

抄 録

1) 他誌掲載論文

**Proposal for the recognition of a new disease concept from Japan;
Parechovirus A3-associated myalgia**

Mizuta K, Aoki Y, Komabayashi K, Ikeda T

Jpn J Infect Dis. 2021;74:259-272.

Parechovirus A3 (PeVA3) was first reported in 2004 and has been recognized as a causative agent of mild and severe infectious diseases in children. We first reported an outbreak of PeVA3-associated myalgia (PeVA3-M) in Yamagata, Japan, in 2008. We have repeatedly observed PeVA3-M cases in 2011, 2014, and 2016, and identified the first child case in 2014. Reports of PeVA3-M have increased since 2014, indicating that the recognition of PeVA3-M has spread across Japan. The findings showed that PeVA3-M commonly occurs among adults aged 30-40 years, particularly in males. Elevation of creatinine phosphokinase, C-reactive protein, and myoglobin, as well as magnetic resonance imaging findings, suggest inflammation of the muscles and/or fascia of the four limbs. Patients recover within 1-2 weeks without any sequelae. A longitudinal molecular epidemiological study in Yamagata revealed that PeVA3 strains cause a variety of diseases, ranging from mild to severe, including PeVA3-M, in subjects ranging from neonates to adults, irrespective of their genetic cluster. As PeVA3-M has not yet been reported abroad, more widespread recognition of PeVA3-M as an emerging disease is important. We hope this review will help clinicians and researchers in understanding PeVA3-M and therefore advance related research in Japan as well as around the world.

**Isolation of human coronaviruses OC43, HKU1, NL63, and 229E in
Yamagata, Japan, using primary human airway epithelium cells cultured
by employing an air-liquid interface culture**

Komabayashi K, Matoba Y, Seto J, Ikeda Y, Tanaka W, Aoki Y, Ikeda T, Matsuzaki Y, Itagaki T,
Shirato K, Mizuta K

Jpn J Infect Dis. 2021;74:285-292.

Isolation of seasonal coronaviruses, which include human coronavirus (HCoV) OC43, HCoV-HKU1, and HCoV-

NL63, from primary cultures is difficult because it requires experienced handling, an exception being HCoV-229E, which can be isolated using cell lines such as RD-18S and HeLa-ACE2-TMPRSS2. We aimed to isolate seasonal CoVs in Yamagata, Japan to obtain infective virions useful for further research and to accelerate fundamental studies on HCoVs and SARS-CoV-2. Using modified air-liquid interface (ALI) culture of the normal human airway epithelium from earlier studies, we isolated 29 HCoVs (80.6%: 16, 6, 6, and 1 isolates of HCoV-OC43, HCoV-HKU1, HCoV-NL63, and HCoV-229E, respectively) from 36 cryopreserved nasopharyngeal specimens. In ALI cultures of HCoV-OC43 and HCoV-NL63, the harvested medium contained more than 1×10^4 genome copies/ μL at every tested time point during the more than 100 days of culture. Four isolates of HCoV-NL63 were further subcultured and successfully propagated in an LLC-MK2 cell line. Our results suggest that ALI culture is useful for isolating seasonal CoVs and sustainably obtaining HCoV-OC43 and HCoV-NL63 virions. Furthermore, the LLC-MK2 cell line in combination with ALI cultures can be used for the large-scale culturing of HCoV-NL63. Further investigations are necessary to develop methods for culturing difficult-to-culture seasonal CoVs in cell lines.

Investigation of a Legionnaires' disease outbreak using direct sequence-based typing in Yamagata City, Japan, 2019

Seto J, Amemura-Maekawa J, Sampei M, Araki K, Endo M, Kura F, Ikeda T, Kato K, Ohnishi M, Mizuta K

Jpn J Infect Dis. 2021;74:491-494.

抄録なし

Epidemiology of coronavirus disease 2019 in Yamagata Prefecture, Japan, January–May 2020: The importance of retrospective contact tracing

Seto J, Aoki Y, Komabayashi K, Ikeda Y, Sampei M, Ogawa N, Uchiumi Y, Fujii S, Chiba M, Suzuki E, Takahashi T, Yamada K, Otani Y, Ashino Y, Araki K, Kato T, Ishikawa H, Ikeda T, Abe H, Ahiko T, Mizuta K

Jpn J Infect Dis. 2021;74:522-529.

