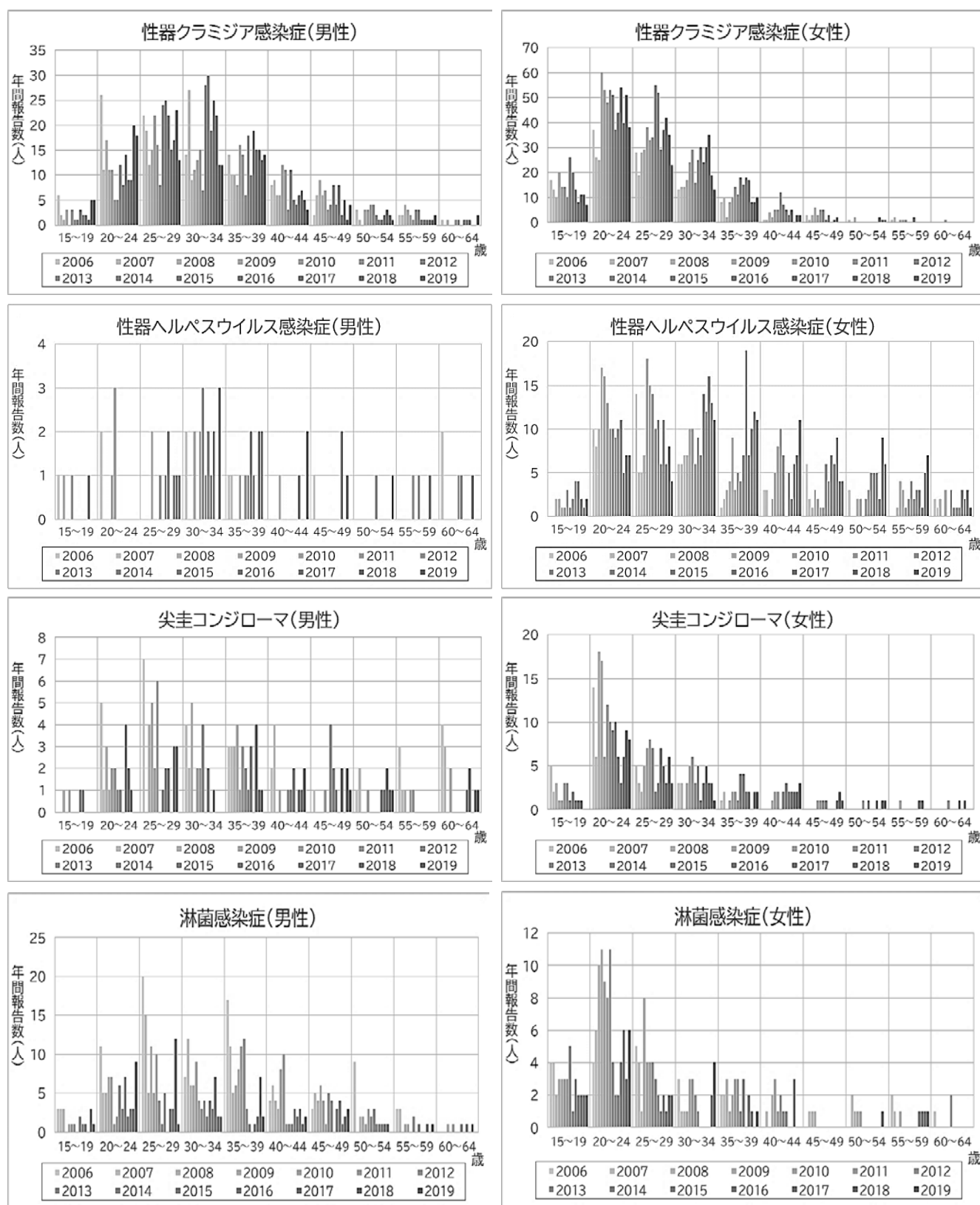


図2 年代別報告数

2) 全数把握疾患

梅毒の報告数を図 3,4 に示した。山形県、全国ともに 2013 年頃から報告数が増加傾向であり、男性・女性ともに報告数の増加がみられた（図 3）。県内の報告数を年代別にみると、男性では 30 代から 40 代にピークがあるものの、20 代から 60 代まで幅広い年代で多くの報告がみられた。女性では、20 代から 30 代前半の報告が多く、7 割以上がこの年代であった。2016 年以降、20 代から 30 代前半の女性の報告数が増加傾向にある（図 4）。

報告数を病型別にみると、男性では無症候から晩期まで様々な病型が報告されるが、近年は無症候または早期顕症梅毒（Ⅰ期）の報告が増加している。女性では、全体的に無症候の報告が多かった。（図 5）

感染経路は、全報告が性的接触による感染で、男性は 7 割、女性は全ての報告で異性間の性的接触による感染であった（図 6）。推定感染地に記載があった人のうち、男性は 6 割、女性は 9 割が山形県内での感染であった（図 7）。

