

## 第3章 調査研究・報告

### 第2節 資 料

## ジャガイモによる食中毒事件の発生について

折口菜都希・柚田有加・安藤尚子・岡山明子

Food Poisoning Caused by Potato

Natsuki ORIGUCHI・Yuka SOMADA・Naoko ANDO and Akiko OKAYAMA

### 緒言

平成27年1月22日、医療機関から桜井保健所へ「小学校において授業で栽培、収穫したジャガイモを5年生の児童が湯がき、粉ふきいもとして喫食したところ、約30分から1時間でむかつき、腹痛の症状を呈している」との届出があった。保健所の調査によると、喫食した2クラス51名（担任2名を含む）中31名に同様の症状があり、このうち13名が医療機関を受診していた。ジャガイモは、平成26年12月22日に収穫し、その後、校舎内階段下に保管されていたものを調理前日に担任が洗浄、調理直前に児童がピーラーで皮をむき、湯がいて喫食していた。

喫食したジャガイモには緑色のものがあり、苦みもあったことから、ソラニン類による食中毒が疑われた。そこで、当センターにてジャガイモ中の $\alpha$ -ソラニン及び $\alpha$ -チャコニンの分析を実施したので、その結果について報告する。

### 方法

#### 1. 試料

未加熱の生の皮つきジャガイモ残品及び調理済みの残食を試料とした。生のジャガイモは重量が13~378gのものがあり、その中から56g、77g、166gのジャガイモを選んで3検体とした。また、調理済みのものは調理したクラスごとに3検体ずつ採取し、未調理品、調理品で計9検体について検査を行った。

#### 2. 試薬

アセトニトリル、メタノールは和光純薬工業(株)製高速液体クロマトグラフ用を、リン酸二水素カリウム、水酸化ナトリウムは和光純薬(株)製試薬特級を使用した。

標準品として $\alpha$ -ソラニン及び $\alpha$ -チャコニンはChromaDex社製を使用した。標準品は、それぞれメタノールで溶解し1,000 $\mu$ g/mLの標準原液を作製した。各標準原液を混合し、メタノールで希釈して各250 $\mu$ g/mLの混合標準液とした。

#### 3. 試験溶液の調製

細切した試料5gを採り、メタノール30mLを加えてホモジナイズし、吸引ろ過後、ろ液にメタノールを加えて全量を50mLとして0.45 $\mu$ mメンブレンフィルターでろ過し、これを試験溶液とした。

#### 4. HPLCによる定量測定

各試験溶液を表1に示す条件で測定し、標準液のピーク面積法により作成した検量線により定量した。

表1 HPLC 測定条件

装置	島津LC-10A
カラム	Inertsil ODS-3V(250 $\times$ 4.6 mm id, 5 $\mu$ m)
移動相	アセトニトリル-20 mmol/L リン酸塩緩衝液(pH7.0) (62:38)
カラム温度	40 $^{\circ}$ C
流速	0.6 mL/min
測定波長	205 nm
注入量	20 $\mu$ L

### 結果

各検体の $\alpha$ -ソラニン及び $\alpha$ -チャコニンの含有量を表2に示した。未調理のジャガイモからは、 $\alpha$ -ソラニンを9.4~15.5 mg/100g、 $\alpha$ -チャコニンを21.3~33.1 mg/100g、ソラニン類として30.7~48.6 mg/100g 検出し、調理済みのジャガイモからは $\alpha$ -ソラニンを6.4~15.1 mg/100g、 $\alpha$ -チャコニンを12.3~25.9 mg/100g、ソラニン類として18.7~39.2 mg/100g 検出した。

また、各検体中の $\alpha$ -ソラニンと $\alpha$ -チャコニンの含有比( $\alpha$ -チャコニン/ $\alpha$ -ソラニン)を表3に示した。すべての検体で $\alpha$ -チャコニンは $\alpha$ -ソラニンより多く含有しており、含有比は約1.4~2.9倍であった。未調理品と調理品を比較すると調理品の方が $\alpha$ -チャコニンの含有比が低い傾向にあり、 $\alpha$ -チャコニンの方が加熱によって失われ

やすいことが示唆された。

表2 ジャガイモ中のソラニン類含有量 (mg/100g)

検体		$\alpha$ -ソラニン	$\alpha$ -チャコニン	ソラニン類 (合計)
未調理品	1(56 g/個)	15.5	33.1	48.6
	2(77 g/個)	9.4	21.3	30.7
	3(166 g/個)	9.6	28.2	37.8
調理品 (5年1組)	1	8.6	17.4	26.0
	2	6.7	14.3	21.0
	3	15.1	21.9	37.0
調理品 (5年2組)	1	6.4	12.3	18.7
	2	13.9	19.5	33.4
	3	13.3	25.9	39.2

表3  $\alpha$ -ソラニンと $\alpha$ -チャコニンの含有比

検体		$[\alpha\text{-チャコニン}]/[\alpha\text{-ソラニン}]$
未調理品	1	2.14
	2	2.27
	3	2.94
調理品 (5年1組)	1	2.02
	2	2.13
	3	1.45
調理品 (5年2組)	1	1.92
	2	1.40
	3	1.95

### 考察

通常のジャガイモに含まれるソラニン類は約 7.5 mg/100g とされている<sup>1)</sup>が、検査を実施した未調理のジャガイモからは 30.7 ~ 48.6 mg/100g のソラニン類を検出しており、高濃度に含有していたといえる。また、ソラニン類はジャガイモの新芽や皮の緑色の部分に多く含まれる。このため、発育の不十分な小さいイモほどイモ全体に占める皮の割合が多くなることからソラニン類の含有量が多くなると考えられる。検査を実施した未調理のジャガイモ中にも小さいイモや緑色のものが含まれていた。

ソラニン類の中毒量は成人で 200 ~ 400 mg<sup>2)</sup>であり、これは本事例のジャガイモ調理品約 500 ~ 2,000 g に相当する。しかし、過去の食中毒事例<sup>3) 4)</sup>及び公益財団法人日本中毒情報センターの中毒情報から子どもの場合は成人の中毒量の 10 分の 1 でも発症することが知られており、今回の事例では調理品のジャガイモ約 50 ~ 200 g で