Public health interventions have played an important role in controlling coronavirus disease 2019 (COVID-19), which is a rapidly spreading infectious disease. To contribute to future COVID-19 countermeasures, we aimed to

verify the results of the countermeasures employed by public health centers (PHCs) against the first wave of COVID-19 in Yamagata Prefecture, Japan (Yamagata). Between January and May 2020, 1,253 patients suspected of SARS-CoV-2 infection were invited for testing. Simultaneously, based on retrospective contact tracings, PHCs investigated the infection sources and transmission routes of laboratory-confirmed COVID-19 cases and tested 928 contacts. Consequently, 69 cases were confirmed between March 31 and May 4, 58 of whom were from among the contacts (84.1%; 95% confidence interval [CI] 75.5-92.7). The spread of infection was triggered in cases harboring epidemiological links outside Yamagata. Subsequently, the number of cases rapidly increased. However, PHCs identified epidemiological links in 61 (88.4%; 95% CI 80.8-96.0) of the 69 cases, and transmission chains up to the fifth generation. Finally, the spread of infection ended after approximately one month. Our results indicate that the identification of infection sources and active case finding from contacts based on retrospective contact tracing was likely to be an effective strategy in ending the first wave of COVID-19 in Yamagata.

Virulence of enterovirus-A71 fluctuates depending on the phylogenetic clade formed in the epidemic year and epidemic region

Kobayashi K, Nishimura H, Mizuta K, Nishizawa T, Chu ST, Ichimura H, Koike S

J Virol. 2021;95:e01515-21.

Although epidemics of hand, foot, and mouth disease (HFMD) caused by enterovirus A71 (EV-A71) have occurred worldwide, the Asia-Pacific region has seen large sporadic outbreaks with many severe neurological cases. This suggests that the virulence of the circulating viruses fluctuates in each epidemic and that HFMD outbreaks with many severe cases occur when highly virulent viruses are circulating predominantly, which has not been experimentally verified. Here, we analyzed 32 clinically isolated strains obtained in Japan from 2002 to 2013, along with 27 Vietnamese strains obtained from 2015 to 2016 that we characterized previously using human SCARB2 transgenic mice. Phylogenetic analysis of the P1 region classified them into five clades belonging to subgenogroup B5 (B5-I to B5-V) and five clades belonging to subgenogroup C4 (C4-I to C4-V) according to the epidemic year and region. Interestingly, clades B5-I and B5-II were very virulent, while clades B5-III, B5-IV, and B5-V were less virulent. Clades C4-II, C4-III, C4-IV, and C4-V were virulent, while clade C4-I was not. The result experimentally showed for the first time that several clades with different virulence levels emerged one after another. The experimental virulence evaluation of circulating viruses using SCARB2 transgenic mice is helpful to assess potential risks of circulating viruses. These results also suggest that a minor nucleotide or amino acid substitution in the EV-A71 genome during circulation causes fluctuations in virulence. The data presented here may increase our understanding of the dynamics of viral virulence during epidemics. **IMPORTANCE** Outbreaks of hand, foot, and mouth disease (HFMD) with severe enterovirus A71 (EV-A71) cases have occurred repeatedly, mainly in Asia. In severe cases, central nervous system complications can lead to death, making it an infectious

disease of importance to public health. An unanswered question about this disease is why outbreaks of HFMD with many severe cases sometimes occur. Here, we collected EV-A71 strains that were prevalent in Japan and Vietnam over the past 20 years and evaluated their virulence in a mouse model of EV-A71 infection. This method clearly revealed that viruses belonging to different clades have different virulence, indicating that the method is powerful to assess the potential risks of the circulating viruses. The results also suggested that factors in the virus genome cause an outbreak with many severe cases and that further studies facilitate the prediction of large epidemics of EV-A71 in the future.