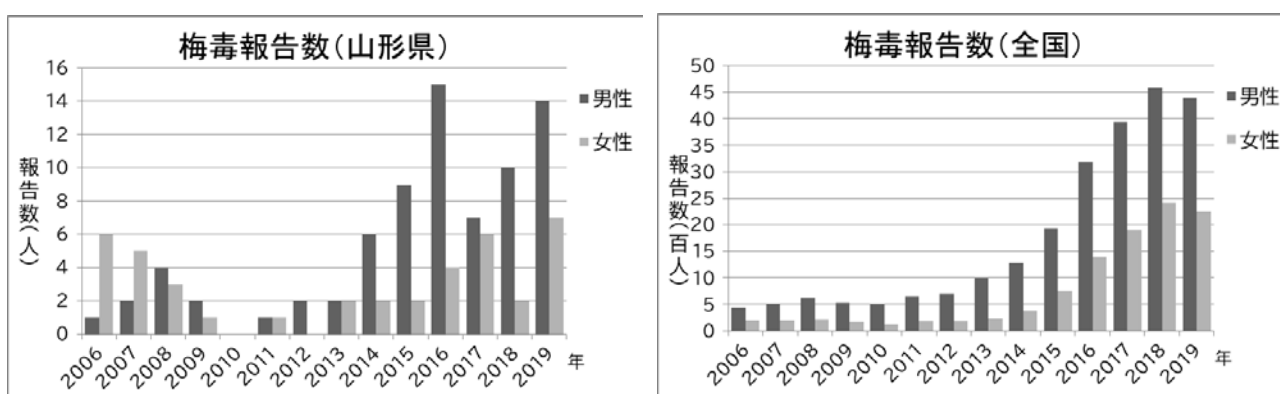


図 3 梅毒報告数

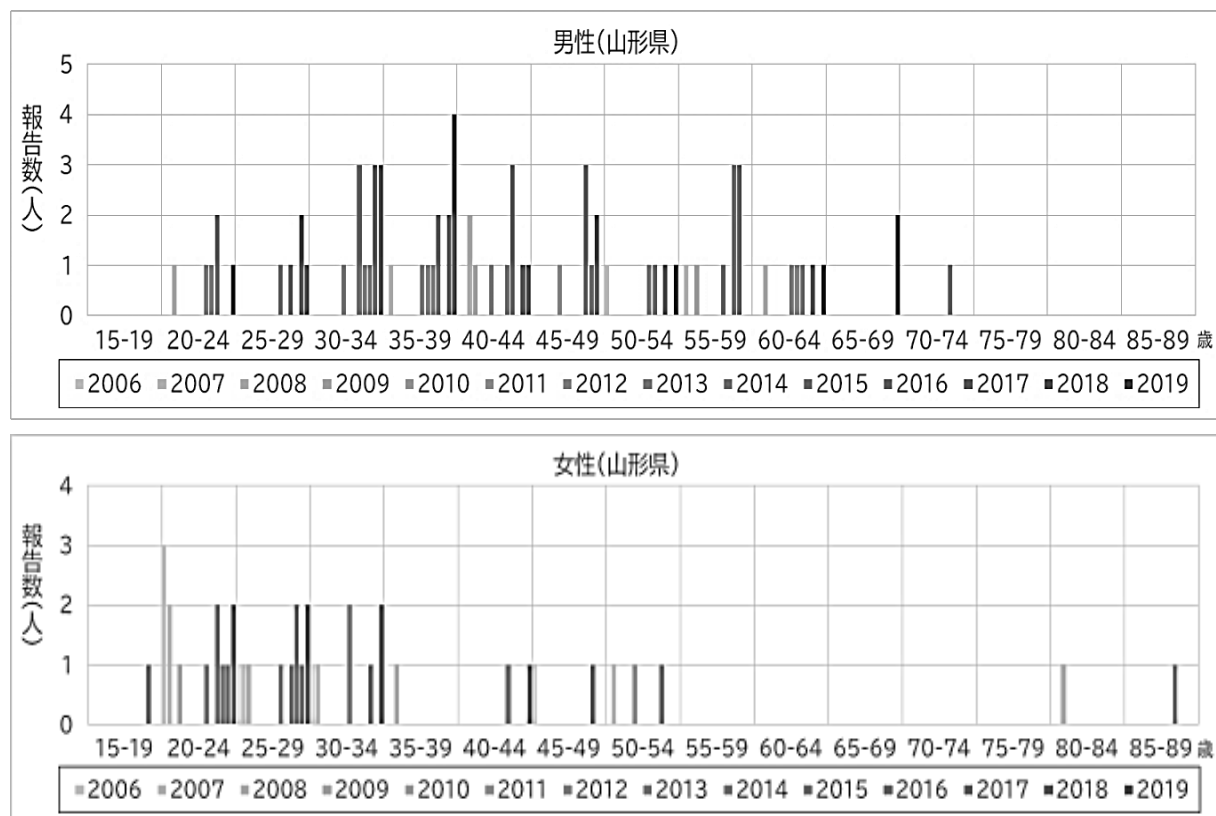


図 4 梅毒 年代別報告数

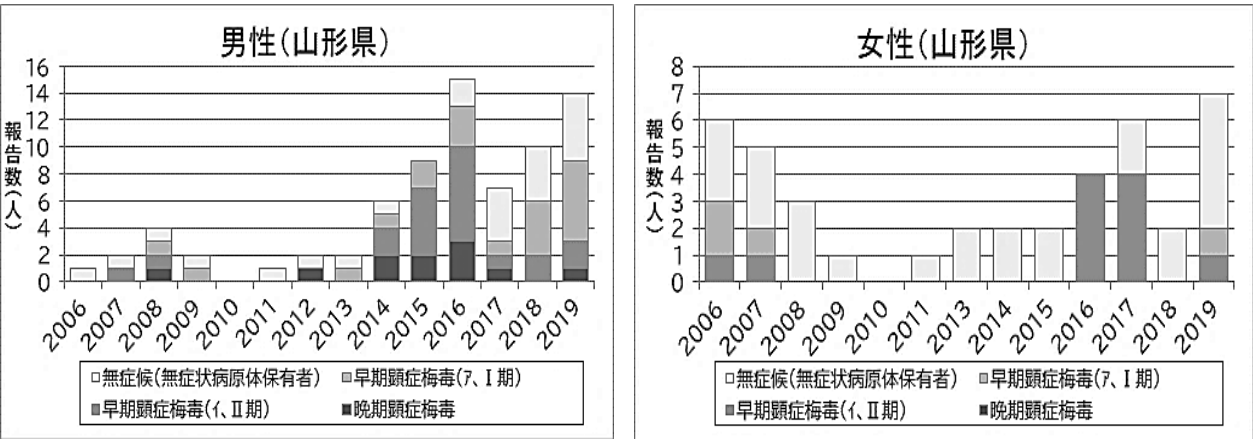


図 5 梅毒 病型別報告数

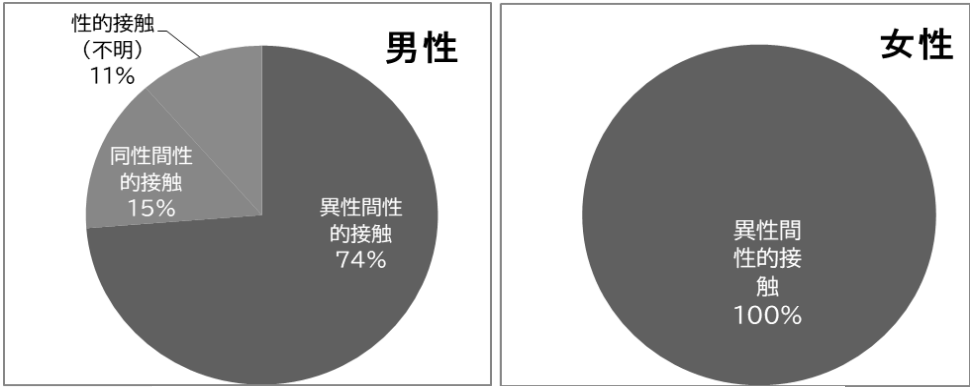


図 6 梅毒 男女別感染経路

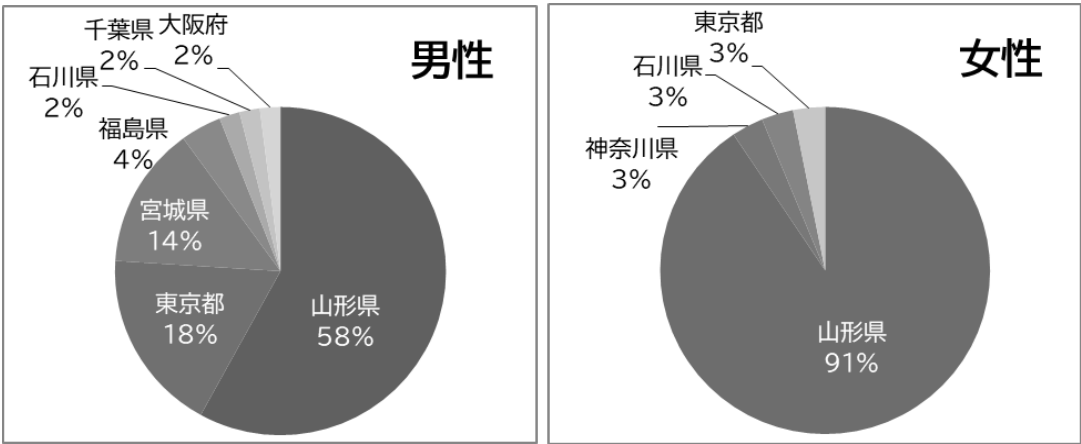


図 7 梅毒 男女別推定感染地

Ⅳ 考察

定点疾患の報告数は、全体の数としては横ばいか、減少しているように見える。しかし、性器クラミジア感染症と性器ヘルペスウイルスの報告数は、出産数の多い20代後半から30代では報告数の減少しておらず、むしろ増加傾向にある。10代から20代前半では全体的に報告数は横ばいであるが、若年層の人口が急激に減少している状況を考えると、罹患率は増加している可能性も考えられる。

梅毒は、近年山形県でも全国と同様に女性の報告が増加している。出産数の多い20代から30代前半の報告が多く、そのほとんどが無症候である。本調査期間中に先天性梅毒の報告はなかったが、今後も母児感染の発生に注意していく必要がある。

Ⅴ 結語

インターネットやSNSが普及し、性交渉を取り巻く状況が多様化、低年齢化している一方で、性感染症に関する正しい情報は十分に浸透しているとは言えない状況にある。山形県感染症情報センターは、感染症発生動向調査により得られた情報を分析し、わかりやすい形で県民へ提供することにより、県内の感染症蔓延防止に貢献していきたいと考えている。

Ⅵ 文献

- 1) 厚生労働省：性別にみた性感染症（STD）報告数の年次推移
(<https://www.mhlw.go.jp/topics/2005/04/tp0411-1.html>（アクセス日：2020年7月10日）)
- 2) 小野寺昭一, 近年の我が国における性感染症の動向, モダンメディア 58-7, 201-218, 2012

抄 録

1) 他誌掲載論文

Nosocomial *Mycobacterium tuberculosis* transmission by brief casual contact identified using comparative genomics

Seto J, Otani Y, Wada T, Suzuki Y, Ikeda T, Araki K, Mizuta K, Ahiko T

J Hosp Infect. 2019;102:116-119.

This paper reports a case of nosocomial transmission of *Mycobacterium tuberculosis* by brief casual contact. Routine variable number tandem repeat typing in Yamagata Prefecture, Japan found that *M. tuberculosis* clinical isolates from two patients showed indistinguishable genotypes. The patients had an epidemiological relationship of sharing a waiting room in a hospital on the same day. As comparative genomics detected only two single nucleotide variants between the isolates, it was concluded that recent tuberculosis transmission occurred in the waiting room. These results indicate that the physical separation of infectious tuberculosis patients is an essential control measure for preventing unpredictable nosocomial transmission by casual contact.

Longitudinal epidemiology of viral infectious diseases combining virus isolation, antigenic analysis and phylogenetic analysis as well as seroepidemiology in Yamagata, Japan between 1999 and 2018

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

Jpn J Infect.Dis. 2019;72:211-223.