発症量に達していたと考えられる。また、給食前の空腹時に喫食したことも、ソラニン類の胃腸に対する刺激が増大した原因であると推察される。

ジャガイモを調理する際は、緑色を呈したイモや発育の不十分な小イモを避け、発芽部分や皮を厚く剥く等の注意が必要である。また、教職員はジャガイモには有毒物質であるソラニン類が含まれることを念頭に置き、児童が過量に摂取することのないよう配慮が望まれる。

ジャガイモによる食中毒は全国でほぼ毎年数件発生しており、特に学校の授業で喫食して食中毒事件となる事例が多い<sup>5)</sup>。本県でも平成 21 年に奈良市の小学校で児童が栽培、収穫したジャガイモを喫食したことによる食中毒が発生している。学校教職者の認識不足が懸念されることから、行政施策として啓発が必要であると考えられる。

### 文献

- 1) 農林水産省：食品中のソラニンやチャコニンに関する情報
- 2) 日本薬学会編：衛生試験法・注解 2010, 272(2010)
- 3) 下井俊子, 他：東京都健康安全研究センター年報, 65, 168-169 (2014)
- 4) 館雄一：食衛誌, 56, 66-67 (2015)
- 5) 登田美桜, 他：食衛誌, 53, 105-120 (2012)

## 平成 26 年度食品収去検査において違反が疑われた着色料について

安藤尚子・柚田有加・折口菜都希・岡山明子

Color Additive a Violation is Suspected in the 2014 Fiscal Year Food-sampling Inspection.

Naoko ANDO・Natsuki ORIGUCHI・Yuka SOMADA and Akiko OKAYAMA

### 緒言

平成 26 年度食品収去検査において輸入食品の着色料（タール色素）検査を実施した際に、違反が疑われた事例があった。食品表示には食用赤色 102 号しか記載されていないにもかかわらず、微量の食用赤色 2 号も検出したので、その原因について調査を行ったので報告する。

### 方法

#### 1. 試料

平成 26 年度に奈良県内で収去され、食用赤色 102 号の表示があり、かつ、食用赤色 2 号の表示のない、国産と違反が疑われた中国産のしょうが酢漬を用いた。

#### 2. 標準品及び試薬等

標準品は東京化成工業株式会社製の食品添加物 食用赤色 102 号及び食用赤色 2 号を用いた（製品検査合格証の表示あり）。

薄層板は Merck Millipore 社製の TLC シリカゲル 60 アルミシートと TLC セルロース アルミシートを 10 cm×10 cm にして用いた。

ポリアミドは和光純薬工業株式会社製のカラムクロマトグラフ用ポリアミド C-200 を用いた。

#### 3. 試料液の調製

厚生省課長通知の「第 2 版 食品中の食品添加物分析法」<sup>1)</sup> に準じて行った。

通常の 5 倍量となる試料 50 g を量り、アンモニア・エタノール溶液を加え、ポリトロンで粉碎した。この液を室温で放置及び水浴上で加温し、タール色素を抽出後、ポリアミドカラムで精製し、適宜濃縮、希釈を行い試料液とした。

#### 4. 測定条件

##### 1) 薄層クロマトグラフィー

乾固直前まで濃縮した試料液を用い、2 種類の薄層板で薄層クロマトグラフィーを行い、標準品の移動距離と比較するとともに、色調も観察し、試料中のタール色素を定性した。

##### (1) シリカゲル薄層板

酢酸エチル・メタノール・28%アンモニア水混液 (3 : 1 : 1) を展開溶媒とした。

##### (2) セルロース薄層板

アセトン・イソアミルアルコール・水混液 (6 : 5 : 5) を展開溶媒とした。

##### 2) 液体クロマトグラフィー

水で希釈し、0.45 μm メンブレンフィルターでろ過した試料液を用い、次に示す条件で液体クロマトグラフィーを行い、標準品の保持時間とスペクトルと比較し、試料中のタール色素を定性した。

HPLC : (株)島津製作所製 LC-10A シリーズ

カラム : Inertsil ODS-3V 5 μm 4.6×150 mm

カラム温度 : 40°C

移動相 : 0.01 mol/L 酢酸アンモニウム・アセトニトリル混液 (95 : 5) から (1 : 1) までの直線濃度勾配を 30 分間行い、(1 : 1) で 7 分間保持した後、(95 : 5) で 8 分間保持

流速 : 1 mL/分

測定波長 : 520 nm

注入量 : 10 μL

##### 5. 食用赤色 102 号中の食用赤色 2 号

##### 1) 試料と試料液の調製

食用赤色 102 号の標準品を 0.02 mol/L 酢酸アンモニウム溶液で 1000 ppm に希釈して試料液とした。

##### 2) 測定条件

第 8 版 食品添加物公定書解説書<sup>2)</sup> の食用赤色 102 号の付随色素を測定する方法を参考にして、次に示す条件で液体クロマトグラフィーを行い、得られたピーク面積と検量線から、食用赤色 102 号中の食用赤色 2 号の量を測定した。

HPLC : (株)島津製作所製 LC-10A シリーズ

カラム : Inertsil ODS-3V 5 μm 4.6×250 mm

カラム温度 : 30°C

移動相 : 0.02 mol/L 酢酸アンモニウム・アセトニトリル混液 (100 : 0) で 5 分間保持した後、(100 : 0) から (70 : 30) までの直線濃度勾配を 50 分間行い、(70 : 30) で 5 分間保持後、

(100 : 0) で10分間保持  
 流速 : 1 mL/分  
 測定波長 : 238 nm 及び 520 nm  
 注入量 : 20 µL

## 結果

### 1. 薄層クロマトグラフィー

#### 1) シリカゲル薄層板

表示のある食用赤色102号は、中国産と国産で明確なスポットを確認した。表示のない食用赤色2号は、中国産で小さなスポットを確認し、国産ではかすかなスポットの存在を認めた(図1.)。