2) 学会発表

山形県における2010～2019年の季節性コロナウイルスの疫学研究

水田克巳, 松寄葉子

第62回日本臨床ウイルス学会, 2021年6月12日-13日, Web 開催

【背景】季節性コロナウイルスは4種類(OC43, NL63, HKU1, 229E)が知られ, 感冒の原因ウイルスとされている。しかし, 我々が1999年から山形県で実施してきた小児の呼吸器検体からのウイルス分離では全く分離することができていなかった。そこで, 2010年, 検体から直接ウイルス遺伝子を検出する逆転写PCR法を導入することにした。【目的】長期にわたる山形における季節性コロナウイルスの疫学を解明する。【方法】2010年から2019年までに, 急性気道感染症として山辺こどもクリニックを訪れた15歳以下の小児の呼吸器検体(9,122検体)を採取し, ウイルス遺伝子検出を行った。【結果と考察】720検体からウイルスを検出した(うち2検体では2種類を検出; 7.9%)。多い順にOC43(286; 39.6%), NL63(261; 36.1%), HKU1(120; 16.6%), 229E(55; 7.6%)であった。OC43とHKU1陽性者の年齢中央値はNL63と229Eのそれよりも有意に低かった。OC43とNL63は毎年流行がみられたのに対し, HKU1と229Eは2年毎に大きなピークを作った。総じて, 季節性コロナウイルス陽性率は11-12月から上昇し始め, 1-2月に19.7~20.5%のピークを作り, 3-4月から減少する傾向があることが示唆された。季節性インフルエンザと流行時期が重なるため両者の鑑別も重要である。今後, SEVERE ACUTE RESPIRATORY SYNDROME CORONAVIRUS 2との季節性の異同等, 比較検討していく必要がある。[非会員研究協力者: 板垣勉(山辺こどもクリニック), 駒林賢一, 瀬戸順次, 的場洋平, 青木洋子, 田中静佳, 池田辰也(山形衛研)]

1976年から2017年の山形におけるパレコウイルス A1/3/4型の血清疫学

水田克巳

第62回日本臨床ウイルス学会，2021年6月12日-13日，Web 開催

【目的】パレコウイルス感染症は，気道感染症や胃腸炎など日常よくみられる感染症から敗血症など重症感染症に至るまで臨床症状もさまざまであり，小児科領域では特に重要な感染症の1つである．パレコウイルス A1 型 (PeVA1) と PeVA3 の検出が多く，PeVA4 や PeVA6 がそれに続いている．今回は，山形県におけるこれらウイルスの罹患状況及びその経時的変化を解明することを目的とした．【方法】PeVA1・A3・A4 山形分離株をウイルス抗原として，1976・1983・1985・1990・1999・2017 年に感染症流行予測事業のために採取された血清を用い，段階希釈して混合・反応させ，LLC-MK2-N 細胞に接種して中和抗体価を測定した．【結果と考察】各年の陽性率をみると，PeVA1 は研究期間を通じて 90.7-100%，PeVA3 は 1976 年の 39.6%から 2017 年の 69.6%へと上昇，PeVA4 は 1976 年の 93.9%から 2017 年の 49.1%と低下した．また 1:32 以上の抗体保有者の割合をみると，PeVA1 は研究期間を通じて 68.0-89.2%，PeVA3 は 1976 年の 15.4%から 1999-2017 年の 64.8-68.0%へと上昇，PeVA4 は 1976—1990 年の 49.1-67.2%から 2017 年の 23.8%へと低下していた．これらのことから，PeVA1 は，長期にわたり安定してほとんどのヒトに感染する状況が続いている，PeVA3 は，1970 年頃 (?) に新しいウイルス (新興感染症) として出現し，感染機会が増加傾向にある，PeVA4 は，1970 年代はほとんどのヒトが感染するウイルスであったが，感染機会は減少してきている，と考えられた．[非会員研究協力者：板垣勉 (山辺こどもクリニック)，駒林賢一，青木洋子，池田辰也 (山形衛研)]