We introduced a microplate method for virus isolation in the Department of Microbiology, Yamagata Prefectural Institute of Public Health (YPIPH) in 1999 in Yamagata, Japan. We have since carried out longitudinal epidemiological studies on viral infectious diseases, particularly respiratory viruses, combining traditional technologies such as virus isolation and serological techniques and newly developed molecular methods. Here, we provide an overview of our activities at YPIPH between 1999 and 2018. During the study period, we observed emerging and re-emerging diseases such as those caused by echovirus type 13, enterovirus D68, parechovirus-A3 (PeV-A3), and Safford virus. With regard to PeV-A3, we proposed a new disease concept, "PeV-A3-associated myalgia/myositis." We also revealed the longitudinal epidemiologies of several viruses such as enterovirus A71 and coxsackievirus A16. To perform longitudinal epidemiological studies at any time in Yamagata, we established a

system for stocking clinical specimens, viral isolates, complementary DNAs, and serum specimens. We have also pursued collaboration works with virology laboratories across Japan. We hope our experiences, findings, and research materials will further contribute to the development of countermeasures against viral infectious diseases and improvement in public health strategies in Yamagata, Japan, Asia, and around the world.

Polyclonal spread of multiple genotypes of *Mycoplasma pneumoniae* in semi-closed settings in Yamagata, Japan

Suzuki Y, Seto J, Shimotai Y, Itagaki T, Katsushima Y, Katsushima F, Ikeda T, Mizuta K, Hongo S, Matsuzaki Y

J Med Microbiol. 2019;68:785-790.

Purpose: To clarify the spread of *Mycoplasma pneumoniae* infections in semi-closed settings such as schools and family homes using molecular typing methods.

Methodology: We retrospectively searched for school- and family-based clusters of *M. pneumoniae* infections based on information regarding patients from whom *M. pneumoniae* strains had been isolated between 2011 and 2013 in Yamagata, Japan. The molecular typing profile, including the P1 type and the four-locus (Mpn13, 14, 15 and 16) multiple-locus variable-number tandem-repeat (VNTR) analysis (MLVA) type, was obtained from our previous study.

Results: We identified 11 school-based clusters involving 71 patients and 16 family-based clusters involving 38 patients, including 14 duplications between these types of clusters. A total of 95 *M. pneumoniae* strains isolated from those patients were divided into 4 genotypes: 33 strains of type 4-5-7-2, 1; 31 of type 4-5-7-3, 1; 24 of type 3-5-6-2, 2c; and 7 of type 3-5-6-2, 2a. Of the 11 school-based clusters, 6 clusters (54.5%) consisted of multiple genotypes, and the remaining 5 clusters consisted of a single genotype. Moreover, the presence of multiple genotypes was identified in three classrooms of a school. On the other hand, in 14 (87.5%) of the 16 family-based clusters, the genotypes of the *M. pneumoniae* strains isolated from each family member were identical.

Conclusion: The spread of *M. pneumoniae* infection in schools is likely polyclonal, since *M. pneumoniae* strains are brought into schools from various sites, such as family homes, which are important sites of disease transmission.

Longitudinal genotyping surveillance of *Mycobacterium tuberculosis* in an area with high tuberculosis incidence shows high transmission rate of the modern Beijing subfamily in Japan

Yamamoto K, Takeuchi S, Seto J, Shimouchie A, Komukai J, Hase A, Nakamura H, Umeda K, Hirai Y, Matsumoto K, Ogasawara J, Wada T, Yamamoto T

Infect Genet Evol. 2019;72:25-30.

Tuberculosis (TB) is a severe and wide-spread infectious disease worldwide. The modern Beijing subfamily, one lineage of *M. tuberculosis*, reportedly has high pathogenicity and transmissibility. This study used a molecular epidemiological approach to investigate the transmissibility of the modern Beijing subfamily in the Airin area of Osaka City, Japan. During 2006-2016, we collected 596 *M. tuberculosis* clinical isolates in the Airin area, Osaka city, Japan. We analyzed the 24-locus variable number of tandem repeats typing optimized for the Beijing family of isolates, *M. tuberculosis* lineage, and patient epidemiological data. The proportion of the modern Beijing subfamily was significantly higher not only than previously obtained data for the Airin area: it was also higher than the nationwide in Japan. The rate of recent clusters, defined as a variable number of tandem repeats profile identified within two years, of the modern Beijing subfamily was significantly higher than that the rate of recent clusters of the ancient Beijing subfamily. Results suggest that TB control measures formulated with attention to the modern Beijing subfamily might be an important benchmark to understanding recent TB transmission in the area.

Scrub typhus caused by Shimokoshi type *Orientia tsutsugamushi* showing variant 56-kDa type-specific antigen gene sequence in Tohoku region, Japan

Seto J, Tanaka S, Murakata T, Sato H, Monma N, Arai R, Ikeda T, Mizuta K

Microbiol Immunol. 2019;63:280-284.

In 2018, a patient was diagnosed with Shimokoshi type scrub typhus in Yamagata Prefecture, Japan. The causative pathogen was likely a variant type because 43 (8.3%) of 521 deduced amino acid sequences of the 56-kDa type-specific antigen (TSA) were different from those of the Shimokoshi prototype strain. The patient's paired sera showed low antibody titers against the Shimokoshi prototype strain. Two cases of scrub typhus reported in the Tohoku region during 2011-2012 also involved the same 56-kDa TSA gene sequence. These findings suggest the presence of diversity in Shimokoshi type *Orientia tsutsugamushi*, which may impede the laboratory diagnosis of scrub typhus.

Nationwide molecular epidemiology of measles virus in Japan between 2008 and 2017

Seki F, Miyoshi M, Ikeda T, Nishijima H, Saikusa M, Itamochi M, Minagawa H, Kurata T, Ootomo R, Kajiwara J, Kato T, Komase K, Tanaka-Taya K, Sunagawa T, Oishi K, Okabe N, Kimura H, Suga S, Kozawa K, Otsuki N, Mori Y, Shirabe K, Takeda M, the measles virus surveillance group of Japan and the technical support team for measles control in Japan

Front Microbiol. 2019;10:1470.

Genotyping evidence that supports the interruption of endemic measles virus (MV) transmission is one of the essential criteria to be verified in achieving measles elimination. In Japan since 2014, MV genotype analyses have been performed for most of the measles cases in prefectural public health institutes nationwide. With this strong molecular epidemiological data, Japan was verified to have eliminated measles in March, 2015. However, even in the postelimination era, sporadic cases and small outbreaks of measles have been detected repeatedly in Japan. This study investigated the nationwide molecular epidemiology of MV between 2008 and 2017. The 891 strains in the total period between 2008 and 2017 belonged to seven genotypes (D5, D4, D9, H1, G3, B3, and D8) and 124 different MV sequence variants, based on the 450-nucleotide sequence region of the N gene (N450). The 311 MV strains in the postelimination era between 2015 and 2017 were classified into 1, 7, 8, and 32 different N450 sequence variants in D9, H1, B3, and D8 genotypes, respectively. Analysis of the detection period of the individual N450 sequence variants showed that the majority of MV strains were detected only for a short period. However, MV strains, MVs/Osaka.JPN/29.15/ [D8] and MVi/Hulu Langat.MYS/26.11/ [D8], which are named strains designated by World Health Organization (WHO), have been detected in many cases over 2 or 3 years between 2015 and 2017. The WHO-named strains have circulated worldwide, causing outbreaks in many countries. Epidemiological investigation revealed repeated importation of these WHO-named strains into Japan. To demonstrate the elimination status (interruption of endemic transmission) in situations with repeated importation of the same strains is challenging. Nevertheless, the detailed sequence analysis of individual MV strains and chronological analysis of these strains provided sufficient evidence to show that Japan has still maintained its measles elimination status in 2017.

Comparison of MDCK suspension cells, MDCK adherent cells, and LLC-MK2 cells for selective isolation of influenza virus to use as vaccine seed

Harada Y, Takahashi H, Trusheim H, Roth B, Mizuta K, Hirata-Saito A, Ogane T, Odagiri T, Tashiro M, Yamamoto N

Vaccine.2019;37:6526-6534.

Background: Cell - based influenza vaccines can solve the problem of the frequent occurrence of egg adaptation - associated antigenic changes observed in egg - based vaccines. Seed viruses for cell - based vaccines can be prepared from clinical specimens by cell culture; however, clinical samples risk harboring respiratory viruses other than influenza virus. Therefore, it is necessary to investigate the patterns of co - infection in clinical samples and explore whether cell culture technology can selectively propagate influenza viruses from samples containing other respiratory viruses.