#### 2) セルロース薄層板

表示のある食用赤色102号は、中国産と国産で明確なスポットを確認した。表示のない食用赤色2号も小さなスポットを確認した。

### 2. 液体クロマトグラフィー

表示のある食用赤色102号は、中国産で約390 ppm、国産で約170 ppmと多量に検出した。表示のない食用赤色2号は、中国産で約0.9 ppm、国産で約0.3 ppm検出した。食用赤色2号は、中国産と国産で食用赤色102号の量に対して約0.2%検出した(図2.)。

#### 3. 食用赤色102号中の食用赤色2号

1000 ppmの食用赤色102号から1.6 ppmの食用赤色2号を検出した。

#### 4. まとめ

食用赤色102号を含む中国産と国産のしょうが酢漬、及び食用赤色102号の標準品からは、食用赤色102号の量の約0.2%の食用赤色2号を検出した。

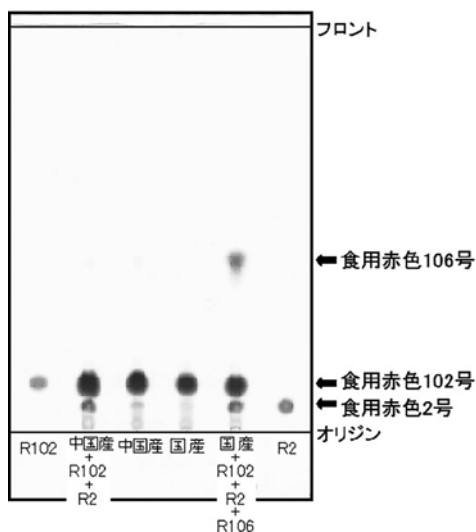


図1. しょうが酢漬のシリカゲル薄層板を用いた薄層クロマトグラム

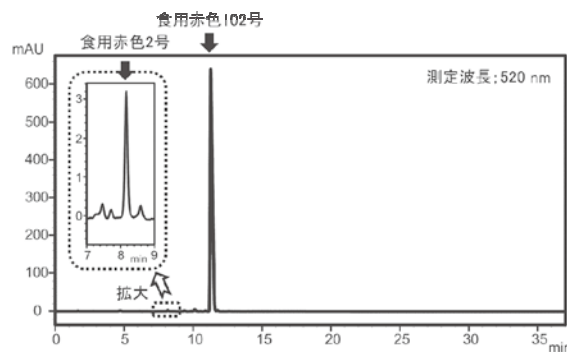


図2. 中国産しょうが酢漬の液体クロマトグラム

## 考察

表示があらかじめ検出した食用赤色102号に対する食用赤色2号の量を測定したところ中国産、国産ともに約0.2%であったことから、しょうが酢漬製造時のコンタミネーションの可能性は低いと考えられた。第8版食品添加物公定書解説書によると、食用赤色2号は食用赤色102号の製造原料の不純物から副成し、食用赤色102号の0.279%以下を含有することがあると記載されている。これらのことから、表示のない食用赤色2号を検出した原因は、食用赤色102号が製品検査に合格していたとしてもごく微量の食用赤色2号を含んでいたためと考える。

中国産のしょうが酢漬のみ表示違反が疑われた原因は、食用赤色102号の使用量が約390 ppmと多く、食用赤色102号に対して約0.2%含む食用赤色2号を薄層クロマトグラム上で視認し得たことである。国産しょうが酢漬の食用赤色102号にも食用赤色2号は約0.2%含まれていたが、通常の操作では検出しなかった。

「漬物の衛生規範」<sup>3)</sup>は平成24年10月に改正され、「合成着色料を使用するものにあつては、100 ppm以下にすることが望ましい。」の濃度規定が削除された。そのため今後は、漬物には多量のタール色素が使用されている可能性があることを考慮して検査を行う必要がある。

## 文献

- 1) 厚生省生活衛生局食品化学課長通知、衛化第15号、別添「第2版 食品中の食品添加物分析法」、113-131、平成12年3月30日
- 2) 第8版 食品添加物公定書解説書、D-857-866、(2007)、廣川書店
- 3) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長通知、食安監発1012第1号、別添「漬物の衛生規範」、平成24年10月12日

## 奈良県における腸管出血性大腸菌検出状況：2014年度

田邊純子・辻本真弓・田口和子・大前壽子

Prevalence of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* detected in Nara Prefecture, 2014

Sumiko TANABE・Mayumi TSUJIMOTO・Kazuko TAGUCHI and Hisako OHMAE

### 緒言

腸管出血性大腸菌 (enterohemorrhagic *Escherichia coli*: EHEC) 感染症は、感染症法で三類感染症に指定され、診断した医師の全数届出が義務付けられている。感染者から分離された菌株は、保健所等の協力で当センターに搬入され、性状、血清型及び毒素型等の確認後、厚生労働省通知に基づき国立感染症研究所(以下、感染研)へ送付する。感染研では全国からの菌株について DNA 型別解析を実施し、全国的状況を把握すると共に、結果を地方衛生研究所へ還元する。当センターではその結果を保健所等へ報告している。

本報では、2014年4月から2015年3月の間に奈良県で届出された EHEC 感染症と当センターへ搬入された EHEC 菌株について、患者情報や細菌検査の結果等をまとめたので報告する。

### 材料と方法

#### 1. 材料

2014年4月から2015年3月の間に奈良県で報告された EHEC 感染者は24例、内3例は当センターの接触者検便で菌を検出した。保健所等から搬入された21株と合わせて EHEC 菌株24株を対象として検査を実施した。患者情報は、保健所の調査結果に基づく。

#### 2. 血清型別及びベロ毒素 (VT) 型別

血清型別は、病原大腸菌免疫血清「生研」(デンカ生研)を使用した。VT 型別は、Cebula ら<sup>1)</sup>のプライマーで PCR を実施し、また Wang ら<sup>2)</sup>のプライマーによる PCR で変異型 VT2 遺伝子 (*stx2c*, *stx2d*, *stx2e* 及び *stx2f*) の保有状況を調査した。