新型コロナウイルスゲノム解析の現状と課題

瀬戸順次，駒林賢一，池田陽子

令和 3 年度獣医学術東北地区学会 日本獣医公衆衛生学会東北地区，2021 年 10 月 11 日-31 日，Web 開催

1. はじめに：今なおパンデミックを引き起こしている新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) 対策として，新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) のゲノム情報を活用しようとする機運が急速に高まっている．本研究では，2021 年 5 月に山形県で開始したウイルスゲノム情報を利用した COVID-19 対策の現状を示し，将来にわたって持続可能な事業とするために必要な課題を検討することを目的とした．
2. 材料および方法：2021 年 4 月 18 日～8 月 20 日に山形県で報告された 1,431 人の SARS-CoV-2 感染者のうち，家庭内感染，飲食店クラスター等の各事例の代表として 190 人 (13.3%) の検体を選択した．それら検体から抽出した RNA を材料として，国立感染症研究所 (感染研) の解析マニュアルに従って SARS-CoV-2 ゲノム配列情報を取得した．解析機器は，MinION Mk1C (感染研より貸与) を用いた．得ら

れたゲノム配列情報から系統情報を取得するとともに、ウイルスゲノム配列間の変異蓄積の系譜を示したネットワーク図を作成した。得られた結果は、都度、保健所・県庁主管課と共有した。

3. 成績：解析した 190 検体の系統型別結果は、アルファ 80 検体、デルタ 75 検体、R.1 34 検体、および不明 1 検体であった。ネットワーク図の結果からは、同一地域における複数のクラスターの感染者が同一ゲノム配列のウイルスを共有する傾向を認めた。当所の最大実施可能検体数である 24 検体の解析を例にとると、検体選択に半日、実験室での作業に 1 日、取得されたデータの解析・報告書作成等に 1 日を要し、事務処理が極めて煩雑なことが判明した。そのため、Microsoft Excel の Visual Basic for Applications (VBA)を用いた事務処理の自動化を順次進め、作業を効率化していった。

4. 考察：解析系の構築・改善は感染研の手厚い支援により成し得たが、解析に携わるためには獣医系大学教育レベルの分子生物学的技能が最低限必要と考えられた。疫学情報を組み入れた解析実施のためには、Excel の VBA、関数、ピボットテーブル、ショートカットの機能を駆使した作業の効率化が必須と考慮された。衛生研究所において感染症（特に人獣共通感染症）や病原体の知識を有する獣医師の活躍が求められている。大学教育において分子生物学技能を付与する機会を厚くすること、およびプログラミングの技能を習得可能な環境を整備していくことが、将来的に、公衆衛生獣医師の一配属先である衛生研究所での獣医師の活躍を後押しすることにつながると考えられた。

時空間三次元地図を用いた COVID-19 流行の可視化

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

第 80 回日本公衆衛生学会総会，2021 年 12 月 21-23 日，ハイブリッド開催

【背景】感染症の流行状況を的確に示すためには、時・場所・人の 3 つの情報の要約が求められる。われわれは、未曾有のパンデミックを引き起こしている新型コロナウイルス感染症（以下、COVID-19）について、山形県における流行が「いつ・どこで・どのように」広がっているかを地域住民にわかりやすく伝えることを目的として、COVID-19 時空間三次元マップ（以下、マップ）を開発した。

【方法】山形県、山形市のプレスリリースおよび記者会見情報を基に感染者の疫学情報をリスト化し、R version 3.4.3 (rgl, proj4, misc3d, sf, OpenStreetMap, gdata, xlsx の各ライブラリを付加)を用いてマップ（自由に回転、拡大・縮小が可能な html ファイル）を作成した。マップ底面に山形県地図を配し、各感染者は、XY 平面の居住地市町村（代表点から規定範囲でランダムに配置）と Z 軸の発病日（推定を含む）の交点にプロットした。さらに、疫学的関連性のある感染者を感染経路別に色分けした矢印でつなぎ、感染の広がりを表現した。完成したマップは、山形県衛生研究所ホームページ（<http://www.eiken.yamagata.yamagata.jp>）上で公開し、随時更新した。

【結果】2020 年 8 月 26 日にマップの公開を開始し、以降、原則として新規感染者のプレスリリースがなされた翌勤務日に最新のマップを作成・公開した。公開当初は単に流行状況を示すのみであったが、山形