Methods: A total of 341 clinical specimens were collected from patients with influenza or influenza - like illness and analyzed by ResPlex II assay to detect 18 respiratory viruses. The patterns of co - infection were statistically analyzed with Fisher's exact test. The samples with double or triple infections were passaged in suspension MDCK cells (MDCK - S), adherent MDCK cells (MDCK - A), and LLC - MK2D cells. Cell - passaged samples were analyzed by ResPlex II assay again to investigate whether each cell line could amplify influenza viruses and eliminate other respiratory viruses.

Results: Double infections were detected in 8.5% and triple infections in 0.9% of the collected clinical specimens. We identified four pairs of viruses with significant correlation. For all samples with double and triple infection, MDCK - S and MDCK - A could selectively propagate influenza viruses, while eliminating all contaminating viruses. In contrast, LLC - MK2D showed lower isolation efficiency for influenza virus and higher isolation efficiency for coxsackievirus/echovirus than MDCK - S and MDCK - A.

Conclusions: Both MDCK - S and MDCK - A are considered suitable for the preparation of influenza vaccine seed viruses without adventitious agents or egg - adaptation mutations.

Comparison of suspension MDCK cells, adherent MDCK cells, and LLC-MK2 cells for selective isolation of influenza viruses to be used as vaccine seeds

Harada Y, Takahashia H, Trusheim H, Rothb B, Mizuta K, Hirata-Saito A, Ogane T, Odagiri T, Tashiro M, Yamamoto N

Influenza Other Respir Viruses. 2020;14:204-209.

Background: Cell-based influenza vaccines can solve the problem of the frequent occurrence of egg adaptation-associated antigenic changes observed in egg-based vaccines. Seed viruses for cell-based vaccines can be prepared from clinical specimens by cell culture; however, clinical samples risk harboring respiratory viruses other than influenza virus. Therefore, it is necessary to investigate the patterns of co-infection in clinical samples and explore whether cell culture technology can selectively propagate influenza viruses from samples containing other respiratory viruses.

Methods: A total of 341 clinical specimens were collected from patients with influenza or influenza-like illness and analyzed by ResPlex II assay to detect 18 respiratory viruses. The patterns of co-infection were statistically analyzed with Fisher's exact test. The samples with double or triple infections were passaged in suspension MDCK cells (MDCK-S), adherent MDCK cells (MDCK-A), and LLC-MK2D cells. Cell-passaged samples were analyzed by ResPlex II assay again to investigate whether each cell line could amplify influenza viruses and eliminate other respiratory viruses.

Results: Double infections were detected in 8.5% and triple infections in 0.9% of the collected clinical specimens. We identified four pairs of viruses with significant correlation. For all samples with double and triple infection, MDCK-S and MDCK-A could selectively propagate influenza viruses, while eliminating all contaminating viruses. In contrast, LLC-MK2D showed lower isolation efficiency for influenza virus and higher isolation efficiency for coxsackievirus/echovirus than MDCK-S and MDCK-A.

Conclusions: Both MDCK-S and MDCK-A are considered suitable for the preparation of influenza vaccine seed viruses without adventitious agents or egg-adaptation mutations.

Development of an enterovirus 71 vaccine efficacy test using human scavenger receptor B2 transgenic mice

Imura A, Sudaka Y, Takashino A, Tamura K, Kobayashi K, Nagata N, Nishimura H, Mizuta K, Koike S

J Virol. 2020;94:e01921-19.

Enterovirus 71 (EV71) is a causative agent of hand-foot-mouth disease, and it sometimes causes severe neurological disease. Development of effective vaccines and animal models to evaluate vaccine candidates are needed. However, the animal models currently used for vaccine efficacy testing, monkeys and neonatal mice, have economic, ethical, and practical drawbacks. In addition, EV71 strains prepared for lethal challenge often develop decreased virulence during propagation in cell culture. To overcome these problems, we used a mouse model expressing human scavenger receptor B2 (hSCARB2) that showed lifelong susceptibility to EV71. We selected virulent EV71 strains belonging to the subgenogroups B4, B5, C1, C2, and C4 and propagated them using a culture method for EV71 without an apparent reduction in virulence. Here, we describe a novel EV71 vaccine efficacy test based on these hSCARB2 transgenic (Tg) mice and these virulent viruses. Adult Tg mice were immunized subcutaneously with formalin-inactivated EV71. The vaccine elicited sufficient levels of neutralizing antibodies in the immunized mice. The mice were subjected to lethal challenge with virulent viruses via intravenous injection. Survival, clinical signs, and body weight changes were observed for 2 weeks. Most immunized mice survived without clinical signs or histopathological lesions. The viral replication in immunized mice was much lower than that in nonimmunized mice. Mice immunized with the EV71 vaccine were only partially protected against lethal

challenge with coxsackievirus A16. These results indicate that this new model is useful for in vivo EV71 vaccine efficacy testing. **IMPORTANCE** The development of new vaccines for EV71 relies on the availability of small animal models suitable for in vivo efficacy testing. Monkeys and neonatal mice have been used, but the use of these animals has several drawbacks, including high costs, limited susceptibility, and poor experimental reproducibility. In addition, the related ethical issues are considerable. The new efficacy test based on hSCARB2 Tg mice and virulent EV71 strains propagated in genetically modified cell lines presented here can overcome these disadvantages and is expected to accelerate the development of new EV71 vaccines.

Rat-bite fever due to *Streptobacillus moniliformis* without bite history: An unexpected cause of consciousness disturbance

Onodera H, Uekita H, Watanabe T, Taira K, Watanabe C, Saito H, Seto J, Suzuki Y, Imaoka K

Jpn J Infect Dis. 2020;73:85-87.

抄録なし

Regional spread of three distinct genotypes of *Mycoplasma pneumoniae* and different timing of macrolide-resistant strain appearance among genotypes between 2011 and 2013 in Yamagata, Japan

Suzuki Y, Seto J, Shimotai Y, Itagaki T, Katsushima Y, Katsushima F, Ikeda T, Mizuta K, Hongo S,
Matsuzaki Y

Yamagata Med J. 2020;38:19-24.

Background: We previously revealed that several multiple-locus variable-number tandem-repeat analyses (MLVA) and P1 types of *Mycoplasma pneumoniae* (*M. pneumoniae*) cocirculated between 2011 and 2013 in Yamagata, Japan. However, the regional spread of *M. pneumoniae* infection by genotype is not reported yet. It remains unclear whether there is a difference in the spread of macrolide-resistant *M. pneumoniae* among genotypes.

Methods: Genotypes were labeled according to 4-locus (Mpn 13, 14, 15, and 16) MLVA and P1 types. A total of 208 strains belonging to three major genotypes, i.e., type 4-5-7-2, 1; 4-5-7-3, 1; and 3-5-6-2, 2c, were analyzed by combining with the information of macrolide resistance-associated mutation and the patients' information including residence.

Results and Discussion: The three genotypes were widely distributed over more than four cities and towns in Yamagata Prefecture, cocirculating between late 2011 and early 2013, and there was little difference in the duration

of their epidemics. Timing of macrolide-resistant strain appearance during the epidemic period differed between type 4-5-7-2, 1 and type 4-5-7-3, 1, and it did not appear throughout type 3-5-6-2, 2c epidemic. These genotypic differences can account for the variation in the prevalence of macrolide resistance-associated mutations in each of the studied areas.

2) 学会発表

ウイルス感染症，変わったこと，変わらないこと

水田克巳

第60回日本臨床ウイルス学会シンポジウム，2019年5月26日，於名古屋

山形県衛生研究所では，1999 年以来，ウイルス分離・抗原解析や血清疫学をベースとして，遺伝子検出やシーケンス・系統樹解析を組み合わせて疫学研究を続けてきた（Jpn J Infect Dis 印刷中）。

最新の研究成果としては，コクサッキーウイルス A6 型（CVA6）山形分離株の系統樹及び抗原解析がある（Vaccine 印刷中）。CVA6 は，主に小児のヘルパンギーナの病原体として知られていた。2008 年以降，世界各地で，大腿部等広範な発疹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なされ，日本でも，2009 年頃から同様の報告が増加している。我々は，2001-17 年の山形分離株についてシーケンス・抗原性を解析した。系統樹解析の結果，山形株は，2009 年前後で明瞭に分岐するいっぽう，両者で抗原性に大きな違いはみられなかった。このことは，2009 年を境に，遺伝子型や病態は変わったが，免疫からみれば抗原性は変わっていない，ということである。ワクチンを作成し予防戦略を考える上では，抗原性が“変わっていない”という視点が重要であるが，病態を理解・解明するという視点ではヘルパンギーナというよりも非典型的な手足口病の病原体として世界中に広がったという“変わった”背景を明らかにしていく必要がある。