#### 3. 薬剤感受性試験

アンピシリン (ABPC)、セフトキシム (CTX)、セフポドキシム (CPDX)、ゲンタマイシン (GM)、カナマイシン (KM)、ストレプトマイシン (SM)、テトラサイクリン (TC)、シプロフロキサシン (CPF), ナリジクス酸 (NA)、ST 合剤 (ST)、クロラムフェニコール (CP) 及びホスホマイシン (FOM) の12薬剤について、センシ・ディスク (日本 BD) を用いた感受性試験を CLSI 法に準拠して実施した。

### 4. 分子疫学解析

血清型 O157 の菌株は IS-printing system (東洋紡績, 以下 IS) 法による遺伝子型別を実施した。感染研に送付した菌株のうち O157, O26 及び O111 の菌株については反復配列多型解析 (MLVA) 法が実施され MLVA タイプが、他の血清型はパルスフィールド・ゲル電気泳動 (PFGE) 解析の結果が情報提供された。

### 結果

#### 1. 腸管出血性大腸菌の検出状況 (図1, 図2)

月別では7月が9株 (37.5%) と最多で、7~9月に16株 (66.7%) 検出しており、夏期に多かった。年齢層は20~29歳からが10株 (41.7%) と最も多く、70歳以上からの検出はなかった。性別では男性と女性が同数 (12人) であった。

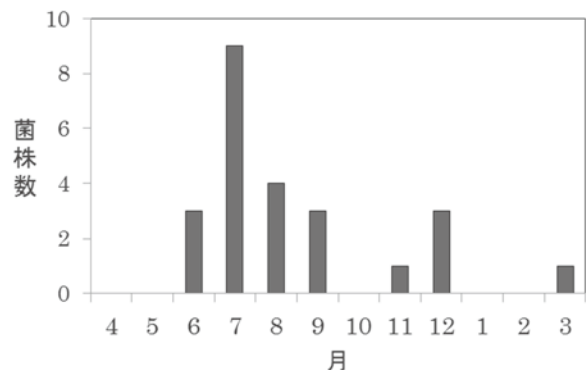


図1 月別検出状況

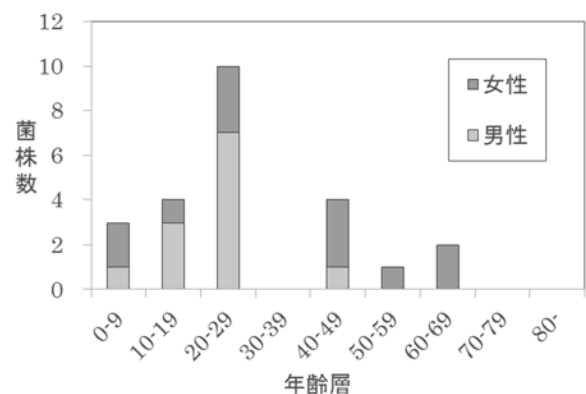


図2 年齢別・性別検出状況

## 2. 血清型・毒素型と臨床症状（表1）

O血清群はO157, O26, O121及びO165の4種類見られ、O157が19株（79.2%）と最も多かった。毒素型は、O157ではVT2がVT1&VT2より多く、O26はVT1のみ、O121とO165はVT2のみであった。

臨床症状は、O157感染者19例中16例が有症で、腹痛（14例）と下痢（13例）が多く、血便は10例で見られた。O121感染者2例は有症で血便も見られた。O26感染者は2例中1例が有症で、O165感染者1例は無症状病原体保有者であった。溶血性尿毒症候群（HUS）発症例はなかった。

変異型VT2遺伝子の調査では、6株から*stx2c*遺伝子を検出したが、他遺伝子の検出はなかった。

表1 血清型と毒素型

	VT1	VT2( <i>stx2c</i> )	VT1&VT2	合計
O157:H7	0	11(5)	7	18
O157:H-	0	1	0	1
O26:H11	1	0	0	1
O26:H-	1	0	0	1
O121:H19	0	2	0	2
O165:H25*	0	1(1)	0	1
合計	2	15(6)	7	24

(※O165のH型は感染研の結果による。)

## 3. 薬剤感受性試験（表2）

1剤以上に耐性を示した菌株は4株あった。最大で4薬剤耐性の菌株がO157とO26で各1株見られた。O121とO165の菌株は全て12薬剤に感受性を示した。

表2 薬剤感受性試験

O血清群	耐性	耐性薬剤名	菌株数
O157	4剤	ABPC, SM, TC, ST	1
	3剤	ABPC, SM, TC	1
	1剤	NA	1
	なし	—	16
O26	4剤	ABPC, SM, TC, ST	1
	なし	—	1
O121	なし	—	2
O165	なし	—	1

## 4. 分子疫学解析

O157菌株19株についてIS法を実施した結果、IS型は12種類に分けられた。2株以上で一致した型は4種類あり、4株一致が1種類、3株一致が1種類、2株一致は2種類であった。

IS型が一致した4株（近畿ISコード21695984463）の感染研MLVAタイプは2種類あり、3株が同じタイプだった。内2株の患者は家族で、もう1株の患者は聞き取り調査から同じ飲食店の利用が判明したが利用

日が離れていた。このIS型は、近畿では過去3年間毎年数月にわたり分離される型であった<sup>3)</sup>。

2株のIS型が一致した1事例では、患者は家族で接触者検便により1株を検出した。他県飲食店が原因と疑われて2株を分与し、同県の分離株とMLVA法による型が一致したこと等から食中毒と断定された。

他のIS型一致株は、それぞれ家族であったり分離日が離れているなど、IS型の一致から関連性が疑われる事例はなかった。

O121の2株は、感染研のPFGE解析からそれぞれ他県との型別一致が報告され、自治体間や感染研への情報提供が行われたが感染源の特定まで至らなかった。

## 考察

全国における2014年1月から12月までのEHEC感染症報告数は、全国で4,153例であった<sup>4)</sup>。2011年以降の規制により、牛の生肉・生レバーの喫食が原因と推定されるO157感染事例の報告数は減少しているが、全体のEHEC感染者数は減少していない<sup>3)</sup>。奈良県の報告数は昨年度の30例より減少したが、聞き取り調査から17例（全てO157）で焼肉等の喫食歴が見受けられた。引き続き、生肉や加熱不十分な食肉等を食べないように注意喚起が必要である。