県内で大きな流行が起きるたび、流行の要因を分析した結果を順次追加した。最終的に、それら分析結果を総合して得られた山形県における COVID-19 流行の全体像をホームページ上に掲載した。特に、山形県の感染者は、経済的つながりの深い宮城県や首都圏における感染者や人流の増加後に増えること、および飲食店クラスターや家庭内感染が県内での感染の拡大・持続に影響を与えていることを強調した。さらに、今後の山形県における COVID-19 流行抑止につなげるため、飲食店クラスターの未然防止および家庭内感染の予防のための具体的な感染予防対策を示し、地域住民に対策の徹底を呼びかけた。

【結論】 COVID-19 の流行状況を平易な図にまとめて公開していくことで、風化しがちな過去の流行の経過を蓄積することが可能になると考えられた。併せて、蓄積された事実は、地域の実態に即した感染予防対策を考案し、地域住民に対策をうながすための根拠となることが示唆された。

新型コロナウイルスゲノム解析の現状と課題

瀬戸順次，駒林賢一，池田陽子

令和 3 年度日本獣医師会獣医学術学会年次大会（東北地区学会長賞受賞演題），

2022 年 1 月 21 日-2 月 6 日，Web 開催

1. はじめに：今なおパンデミックを引き起こしている新型コロナウイルス感染症（COVID-19）対策として、新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）のゲノム情報を活用しようとする機運が急速に高まっている。本研究では、2021 年 5 月に山形県で開始したウイルスゲノム情報を利用した COVID-19 対策の現状を示し、将来にわたって持続可能な事業とするために必要な課題を検討することを目的とした。
2. 材料および方法：2021 年 4 月 18 日～8 月 20 日に山形県で報告された 1,431 人の SARS-CoV-2 感染者のうち、家庭内感染、飲食店クラスター等の各事例の代表として 190 人（13.3%）の検体を選択した。それら検体から抽出した RNA を材料として、国立感染症研究所（感染研）の解析マニュアルに従って SARS-CoV-2 ゲノム配列情報を取得した。解析機器は、MinION Mk1C（感染研より貸与）を用いた。得られたゲノム配列情報から系統情報を取得するとともに、ウイルスゲノム配列間の変異蓄積の系譜を示したネットワーク図を作成した。得られた結果は、都度、保健所・県庁主管課と共有した。
3. 成績：解析した 190 検体の系統型別結果は、アルファ 80 検体、デルタ 75 検体、R.1 34 検体、および不明 1 検体であった。ネットワーク図の結果からは、同一地域における複数のクラスターの感染者が同一ゲノム配列のウイルスを共有する傾向を認めた。当所の最大実施可能検体数である 24 検体の解析を例にとると、検体選択に半日、実験室での作業に 1 日、取得されたデータの解析・報告書作成等に 1 日を要し、事務処理が極めて煩雑なことが判明した。そのため、Microsoft Excel の Visual Basic for Applications (VBA) を用いた事務処理の自動化を順次進め、作業を効率化していった。
4. 考察：解析系の構築・改善は感染研の手厚い支援により成し得たが、解析に携わるためには獣医系大学教育レベルの分子生物学的技能が最低限必要と考えられた。疫学情報を組み入れた解析実施のためには、Excel の VBA、関数、ピボットテーブル、ショートカットの機能を駆使した作業の効率化が必須と思

慮された。衛生研究所において感染症（特に人獣共通感染症）や病原体の知識を有する獣医師の活躍が求められている。大学教育において分子生物学技能を付与する機会を厚くすること、およびプログラミングの技能を習得可能な環境を整備していくことが、将来的に、公衆衛生獣医師の一配属先である衛生研究所での獣医師の活躍を後押しすることにつながると考えられた。