我々が解析したエンテロウイルス A 7 1 型についても同様の解釈ができる（Vaccine 27:3153-8, 2009）。

これらの経験から，ウイルス感染症を理解しかつ対策を講じていくには，複眼的にさまざまな角度から疫学研究を進めていくことが重要だといえるのではないか。

公衆衛生のための結核菌ゲノム解析

瀬戸順次，阿彦忠之

第94回日本結核病学会総会シンポジウム，2019年6月7-8日，於大分

【はじめに】2019 年現在，「日本の公衆衛生の現場において，結核菌ゲノム解析が有効に活用されている

か？」という問いに対する答えは、残念ながら No である。本発表は、(1) そもそも結核菌ゲノム解析は公衆衛生の現場、具体的には保健所における結核対策、に貢献し得るのか、(2) 結核菌ゲノム解析を公衆衛生に活かすためにはどうすればよいか、を考える場としたい。

【菌を調べるという発想】結核は、人から人に伝播する感染症であるため、患者間の疫学的関連性の把握が感染源・感染経路の究明と同義である。しかし、人の行動範囲は広く、また行動様式も複雑であるため、関連性の把握は容易ではない。そのような中、患者間の関連性追究を菌側からのアプローチにより支援することを目的として普及が進んでいるのが結核分子疫学である。現状、国内では、地方衛生研究所が中心となって結核菌臨床株の反復配列多型 (VNTR) 分析を実施し、その結果を保健所に還元している。

【VNTR 分析の限界】VNTR 分析は、遺伝子を扱う実験室に必須の PCR 機器を用いた方法であり導入が容易、分析コストが安価、24 領域など多くの領域を分析することで結核菌が遺伝的に同一か否かを一定程度識別可能などの利点をもつ一方、結核菌ゲノムの一部を調べる方法であるため高精細な識別まではできない。そのため、複数の結核菌株の VNTR 分析結果が一致（以降、クラスタ形成）しても、それらが全て由来患者間の最近の結核感染伝播を示唆するわけではない。特に、結核は感染から発病まで、時として数十年を要する感染症であるため、過去の結核高蔓延期の流行株に感染した現代の高齢者が最近になって発病し、分離された結核菌がクラスタ形成することも想定される。そのような時空を超えた現象が、「クラスタ形成したのに由来患者間の関連性を見出せない」という「気持ち悪さ」を生む要因になっている。

【結核菌ゲノム解析の利点】結核菌ゲノム解析を結核患者の感染源・感染経路追究に用いる最大の利点は、絶対的な菌株識別能にある。例えば、2009 年以降、結核菌臨床株を原則全株収集して VNTR 分析を実施している山形県において、2009~2017 年に見出された 24 領域 (24Beijing セット) 完全一致 40 クラスタに含まれる 121 株の結核菌に、ゲノム解析における由来患者間の最近の感染伝播の指標（一塩基多型 5 か所以内）を適用したところ、患者間の最近の感染伝播のみで構成されたのは 21 クラスタ (52.5%) に留まり、42 株 (34.7%) は最近の感染伝播に依らない株と判定された。このように、ゲノム解析は、真に最近の結核感染伝播に関連した患者を選別し、保健所に「現代の結核患者を減らすための科学的ヒント」を提供可能な優位性をもつ。

また、ゲノム解析の高精細な識別能は、VNTR 分析と実地疫学調査の組み合わせにより見出された患者間の関連性に揺るぎない科学的根拠を付加する。本発表では、山形県において、ゲノム解析結果で担保された驚くべき結核分子疫学調査結果を関係機関と共有することで、施設の運営管理の改善につなげた事例をいくつか紹介したい。

【公衆衛生のための結核菌ゲノム解析】結核患者減少に貢献し得る先進的な科学技術が目前にあるのならば、それを利用しない手はない。しかし、現状では全国の保健所に結核菌ゲノム解析の有用性は広く知られていない。原因として、ゲノム解析の高額な機器・維持費・分析コスト、および高い専門性など活用に向けた大きな壁があることで、各自治体においてゲノム解析を実施する機会が少ないことが挙げられる。そのような状況を打開するためにはどうしたらよいか、その一案についてシンポジウムの中で申し述べたい。

感染症の流行状況の解明に向けて科学の力を利用することは、現代社会における普遍的な方向性といえる。結核に関しても、各自治体でこれまで培われてきた VNTR 分析ベースの結核分子疫学に結核菌ゲノム解析を付加することが、最近の結核感染伝播事例の確実な証明、それら事例の蓄積による重点的な対策を

取るべき対象の選定，ひいては全国におけるそれら対象への徹底的な介入につながっていくものと期待される。「結核菌ゲノム解析を公衆衛生のために活用している」と公言できる時代を夢見て，今，公衆衛生の現場における結核菌ゲノム解析の利活用に向けた第一歩を踏み出すべきではないだろうか。

パレコウイルス A3型による流行性筋痛症の探知には 症候群サーベイランスが有効である

水田克巳，田中静佳，駒林賢一，池田辰也，青木洋子，田中和佳，仙道大，市川真由美，
豊田健太郎，古山政幸，山口佳剛，永沢光，和田学

第73回日本細菌学会東北支部総会，2019年8月23日，於盛岡

【背景と目的】2008年の山形県におけるパレコウイルス A3 型 (PeVA3) による成人筋痛症流行について，第 66 回本学会及び論文で報告した．続いて山形県内で観察した 2011，2014，2016 年の成人及び小児の筋痛症については論文報告した．2014 年以降，日本国内では山形県以外の複数の地域から同疾患が学会・論文報告されるようになったが，外国からの論文報告はまだない．2017-2018 年，小児における PeVA3 感染症発生状況は 2016 年の流行時に比べて小さかったと考えられるが，山形県における症候群サーベイランスの中で，各 1 例の筋痛症散発例を経験したので報告する．

【方法】小児感染症（気道感染症，発疹症，手足口病など）及び筋痛症疑い患者の臨床検体から，PeVA3 の遺伝子検出・ウイルス分離を実施した．

【結果】2017 年 (958 検体)・2018 年 (937 検体) は県内のルーチン小児検体からのスクリーニングでは PeVA3 の検出はなかった．一方，以下の筋痛症散発例が見つかった．

① 2017 年症例（9 歳女兒）

2017 年 10 月 27 日発症，発熱・咳・食欲不振・四肢筋痛（歩行困難）を呈し，筋痛が悪化し 31 日に入院．Creatinine phosphokinase (CPK) 上昇が認められ，咽頭拭い液から PeVA3 遺伝子を検出した．筋痛は軽減し，11 月 2 日に退院となった．

② 2018 年症例（38 歳女性）

2018 年 10 月 21 日ふくらはぎの痛みで発症，痛みが大腿・両上肢・首に広がり，25 日に入院．CPK 軽度上昇あり，便から PeVA3 を分離・検出した．痛みは改善し 30 日に消失した．

【考察】PeVA3 による筋痛症は，同ウイルスの小児における全国的な大流行の年に見つけやすい．しかし，上記のように，“四肢の筋肉痛（及び脱力）”という特徴的な症状に着目することで，PeVA3 の流行が比較的小さかったと思われる 2017-2018 年にも山形県内で散発例を見つけることができた．以上のことから，PeVA3 による筋痛症患者の探知には症候群サーベイランスが有効と考えられた．

2012年～2013年シーズン以降のマクロライド耐性肺炎マイコプラズマの推移

勝島由利子, 勝島史夫, 鈴木裕, 瀬戸順次, 田中静佳, 水田克巳, 松寄葉子

第71回北日本小児科学会, 2019年9月15日, 於山形

目的: マクロライド耐性肺炎マイコプラズマは, 2001 年初めて日本で報告され, 以降各地で毎年流行を繰り返している. 我々は以前, 2012 年 2 月から 2013 年 3 月までに山形市近郊で分離された肺炎マイコプラズマ 27 株のうち 24 株 (89%) がマクロライド耐性株であることを報告した (Katsushima Y et al. Ped.Int.2015). 今回, その後に分離された肺炎マイコプラズマのマクロライド耐性率を調べることを目的とする.

対象: 2013 年 4 月から 2018 年 12 月までに山形市勝島小児科医院で分離されたマイコプラズマ

方法: 鈴木裕 他 感染症学雑誌 2015; 89:16-22 の方法により実施

結果: 2013 年 4 月から 12 月においては 14 株分離され 4 株耐性 (29%). 2014 年 1 月から 12 月は 2 株分離され耐性株なし (0%). 2015 年は 4 株分離され 1 株耐性 (25%), 2016 年は 15 株分離され 6 株耐性 (40%), 2017 年は 12 株分離され 8 株耐性 (67%), 2018 年は 14 株分離され 5 株耐性 (35%). 遺伝子の内訳は全 61 株中 24 株が変異あり (39%). 耐性遺伝子の内訳は 24 株中 A2063G が 22 株, A2064G が 1 株, A2063G と A2064G の混合株が 1 株.