2014年度は、全国では検出されていても奈良県では5年以上検出されていないO121とO165の菌株が搬入された。接触者の行政検査等によりしっかり対応できるよう、検査の情報収集や技術の継承に努めたい。

今後も、EHEC感染症事例の分子疫学解析とデータの蓄積を行い、科学的側面から県内感染症の予防と拡大防止に寄与していきたいと考えている。

## 謝辞

菌株収集にご協力を頂いた関係機関の方々に、またDNA型別解析結果を還元して頂いた国立感染症研究所の皆様、深く御礼申し上げます。

## 文献

- 1) Cebula TA, Payne WL, Feng P, *et al.* : *J. Clin. Microbiol.*, 33, 248-250 (1995)
- 2) Wang G, Clark CG, Rodgers FG, *et al.* : *J. Clin. Microbiol.*, 40, 3613-3619 (2002)
- 3) 泉谷秀昌：病原体解析手法の高度化による効率的な食品由来感染症探知システムの構築に関する研究平成24～26年度総合研究報告書、266-276 (2015)
- 4) 国立感染症研究所 厚生労働省健康局結核感染症課：病原微生物検出情報、36(5), 73-76 (2015)

## 散发性下痢症患者から分離された大腸菌における 病原因子関連遺伝子の保有状況調査

田邊純子・辻本真弓・橋田みさを・田口和子・大前壽子

Survey for pathogenic factor-related genes of *Escherichia coli* isolated  
from patients with sporadic diarrhea in Nara

Sumiko TANABE・Mayumi TSUJIMOTO・Misao HASHIDA・Kazuko TAGUCHI  
and Hisako OHMAE

### 緒言

ヒトの腸内に常在する大腸菌は、その一部に下痢を引き起こすものがあり下痢原性大腸菌と総称される。下痢原性大腸菌は、発症機序により腸管出血性大腸菌 (EHEC)、腸管毒素原性大腸菌 (ETEC)、腸管侵入性大腸菌 (EIEC)、腸管病原性大腸菌 (EPEC)、腸管凝集付着性大腸菌 (EAggEC) 及び他の下痢原性大腸菌に分類されている<sup>1)</sup>。これらと非病原性大腸菌との鑑別には病原因子の検査が必要とされており、当センターでは食中毒疑い事例の検査等において大腸菌を検出した場合に、病原因子関連遺伝子の保有の有無について PCR 法を実施して確認し、病原性の鑑別に利用している。

一方で臨床現場において大腸菌が分離された場合には、主に O 血清群の型別が病原性の鑑別に利用されており、病原因子の確認は EHEC のベロ毒素 (VT) について検査が実施されている。

我々は、医療機関で散发性下痢症の患者から分離された大腸菌において、下痢原性大腸菌の指標となる病原因子の遺伝子について保有状況を調査するため PCR 法を実施し、結果をまとめたので報告する。

### 材料と方法

#### 1. 材料

2011年4月から2015年2月までの間に、医療機関において散发性下痢症の患者から分離され、検査により VT 保有が確認されなかった大腸菌 171 株を試験に供した。

#### 2. 検査方法

供試菌株は DHL 寒天培地で培養確認し、大腸菌様コロニーを釣菌して滅菌蒸留水に懸濁させ 100℃で 10 分加熱後に遠心分離した上清を試料溶液として PCR 法を実施した。検索対象とした病原因子関連遺伝子は 8 種類 (ST, LT, VT, *invE*, *eae*, *bfpA*, *aggR*,

*astA*) で、使用プライマーは文献<sup>2~4)</sup>を参照した。いずれかの遺伝子を検出した菌株は、病原大腸菌免疫血清 (デンカ生研) を使用して血清型を確認した。

### 結果

大腸菌 171 株の O 血清群は医療機関からの情報によると 23 種類見られたが、型別不能 (OUT) の菌株が最も多かった (表 1)。

表 1 O 血清群

O 血清群	菌株数
O1	40
O18	38
O25	9
O6, O153	4
O8, O44, O63, O111, O126, O127a, O166	2
O26, O27, O74, O78, O115, O119	1
O124, O128, O148, O159, O164	1
OUT	51

PCR 法の結果、171 株中 10 株 (5.8%) から 3 種類の病原因子関連遺伝子を検出した (表 2)。検出した遺伝子は *eae* 遺伝子が 2 株 (1.2%)、*aggR* 遺伝子が 5 株 (2.9%) 及び *astA* 遺伝子が 5 株 (2.9%) であり、

表 2 病原因子関連遺伝子の検出数

分類	指標遺伝子	検出数
腸管出血性大腸菌	VT	0
腸管毒素原性大腸菌	LT	0
	ST	0
腸管侵入性大腸菌	<i>invE</i>	0
腸管病原性大腸菌	<i>eae</i>	2
	<i>bfpA</i>	0
腸管凝集付着性大腸菌	<i>aggR</i>	5
他の下痢原性大腸菌	<i>astA</i>	5



このうちの2株は *aggR* と *astA* を両方保有する株であった。他の5種類の遺伝子 (ST, LT, VT, *invE*, *bfpA*) は検出されなかった。

これら10株のO血清群は8種類に分かれ、H型を確認したところ血清型は9種類に型別された (表3)。下痢症患者からの分離数が多かった O1 や O25, OUT から検索対象遺伝子の検出はなく、O18 の1株から *astA* 遺伝子を検出したのみであった。一方で分離数1~2株のO血清群において、遺伝子を検出した菌株が多く見られた。

表3 遺伝子検出株の血清型

分類	検出遺伝子	血清型	検出数
腸管病原性大腸菌	<i>eae</i>	O63:H6	1
		O159:H45	1
腸管凝集付着性大腸菌	<i>aggR</i>	O111:HNM	1
		O127a:H21	2
	<i>aggR, astA</i>	O78:HNM	1
		O126:HNM	1
他の下痢原性大腸菌	<i>astA</i>	O8:H19	1
		O18:HNM	1
		O63:HNM	1