山形県内マダニのマダニ媒介感染症病原体調査

瀬戸順次，東英生，田中静佳，小城伸晃，中村夢奈，池田辰也，水田克巳

令和3年度日本獣医師会獣医学術学会年次大会（獣医学術奨励賞記念講演），
2022年1月21日-2月6日，Web開催

山形県におけるマダニ媒介感染症（TBD）発生の考察の一助とするため、2016～2018年に山形県内で採取された植生マダニ成虫及び野生動物由来マダニ成虫の種構成の把握、並びにTBD病原体遺伝子の検出を試みた。植生マダニ258匹は3属5種に分類され、ヤマトマダニ *Ixodes ovatus* が78.7%を占めるなど、全体の91.1%がマダニ属であった。その中でも、南方系とされるタイワンカクマダニ *Dermacentor taiwanensis* が3匹採取されたことは、マダニ種の国内分布を考えるうえで特筆に値する。野生動物7種20頭から採取されたマダニ112匹は2属5種に分類され、ヤマトマダニ（42.0%）、ヒトツトゲマダニ *Ixodes monospinosus*（23.2%）、キチマダニ *Haemaphysalis flava*（23.2%）が上位3種を占めた。植生マダニ158匹（同一地点で同一種が15匹以上採取された場合、調査数を限定した）及び野生動物由来マダニ112匹の全検体について、国内既知のTBDである日本紅斑熱、ライム病、回帰熱、ダニ媒介脳炎、及び重症熱性血小板減少症候群の病原体遺伝子は不検出だった。一方、ヒトツトゲマダニ30匹及びヤマトチマダニ *Haemaphysalis japonica* 1匹からは *Rickettsia helvetica*、タネガタマダニ *Ixodes nipponensis* 1匹からは *Rickettsia monacensis* 特異的塩基配列が検出され、日本以外の東アジア地域におけるリケッチア症の原因である紅斑熱群リケッチアが山形県においても存在することが示唆された。本研究により、山形県では国内既知のTBDは人に対する大いなる脅威とは言えないものの、国内未報告のTBDを含め、今後もTBD症例発生に対する注意が必要であると考えられた。

ドクササコに含有される有毒成分の系統的精製法および一斉分析法に関する研究

石田 恵崇，篠原 秀幸，大内 仁志，菅 敏幸，中島 克則

第58回全国衛生化学技術協議会年会，2021年11月25-26日，Web開催

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よく似ており、たびたび誤食される。主要な中毒症状は四肢末端の発赤・腫脹および激痛で、1か月以上にわたり症状が続く場合もある。また、痛みに対してほとんどの鎮痛剤が無効であり、効果的な治療法は血液吸着療法のみとされていることから、迅速な原因究明を行い適切な治療を開始することが重要である。しかしながら、ドクササコの有毒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、ドクササコの有毒成分であるアクロメリン酸A, Bおよびクリチジンの3成分について、それぞれキノコ子実体から単離精製する手法について検討を行った。その結果、シリカゲル、ODS、イオン交換樹脂を固定相としたカラムクロマトグラフィーおよび分取TLCを組み合わせることにより各成分を高純度で得ることに成功した。続けて、得られた精製物を用いてLC-MS/MSの測定条件を最適化し、多成分同時分析法を新規開発した。本分析法の実用性を確認するため添加回収試験を実施したところ、回収率が95.8-98.7%、併行精度が0.4-3.6%と良好な結果が得られたことから、ドクササコ中毒発生時、本分析法により原因キノコを迅速かつ高精度に特定可能であると判断した。

令和3年4月に山形県内で発生したスイセン食中毒事例における理化学検査

小林伶、和田章伸、進藤裕文、真田拓生、成田弥生、佐藤昌宏、酒井真紀子、中島克則

第48回山形県公衆衛生学会，2022年3月3日，於山形

令和3年4月、県内でニラとして譲り受けたスイセンを卵とじにして喫食し、2名が嘔気・嘔吐等の症状を呈する食中毒事例が発生した。食中毒の原因究明を目的に、喫食残品等をLC-MS/MSで測定した。

喫食残品、譲渡者宅に残っていた未調理の葉、患者吐物いずれからもリコリンおよびガラントアミンが検出され、本事例がスイセンによるものと示唆された。また、葉について調理前後で含有量比較したところ、リコリンは含有量に大きな差は無かったが、ガラントアミンは約1/3に減少していた。