結論: 山形市内及びその近郊においてマクロライド耐性株はほぼどの年においても存在していたが, 年によって耐性率が高い年とそうでない年があった.

2017年山形における, 排除後最大の, 38例の修飾麻疹と 22例の典型麻疹による麻疹流行

水田克巳

第67回日本ウイルス学会学術集会, 2019年10月29-31日, 於東京

Japan achieved measles elimination in March 2015 by providing 2 doses of measles vaccine and by using the laboratory-based surveillance system according to the guideline for the prevention of specific infectious disease “measles” established in 2007. However, imported and importation-related measles cases have been still reported.

The largest importation-related outbreak of measles with genotype D8 occurred in Yamagata Prefecture, Japan, from March to April 2017, after Japan had achieved measles elimination.

During the outbreak, we confirmed 60 cases by detecting the genome of the measles virus (MeV). Among the cases, 38 were modified measles (M-Me), characterized by milder symptoms than those of typical measles (T-Me) and 22 were T-Me. Thirty-nine (65.0%) patients were 20-39 years of age. Three out of 7 primary cases developed

T-Me, kept contact with the public during their symptomatic periods and produced 50 transmissions, of which each patient caused 9-25 transmissions. These 3 patients were 22-31 years old and were not vaccinated. These patients showed an extremely low cycle of threshold by real-time reverse transcription PCR in their throat swab specimens, indicating that their super-spreading events resulted from cases with the high viral load.

Two doses of measles vaccine are of course primarily important for prevention and control. Considering that M-Me is generally caused by vaccine failure, some individuals aged 20-39 years in Japan may have insufficient immunity for MeV, maybe due to no or one dose vaccination. Accordingly, additional doses of measles vaccine may be necessary in preventing measles importation and endemicity among these individuals. Furthermore, to accurately and promptly diagnose individuals with measles, particularly those who can be considered as primary cases, efforts must be exerted to detect measles cases using epidemiological and genetic approaches.

日本とベトナムの手足口病患者から分離されたエンテロウイルス 71 の 病原性解析と病原性決定因子の探索

小林郷介, Chu SonThanh, 水田克巳, 西村秀一, 市村宏, 小池智

第67回日本ウイルス学会学術集会, 2019年10月29-31日, 於東京

Background: Enterovirus 71 (EV71), a causative agent of hand-foot-and-mouth disease (HFMD), is sometimes associated with severe neurological disease. Several outbreaks have occurred in Asia-Pacific region.

Identification of virulence determinants is important to understand EV71 pathogenesis and develop treatment of severe EV71 infection. We identified a receptor for EV71 as human scavenger receptor B2 (hSCARB2) and established transgenic mice expressing hSCARB2 (hSCARB2 tg) that are susceptible to EV71 and show neurological manifestations by the infection.

Methods: EV71 strains isolated from HFMD patients in Yamagata and Miyagi in Japan and Hanoi in Vietnam, which were classified into C4 or B5 subgenogroup, were intraperitoneally inoculated to hSCARB2 tg mice. Infected mice were monitored daily for paralysis and death for 14 days. Genome sequence of these strains was analyzed by next generation sequencing.

Results: The amino acid identity among B5 and C4 strains were 99.4 ± 0.3 and 97.8 ± 1.6 %, respectively. However, in each subgenogroup, we found some highly virulent and avirulent strains. To identify virulence determinant in EV71 genome, we generated a series of EV71 possessing a chimeric genome between the virulent and avirulent strains in each subgenogroups. To date, our result indicated that potential determinant(s) were limited in 5' UTR or P1 region of viral genome.

Discussion: These suggests some specific variations located in 5' UTR and/or P1 region of EV71 genome affecting EV71 virulence. Further analyses using chimeric EV71 should identify precise features of the virulence determinant.

日本で分離されたエンテロウイルス D68 株に対する IVIG 製剤の中和活性の測定

吉田 和央, 村松 正道, 水田 克巳, 清水 博之

第67回日本ウイルス学会学術集会, 2019年10月29-31日, 於東京

[Objectives] Enterovirus D68 (EV-D68) is a type of species Enterovirus D and mainly associated with common respiratory diseases. However, EV-D68 may cause severe respiratory diseases and EV-D68 infection is epidemiologically linked to current global outbreaks of acute flaccid myelitis (AFM). We measured neutralizing antibodies in intravenous immune globulin (IVIG) products commercially available in Japan against Japanese EV-D68 strains.

[Methods] We tested for EV-D68 neutralizing antibodies in 9 commercially available IVIG products in Japan against 6 EV-D68 strains. Seven were manufactured from Japanese blood donors and two were from Germany and USA. We selected 6 representative EV-D68 strains isolated in Yamagata, Japan in 2010-2015, which are classified to three distinct EV-D68 genotypes (Clade A, B, and C; two strains for each genotype). Diluted IVIG products were incubated with each virus solution (≈ 100 CCID₅₀/well) for 1hr at 37°C and microplate assay was performed on RD-A cells.

[Results] Seven IVIG products manufactured from Japanese donors contained high neutralizing antibodies (IC₅₀=0.2- 85g/ml) against all the 6 EV-D68 strains. Apparent differences in neutralizing antibody titers among 6 EV-D68 strains were observed for all IVIG products derived from Japanese and foreign blood donors.

[Discussion] High level of EV-D68 neutralizing antibodies in IVIG products manufactured from Japanese donors suggests that anti-EV-D68 antibody is maintained in Japanese donor population as well as those for the foreign blood donors. . Apparent differences in neutralizing antibody titers among 6 EV-D68 strains suggest distinct antigenicity among the strains used in this study regardless of the EV-D68 genotypes. While 2 Clade C strains are phylogenetically closely related, the neutralizing activity was different for all IVIG products. The effectiveness of IVIG products for severe EV-D68 infection should be carefully evaluated in further clinical studies.

肺 *Mycobacterium paraense* 症の1例

相澤貴史, 鈴木博貴, 太田隆仁, 片桐祐司, 阿部修一, 鈴木裕, 茜谷大輔, 瀬戸順次

第68回日本感染症学会東日本地方会学術集会, 2019年10月16-18日, 於仙台

近年, マトリックス支援レーザー脱離イオン化法を元にした飛行時間型質量分析計(MALDI-TOF MS)による微生物同定が可能となり, 臨床現場でも普及し始めている. 非結核性抗酸菌でも検出頻度の高い

Mycobacterium avium complex (MAC) においては、MALDI-TOF MS による同定性能について複数の報告がなされ評価は定まったといえる。また、本法では 150 種以上の抗酸菌の同定が可能となるため、稀少菌種の同定についても期待が持たれている。

今回、DNA-DNA ハイブリダイゼーション法では同定できず、質量分析で *Mycobacterium paraense* (*M. paraense*) と同定された症例を経験した。症例は 70 歳女性。慢性気管支炎として近医通院中に喀血し、精査・加療目的で当科紹介となった。状態安定後の CT では、右肺中葉の気管支拡張と周囲の consolidation を主病変とし、右下葉に結節状の consolidation が散在、両肺に気管支拡張と周囲の瘢痕様変化の散在を認めた。喀痰 1 回分と気管支洗浄液で抗酸菌培養陽性となり、2 回とも質量分析で *M. paraense* と同定された。本菌による症例報告はほとんどなく、貴重な症例と考えられたため報告する。質量分析による同定法の普及に伴い、今後、このような稀少菌種の報告が増加していくものと推察する。

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。

2019年のB型インフルエンザに対するパロキサビルの効果と治療前後の耐性変異を含むウイルス検出の状況

松寄葉子，板垣勉，池田辰也，水田克巳

第112回日本小児科学会山形地方会，2019年12月8日，於山形

対象は、2019 年の 4-6 月に B 型インフルエンザ疑いでパロキサビルを投与され、初診時に 1 回目、3-5 日後に 2 回目の検体を採取できた 11 例。年齢の中央値は 6 歳 (2-16 歳)。初診時体温は平均 $38.4 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 、投与から解熱までの日数は平均 1.6 ± 1.0 日だった。B 型ウイルス検出は、PCR では治療前後の検体で全例陽性、分離では治療後の 4 検体で陰性だった。PA 遺伝子の耐性変異は全例で検出されなかった。