### 考察

大腸菌の病原性鑑別手法として昔から実施されてきた血清型による確認では、O1やO18であればEPECとして認識されてきたが、その病原因子である *eae* 遺伝子保有株はほとんどないと近年報告されている<sup>1)</sup>。今回の調査でもO1とO18の菌株数は多かったものの、病原因子関連遺伝子はO18の1株から *astA* 遺伝子を検出したのみでEPECではなかった。

本調査で病原因子関連遺伝子の保有を確認した大腸菌株について下痢原性大腸菌の分類に照らし合わせてみると、EPECが2株 (*eae* 遺伝子保有; O63:H6, O159:H45), EAggECが5株 (*aggR* 遺伝子保有; O111:HNM, O127a:H21, 及び *aggR* 遺伝子と *astA* 遺伝子保有; O78:HNM, O126:HNM), 他の下痢原性大腸菌が3株 (*astA* 遺伝子保有; O8:H19, O18:HNM, O63:HNM) と考えられた (表3)。これら10株の血清型は様々で、EHECのような特徴は認められなかった。

従来から病原性が明確に定義されているEHECやETEC, EIECに対して、EPECとEAggEC及び *astA* 遺伝子単独保有大腸菌の病原性は解明されていない面があり、当センターでは健康者検便から *aggR* 遺伝子や *astA* 遺伝子保有大腸菌を検出する経験が少なから

ずある。今回遺伝子を検出した10株のうち8株は小児患者由来であった (EPECが1株, EAggECが5株, *astA* 遺伝子保有株が2株)。EAggECのO血清群 (O78, O111, O126, O127a) は *aggR* 遺伝子保有株として報告数が多く<sup>1)</sup>、下痢症患者からEPECやEAggECが検出された場合は原因と考えるべき症例が多いとの考え方もあり<sup>5)</sup>、患者情報には注意が必要である。

今回の調査ではOUTの菌株から病原因子関連遺伝子の検出はなかった。しかし検出報告例は少なくないので、食中毒疑い事例等における大腸菌の検査では今後もまずPCR法により病原因子関連遺伝子を検索することが重要と考えている。

大腸菌の病原性の鑑別には病原因子の検査が必要であるものの、医療機関等PCR法の実施が難しい場合、EHECのような主要O血清群の情報は有用と思われる。下痢原性大腸菌の保有病原因子とその血清型について今後も情報を集めていきたいと考えている。

### 謝辞

本調査にあたり、ご協力を頂きました県内医療機関検査担当者の皆様に深謝いたします。

### 文献

- 1) 国立感染症研究所: 病原微生物検出情報 (IASR), 33, 1-7 (2011)
- 2) 伊藤文明, 荻野武雄, 伊藤健一郎, 他: 日本臨床, 50, 343-347 (1992)
- 3) H.Karch, T.Meyer: J.Clin.Microbiol., 27, 2751-2757 (1989)
- 4) 小林一寛, 勢戸和子, 八柳潤, 他: 感染症誌, 76, 911-920 (2002)
- 5) 菊田英明, 涌嶋三津子, 西川禎一: 小児感染免疫, 25, 413-419 (2013)

## 食中毒事例におけるノロウイルスの検出状況およびその遺伝子解析

杉本大地・川辺千明・米田正樹・稲田真知・中野守・北堀吉映

The Detected Situation and the Genetic Analysis of the Norovirus in Food Poisoning Examples

Daichi SUGIMOTO・Chiaki KAWABE・Masaki YONEDA・Machi INADA・Mamoru NAKANO  
and Yoshiteru KITAHORI

### 緒言

ノロウイルス(Norovirus, 以下 NoV)は, G I ~ G V の遺伝子型に分けられ, G I と G II が主にヒトに感染する. 少なくとも G I には 9, G II には 22 の遺伝子型が存在し, ウイルスの多様性が知られている. NoV は糞便および吐物中に大量に排出され, 症状消失後も約 10 ~ 21 日間糞便中への排出が続き, 1 ヶ月以上排出が続く事例も報告されている<sup>1)</sup>.

当センターでは, 食中毒(疑い)事例の原因究明のため, 保健所から行政検査依頼を受け, NoV の検査を行っている. ただ, 食中毒(疑い)事例の検査はそのほとんどにおいて, 検査結果が行政処分の根拠とされ, また被害拡大防止の観点から, 迅速性が求められる. 今回, 平成 26 年度に発生した食中毒事例で当時に実施した検査の検証として, 詳細な遺伝子検査を行い, 検出状況と遺伝子解析結果について興味ある結果を得たので報告する.

### 材料と方法

#### 1. 材料

平成 26 年度には, 奈良県(奈良市を除く)内の施設を原因とする食中毒事例が 9 事例発生した. そのうち, 7 事例では, 有症者及び調理従事者の便から NoV を検出し, NoV が病因物質として特定された. そのうち, 複数の従事者から検出した事例及び関連施設が複数にまたがっているとみられた事例の 2 事例の有症者及び調理従事者の便を材料とした.

#### 2. 検査方法

便の 10% 乳剤から「ノロウイルスの検出法」<sup>2)</sup> に準じてウイルス RNA を抽出し, リアルタイム PCR 法により定量的検出を実施した. さらに NoV 遺伝子を検出した検体は RT-PCR 法を実施し, 得られた遺伝子増幅産物について, ダイレクトシーケンスを実施し, 塩基配列を BLAST および NoroNet を用いて相同性, 遺伝子型を判定した. また MEGA6 を用いてアライメントを行い, 系統樹作成を行った.

### 事例の概要

検査時点で把握していた概要を以下に示す.

#### 事例 1

X 月 2 日の昼食の喫食者 70 名のうち 34 名が 2 日午後 10 時を初発として発症. 従事者は 9 名で, うち 1 名(従事者 A) が 1 日夜から嘔気・下痢などの胃腸炎症状を呈していた. この従事者 A が, 賄い料理を調理していたとの情報もあった. 当センターには, 従事者 9 名, 有症者 3 名の便検体が搬入された.