結核患者のゲノム変異上の近さと地理的近接性の関連 —大阪市病原体情報を用いた解析—

中谷友樹，山本香織，竹内昌平，瀬戸順次，翁長朝功，藤原直哉，和田崇之

第 30 回日本疫学会総会，2020 年 2 月 21 日，於京都

【背景】日本は結核の中蔓延国に位置づけられ、大都市を中心に新規感染の伝播経路の特定と予防は依然として大きな課題である。近年では、患者から得た菌株ゲノムの全配列を解読して、配列上の一致性から直近の伝播か否かを判定できるようになったため、これを利用した伝播の地理的な経路解析が期待されている。

【目的】結核罹患率が高い大阪市に居住する若年新規登録結核患者を対象として、結核患者のゲノム変異上の近さと地理的近接性の関連を検討する。

【方法】2012-14年の40歳未満の大阪市新登録結核患者由来177株から11,479の変異箇所に基づく分子系統樹を作成し、近年の伝播からなる感染者群22群70株を特定して分析対象とした。群別に患者間の点突然変異数を反映する系統樹を作成し、患者居住地の位置と変異数の関係を、地理情報システム（GIS）を用いて視覚化した。さらに、距離行列回帰 multiple regression on distance matrices（MRM）のロジスティック回帰版を利用し、どのような患者間の組み合わせが直接的な感染を示唆する配列一致性（変異数5以下を1、それ以外を0）と関連するのかを解析した。

【結果】平面次元に患者居住地、垂直方向に各感染者群の系統樹の根からの変異数をGIS環境で視覚化した結果、伝播を重ねるとともに患者の分布が空間的に拡大すること、それには性別等の患者属性による違いがみられることが観察された。MRMの結果、居住地間距離が2km未満の患者間では、10km以上の患者間と比べて、直近の感染と推定されるオッズ比（OR）が32.7（モンテカルロ p 値=0.015）等、地理的近接性との関連が認められた。さらに、男性同士の患者間のORが3.1（<0.01：参照カテゴリは異性間）、互いに30代未満の患者間のORが4.3（<0.01：参照カテゴリは異なる年齢層間）等、患者属性との関連も確認された。

【結論】ゲノム比較に基づく伝播「時間」と患者の地理的近接性は関連している。その関連性は患者属性間の組み合わせによって変化するため、これに着目した経路解析の重要性が示唆される。

山形県におけるヒトコロナウイルスの流行状況

駒林賢一，的場洋平，青木洋子，瀬戸順次，池田辰也，水田克巳，松寄葉子，板垣勉

第46回山形県公衆衛生学会，2020年3月5日，於米沢，（誌上発表）

【背景・目的】ヒトコロナウイルス（HCoV）は6種が知られている。中でも重症急性呼吸器症候群と中東呼吸器症候群を除いた，HCoV-OC43，HCoV-NL63，HCoV-HKU1，HCoV-229Eの4種は市中での流行がみられ，海外ではヒトの風邪症候群の原因ウイルスとして10-15%程度を占めると報告されている。しかし国内におけるHCoVの流行状況や遺伝子型についての報告は少ない。そこで，我々は山形県におけるHCoVの流行状況を調べ，特にHCoV-OC43ならびにHCoV-NL63の遺伝子的多様性を明らかにすることを目的とした。

【方法】2010-2018年に山辺こどもクリニックを受診し，急性上気道炎または急性下気道炎と診断された患者から鼻咽頭拭い液を得て検体とした。検体よりRNAを抽出し，cDNAに逆転写した。2010-2013年

に得た検体については PCR 法によりヒトコロナウイルス特異的ポリメラーゼ遺伝子を増幅し、ダイレクトシーケンス法で塩基配列を決定して種を特定した。2014 年以降の検体はリアルタイム PCR 法により 4 種の HCoV それぞれに特異的な遺伝子をターゲットとして検出した。次に、HCoV-OC43, HCoV-NL63 が陽性であった cDNA を用いて spike 遺伝子の部分配列を PCR 法により増幅し、ダイレクトシーケンス法で塩基配列を決定した。遺伝子型が既知の HCoV-NL63, HCoV-OC43 の spike 遺伝子の配列をデータベースから取得し、系統樹解析により本研究で得た配列の遺伝子型を推定した。

【結果】8480 検体中 685 検体 (8.1%) から HCoV 遺伝子が検出された。ウイルス種別は、HCoV-OC43 (271/8480, 3.2%), HCoV-NL63 (240, 2.8%), HCoV-HKU1 (118, 1.4%), HCoV-229E (56, 0.7%) の順に多かった。HCoV-OC43 と HCoV-NL63 は毎年流行を繰り返していたのに対し、HCoV-HKU1 と HCoV-229E は隔年あるいは 3 年毎に流行がみられた。いずれの HCoV も、山形県におけるインフルエンザ流行期である 12-4 月を中心に流行が見られた。2010-2018 年の 12-4 月に限定すると 3539 検体中 553 検体 (15.6%) から HCoV 遺伝子が検出された。ウイルス種別は、HCoV-OC43 (212/3539, 6.0%), HCoV-NL63 (192, 5.4%), HCoV-HKU1 (101, 2.9%), HCoV-229E (48, 1.4%) であった。また、358/553 検体 (64.7%) はインフルエンザ迅速診断キットで陰性と診断されていた。HCoV-OC43 の遺伝子型は B, D, E, F, G, H, HCoV-NL63 の遺伝子型は A, B, C とそれぞれ推定でき、いずれも海外で報告されている株と類似していた。

【考察】本研究では 2010-2018 年の山形県における HCoV の流行が冬季中心であることに加え、HCoV-OC43, HCoV-NL63 の spike 遺伝子の遺伝子型が海外で既報の型に類似している可能性を示した。HCoV の検出率はインフルエンザ流行期に高く、検出された患者の 6 割はインフルエンザを疑った迅速検査を実施されていることから、HCoV は冬季の急性呼吸器感染症の鑑別診断として重要であると考えられた。HCoV-OC43, HCoV-NL63 は複数の遺伝子型が交代しながら流行していることが推定されるため、今後は遺伝子型の違いにより、病原性や流行様式に違いがみられるかどうかを調べていく必要がある。

山形県におけるカルバペネム耐性腸内細菌科細菌 (CRE) の検出状況

三瓶美香, 小川直美, 瀬戸順次, 池田辰也, 水田克巳

第 46 回山形県公衆衛生学会, 2020 年 3 月 5 日, 於米沢, (誌上発表)

【はじめに】カルバペネム耐性腸内細菌科細菌 (CRE) 感染症は、 β ラクタム系抗菌薬の切り札であるカルバペネム系抗菌薬に対して耐性を獲得した腸内細菌科細菌による感染症の総称である。CRE 感染症は世界的な脅威として捉えられており、本邦でも 2014 年 9 月より感染症法上の 5 類全数把握疾患に追加された。また、2017 年 3 月の国の通知以降、地方衛生研究所等が患者由来 CRE の精査をすることとなった。今回、山形県の CRE 感染症発生状況および当所で行った CRE の精査結果を報告する。

【方法】2015 年 1 月 1 日から 2019 年 12 月 31 日までに本県で届出された CRE 感染症患者の基本情報、および 2017 年 4 月 1 日から 2019 年 12 月 31 日までに当所で行ったカルバペネマーゼ遺伝子検査の結果について記述した。

【結果】CRE 感染症患者は 5 年間で 62 人届出された。男性が 37 人 (60%)、年齢中央値は 74 歳であった。地域別では、村山 25 人、最上 3 人、置賜 8 人、庄内 26 人であった。

62 株の菌種は、*Enterobacter aerogenes* (n=20, 32%), *Enterobacter cloacae* (n=7, 11%) *Escherichia coli* (n=7, 11%), *Klebsiella pneumoniae* (n=6, 10%) の順であった。分離検体は、尿 (n=24, 37%)、血液 (n=9, 14%)、胆汁 (n=7, 11%) 腹水 (n=5, 8%) の順に多かった。

カルバペネマーゼ遺伝子検査は 62 株中 30 株で実施し、うち 7 株 (23%) が陽性と判定された。いずれの株も IMP 型メタロ β ラクタマーゼ遺伝子を保有していた。当該 7 株の由来患者の報告時期は散発的であったが、地域的には全て村山地域から報告されていた。

【考察】CRE のうち、腸内細菌科細菌の種を超えて耐性能が水平伝播し得るカルバペネマーゼを有する CRE (カルバペネマーゼ産生腸内細菌科細菌：CPE) は、感染管理上特に重要とされている。本県においても年間数例ではあるが CPE 患者が見出されており、今後の時期的、地域的な発生動向を追究していく必要がある。また、今回検出された CPE は国内報告の多い IMP 型であったが、国内では海外型 (NDM 型、KPC 型) の増加が示唆されている。今後、カルバペネマーゼ遺伝子の種類についても注目し、県内への新規遺伝子型の流入を監視していく必要がある。

【結語】世界的な問題となっている CRE 感染症に関して、今後も継続的に発生状況やその特徴を把握していき、県内での CRE 感染症蔓延の阻止に向けた取り組みのための基礎情報を蓄積していく必要がある。

キノコ毒多成分一斉分析法および PCR 法による毒キノコ食中毒の原因検証

太田康介、伊藤育子、平健吾、沼澤聡明、笠原翔悟、本間弘樹

第 115 回日本食品衛生学会学術講演会，2019 年 10 月 3-4 日，於東京

2018 年 9 月山形県酒田市において、同市内の公園で採取したキノコ(味噌汁)を原因とする食中毒が発生した。当該食中毒では未調理キノコや喫食残品等が入手できなかった。そこで、患者 1 名の吐物および原因キノコの採取地点に自生していたキノコを試料として新たに開発したキノコ毒多成分一斉分析法、PCR 法を用いて原因を検証した。

模擬残留試料を用いた均一化法の比較

篠原秀幸、大河原龍馬、進藤裕文、石田恵崇、平健吾、太田康介、佐藤陽子、本間弘樹

第 115 回日本食品衛生学会学術講演会，2019 年 10 月 3-4 日，於東京

食品中の残留農薬分析において、作物中の農薬成分の分布は部位により異なるため、分析試料をサブサ

ンプリングする際の試料の均一性が定量精度に影響する。特に果物類等は均一化の際に果皮や種子等の固形分と、果実由来の水分が分離することがある。

そこで、収穫後の果物に農薬を付着させた模擬残留試料を作製し、一般的な室温での均一化法とドライアイスを用いた凍結粉砕法で均一化した後、複数回サブサンプリングした際のピーク面積の変動係数を比較した。その結果、変動係数はほぼ全ての対象作物および農薬成分で凍結粉砕法の方が小さい傾向を示した。このことから、単回のサブサンプリングによる分析では、凍結粉砕法で均一化した方が定量精度が高い可能性があると考えられた。

Clitidine をターゲットとした新規ドクササコ分析法開発に関する研究

石田恵崇, 真田拓生, 篠原秀幸, 本間弘樹

第 56 回全国衛生化学技術協議会年会, 2019 年 12 月 5-6 日, 於広島

有毒キノコであるドクササコは、ハツタケ類やチチタケ等と誤食されることがあり、主要な中毒症状は四肢末端の発赤・腫脹および激痛で、症状が 1 か月以上続く場合もある。ドクササコ固有の各成分は市販の標準品がなく、機器分析による定性/定量が困難である。そこで我々は、比較的含有量が多い Clitidine をターゲット化合物とし、子実体からの標準品作成および食中毒発生時を想定した新規分析法の開発に着手した。

種々検討の結果、TLC で挙動を追跡しながら、順相および逆相の固相カラムカートリッジを用いて順次精製を行うことで、高純度の Clitidine 結晶を得ることに成功した。続けて、単離精製した標準品を基に機器分析法の検討を行い、シイタケ及びシメジをブランク品として添加回収試験(各 $n=3$)を実施したところ、平均回収率、CV 値ともに良好な結果が得られた。以上のことから、当該試験法は食中毒発生時の原因究明方法として十分な精度を有していると考えられ、目的とする実用的な新規分析法の開発に成功した。

呈色反応によるツキヨタケの理化学的鑑別法 (第 2 報)

篠原秀幸, 大河原龍馬, 太田康介, 石田恵崇, 佐藤陽子, 本間弘樹

第 46 回山形県公衆衛生学会, 2020 年 3 月 5 日, 於米沢, (誌上発表)

山形県で発生した毒キノコ食中毒はツキヨタケを原因とする事例が大半を占めている。ツキヨタケは可食のムキタケ、ヒラタケ、シイタケ(以下、食用キノコ)と外観が類似し、採取時に両者を誤認しやすい。

このような状況を鑑み、これまでにツキヨタケと食用キノコの鑑別法開発に取り組んできた。前報では 5%水酸化カリウム含有エタノール溶液(ビーム試薬)による呈色反応が鑑別に有用であることを報告した。

今回、その手法を基に実験室外で実施可能なツキヨタケ簡易鑑別キット（以下、キット）を開発し、山形県内の各保健所の協力を得て実証実験を行った。その中で、食中毒事例 2 件でキットを用いた鑑別が行われた。いずれの事例においても、保健所職員によるキットを用いた収去検体の鑑別および当所での機器分析によりツキヨタケであることを確認した。キットによる鑑別は、客観的かつ操作が簡便、短時間で鑑別できることから、多検体を対象としたスクリーニング法として有用であることが示唆された。

山形県における感染症媒介蚊の生息状況調査（2016-18 年）

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

第 71 回日本衛生動物学会，2019 年 4 月 20-21 日，於山口

山形県内に生息する蚊の種別構成と季節的消長について調査した。内陸部である村山地区の 5 地点と、沿岸部である庄内地区 5 地点において、ドライアイス併用ライトトラップ法を用いて、6 月～10 月の隔週、月 2 回捕集を行った。捕集した蚊は、マイクロスコープを用いて形態学的に種別を同定した。結果、蚊の捕集総数は 2016 年 890 個体，2017 年 333 個体，2018 年 436 個体であり，10 種（アカイエカ群，ヒトスジシマカ，ヤマトヤブカ，ハマダライエカ，コガタアカイエカ，カラツイエカ，オオクロヤブカ，シナハマダラカ，オオクロヤブカ，ヤマトクロホシヒゲカ）に同定された。最も多く捕集されたのは，両地区ともにアカイエカ群であり，次いでヒトスジシマカが多く捕集された。アカイエカ群の捕集数は月別の平均気温と強い正の相関を示した。降水量が少なく，気温が高かった 2018 年は，ヒトスジシマカの捕集数が少なかった。これは，ヒトスジシマカの産卵場所となる小水域の水が蒸発し，幼虫が生息できなかったためと考えられる。

山形県におけるインフルエンザ流行状況

細谷翠, 小川直美, 小松秀一, 長岡由香

第 46 回山形県公衆衛生学会，2020 年 3 月 5 日，於米沢（誌上発表）

感染症発生動向調査により得られたインフルエンザ報告数，山形県衛生研究所におけるウイルス検査の結果等を用いて流行状況を分析した。2019/20 シーズンは，例年より早い第 46 週に流行入りとなった。定点当たり報告数が第 52 週に警報開始基準の 30 人以上となり，累積報告数は 4481 人で過去 5 シーズンと比較して最も多い報告数となった。シーズン全体に占めるインフルエンザウイルスの割合は，2014/15，2016/17，2018/19 シーズンでは AH3 亜型が，2015/16 シーズンでは AH1pdm09 亜型が，2017/18 シーズンでは B 型（山形系統）が多かった。病原体サーベイランスにおいて報告された臨床症状を解析したとこ

ろ、発熱が季節性インフルエンザ（AH1pdm09 亜型，AH3 亜型，B 型（ビクトリア系統），B 型（山形系統））のほぼ全例でみられ，胃腸炎や腹痛などの腹部症状は AH3 亜型と B 型（山形系統）でみられた．最高体温 38.5 度以上の患者の割合を型別で比較すると A 型が B 型と比較して多い傾向にあった．また，週別の集団発生報告数と定点当たり報告数から，インフルエンザの感染拡大には集団生活が大きな要因であることが考えられた．

山形県における感染症媒介蚊の生息状況

小川直美，細谷翠，小松秀一，長岡由香

第 46 回山形県公衆衛生学会，2020 年 3 月 5 日，於米沢（誌上発表）

山形県内における 2016-18 年の蚊成虫生息状況調査，2019 年の蚊幼虫発生源調査の結果を報告した．成虫生息状況調査において，最も多く捕集されたのはアカイエカ群であり，次いでヒトスジシマカが多く捕集された．周辺環境により種別構成に相違がみられ，ヒトスジシマカは住宅地で多く捕獲される傾向があった．アカイエカ群の捕集数のピークは 7 月から 8 月であり，ヒトスジシマカの捕集数のピークは村山地区で 7 月から 8 月，庄内地区で 8 月から 9 月であった．幼虫発生源調査の結果，13 施設中 10 施設でボウフラの発生がみられた．ボウフラの発生がみられた溜水の水量は 8 割が 10L 以上であり，これは調査を行った 2019 年 8-9 月の気温が高く降水量が少なかったため，小さな溜水では蒸発のために溜水を数日間維持することが困難であり，ボウフラが生息できなかったためと考えられる．