#### 事例 2

Y 月 25 日に飲食店 B で提供された食事の喫食者 48 名のうち 25 名が Y 月 26 日午前 0 時を初発として発症. 関連施設 C と調理従事者が行き来することがあるらしく, 関連施設 C でも有症者が発生. 当センターには飲食店 B の従事者(調理及びその他) 13 名とそこで喫食した有症者 1 名及び関連施設 C で 19, 20 日に喫食した有症者 2 名の便検体が搬入された.

### 結果

#### 事例 1

従事者 9 名中 7 名と有症者 3 名中 3 名から NoVG II を検出した(表 1).

表 1 事例 1 の NoVG II 検出情報

	発症日等	採取日	便性状	便中 NoV copy/g
従事者 A	1 日夜	5 日朝	褐色軟便	1.18×10 <sup>10</sup>
従事者 B	3 日夜	5 日夜	茶色泥状便	1.02×10 <sup>7</sup>
従事者 C	不明	5 日夜	茶色泥状便	3.43×10 <sup>7</sup>
従事者 D	無症	5 日夕	黒褐色正常便	4.18×10 <sup>5</sup>
従事者 E	4 日夜	6 日昼	茶色正常便	5.35×10 <sup>8</sup>
従事者 F	4 日夜	6 日昼	茶色正常便	1.28×10 <sup>10</sup>
従事者 G	4 日	6 日夕	茶色正常便	陽性
有症者 H	不明	6 日夜	黄土色軟便	1.27×10 <sup>8</sup>
有症者 I	不明	7 日昼	茶色軟便	陽性
有症者 J	不明	7 日夕	茶色軟便	陽性

なお、従事者G、有症者I・Jについては RT-PCR 法を用いて判定を行ったため、定量は行っていない。

従事者A・D・E及び有症者H・Iについて、ダイレクトシーケンスを実施し解析できた299bpにおいて、5検体間の塩基配列は、100%一致した。また、参照株を用いた分子系統樹解析では、2012/2013 シーズンに流行した Sydney 2012 株(G II/4)と同じクラスターに分類された。

## 事例2

従事者13名中1名と有症者3名中3名から NoVG IIを検出した(表2)。

表2 事例2のNoVG II検出情報

	発症日等	採取日	便性状	便中 NoV Copy/g
従事者K (飲食店B)	不明	31日	焦茶色 硬便	1.02×10 <sup>9</sup>
有症者L (飲食店B)	不明	31日	焦茶色 硬便	1.01×10 <sup>9</sup>
有症者M (関連施設C)	21日	30日夜	茶色軟 便	3.81×10 <sup>7</sup>
有症者N (関連施設C)	21日	30日夜	薄茶色 硬便	3.21×10 <sup>10</sup>

従事者K及び有症者L・M・Nについて、ダイレクトシーケンスによる遺伝子解析の結果、解析できた282bpにおいて、4検体の塩基配列は、100%一致した。

NoroNetによる型識別では、遺伝子型はG II/11と判明した。

## 考察とまとめ

事例1では、賤い料理を調理していたとされる従事者Aから多量のNoVを検出した。この従事者の発症日は1日夜と記載されており、発症5日目(採取日5日)でも多量のウイルスの排出が続いている。また、その他の有症の従事者の発症日は、有症者と同様に喫食日とされる2日以降であることから、感染源ではないとも考えられる。なお、従事者Dは無症との事であったが、ウイルス排出が見られた。以上のことより、感染時期は不明であるが、同一のウイルスに感染していると考えられる。本事例は、調理従事者の健康管理の重要性、さらに不顕性感染者についての対策など、考えさせられる事例であった。

事例2は、飲食店Bでは、県外の利用者からも同様にNoVが検出されたことから、食中毒と断定された。飲食店Bと調理従事者が行き来するとされる関連施設Cでは、食中毒とは断定されなかった。

検出したNoVが、G II/11という国内での報告が少ない遺伝子型であり、遺伝子配列も100%一致していることから、事例2についても、感染時期・経路は不明であるが、

同一のウイルスに感染していると考えられる。関連施設Cでは、食中毒とは断定されなかった事例であり、NoVの感染経路の多様性を示すものであった。なお、当センターで奈良県において2005年から実施するNoVに関する調査では、NoVG II/11を検出したのは279例中2例(0.7%)と非常に希少である。また同様に、諸外国でも少ないためか、免疫グロブリンを用いる食品中のNoVの検査(パンソルビン・トラップ法)でもNoVG II/11に対する有効性は明らかになっていない<sup>3)</sup>。このことから、食中毒事例で食品中のNoVを検査する際には、パンソルビンで捕捉できないウイルスであるかもしれないことを念頭に置いて検査を実施する必要があると考えられる。

今回、NoVを原因とする2事例について、詳細な遺伝子解析を実施した。事例発生当時、慌ただしい中で実施した行政検査を検証するためであり、結果として報告事項に相違は無かったと確認を得た。

さらに、検出したNoVについて詳細な調査をする事で食中毒事例のあらゆるケースを学ぶと共に、希少なNoVG II/11の動向を捉えることで食品中のNoV検査の今後の課題が明白となった。また調査内容について積極的に保健所へ情報提供することができた。今後も食中毒と断定された事例については今回のような検証を継続して取り組んでいきたいと考えている。

## 文献

- 1)林 志直, 他:IASR 31, 319-320 (2010)
- 2)厚生労働省医薬食品安全部監視安全課長通知食安監発第1105001号「ノロウイルスの検出法について」,(最終改正平成25年10月22日付け食安監発1022第1号)
- 3)斉藤博之:食品のノロウイルス検査の汎用化を目指したパンソルビン・トラップ法の開発, 日本食品微生物学会雑誌, 29, 32-37 (2012)

## 奈良県におけるヒトパレコウイルスの検出状況

稲田眞知・杉本大地・川辺千明・米田正樹・中野守・北堀吉映

Detection of Human Parechovirus in Nara Prefecture

Machi INADA・Daichi SUGIMOTO・Chiaki KAWABE・Masaki YONEDA・Mamoru NAKANO  
and Yoshiteru KITAHORI

### 緒言

ヒトパレコウイルス(Human parechovirus : HPeV)は、主に小児の胃腸炎や呼吸器疾患患者から検出されるウイルスで、ピコルナウイルス科パレコウイルス属に分類される。以前は同科エンテロウイルス属のエコーウイルス 22 型・23 型とされていたが、ウイルス学的特徴から 1999 年にパレコウイルス属として独立し、それぞれ HPeV1 型・2 型と命名された。その後、2004 年に 3 型が愛知県から、2007 年には 6 型が新潟県から新たな遺伝子型として報告されるなど、今では 16 種類の遺伝子型に分類されている。我が国では、1 型と 3 型の感染例が多く報告されているが、3 型は一過性下肢麻痺の 1 歳児から、6 型は Reye 症候群で死亡した 1 歳児から初めて検出されており、軽視できないウイルスである。

本県ではこれまで、HPeV の検査は実施していなかったが、平成 26 年の夏には他府県から HPeV、特に 3 型の検出が増加しているとの報告が相次ぎ<sup>1-3)</sup>、検査を開始することとした。本県での HPeV 検出状況と患者情報を報告する。

### 対象及び方法

平成 25 年度から平成 26 年度に奈良県感染症発生动向調査事業により病原体定点等から提供された検体のうち、これまで実施してきた検査では、陰性と判定した検体(平成 25 年度 235 例 271 検体(咽頭 186, 便 61, 髄液 12, 血液 6, 尿 6), 平成 26 年度 140 例 157 検体(咽頭 98, 便 46, 髄液 10, 血液 3))を対象とした。ウイルス RNA の抽出は、QIAamp Viral RNA Mini Kit(QIAGEN)で添付のプロトコールにより実施した。続いて、VP3/VP1 領域を標的とした Nested RT-PCR 法<sup>4)</sup>を実施し、遺伝子増幅産物についてダイレクトシーケンスを行い、得られた塩基配列をもとに BLAST 解析によりウイルス遺伝子型を判定した。

### 結果

供試した 375 例中 26 例から HPeV を検出した(表)。平成 25 年度は 6 例(6/235 :2.6%)、平成 26 年度は 20 例(20/140 :14.3%)から検出した。複数種の検体が提供された事例では、その全てから検出した。検出した 26 例の遺伝子型は、1 型 8 例、3 型 17 例及び 6 型 1 例であった。1 型は両年度から検出しており、3 型は平成 26 年度のみ、6 型は平成 25 年度のみで検出であった。

検出時期は 4 月から 11 月で、ほぼ 5 歳以下から検出しており、検出数及び検出率ともに 1 歳が最も高かった(陽性 11 例陰性 36 例)。性差は、男:女=15:11 と男が多いように見えるが、供試したのが男:女:不明=200:159:16 と、男が多いことに起因しているとも考えられることから、男女差については評価できない。また、ウイルスの亜型・発病日について、地域的偏りはみられなかった。

診断名は、1 型を検出した 8 例は、感染性胃腸炎や上下気道炎、発疹症となっている。平成 26 年度に多く検出した 3 型の診断名は、1 型と同様の診断名に加えて、手足口病、ヘルパンギーナというエンテロウイルス感染による疾患名が多かった。また、症状として発疹、特に全身の紅斑(疹)の記載が多かった。

なお、今回 3 型を検出した中に通常のサーベイランスでは見られない診断名;流行性筋痛症、新生児無呼吸症候群があった。3 型はその重症性から近年注目されるウイルスであり、これらは本県で初めて把握した 3 型による重症例と思われるため、以下に概要を記載する。

#### 1. 流行性筋痛症の事例

表中 No.14 と No.17 は採取日が異なるが同じ男児で、また No.18 はその父親である。発症翌日に採取された No.14 と 9 日後に採取された No.17 とともに HPeV3 型を検出した。男児の 8 日後に父親が発症している。親子とも筋肉痛を発症しており、ともに CK 値が高値であった。児は肝炎も併発しており、全身に広がる紅斑が特記されているが、父親には記載が無い。なお、親子の遺伝子配列は解析範囲で一致した。

表 ヒトパレコウイルスの検出状況

No.	発病	検出ウイルス	性別	採取時年齢	検体種別	臨床診断名	症状	採取地域
1	H25.4	HPeV-6	男	1歳11ヶ月	咽頭	インフルエンザ様疾患	発熱(6日), 咳, 鼻汁, 気管支炎	北部
2	H25.7	HPeV-1	女	0歳7ヶ月	便	アデノウイルス性腸炎	胃腸炎	中部
3	H25.7	HPeV-1	女	0歳7ヶ月	便	胃腸炎	胃腸炎(下痢 5回/日, 黒～赤色)	中部
4	H25.8	HPeV-1	女	1歳11ヶ月	咽頭	喘息性気管支炎	気管支炎	中部
5	H25.10	HPeV-1	男	0歳10ヶ月	咽頭	気管支炎	下気道炎	中部
6	H25.11	HPeV-1	男	2歳7ヶ月	便	感染性胃腸炎	胃腸炎(嘔吐・下痢・泥状)	中部
7	H26.4	HPeV-3	女	1歳11ヶ月	咽頭	気管支炎	発熱(3日), 上気道炎, 気管支炎	中部
8	H26.5	HPeV-3	男	不明	咽頭	手足口病	発熱・発疹(臀部・手掌)	北部
9	H26.5	HPeV-3	男	1歳11ヶ月	咽頭・便	ヘルパンギーナ	発熱・口内炎	南部
10	H26.5	HPeV-3	女	1歳2ヶ月	咽頭	発疹症	上気道炎, 全身(四肢優位)に小発疹	中部
11	H26.6	HPeV-3	男	2歳2ヶ月	咽頭	手足口病	発熱・発疹(紅疹)	中部
12	H26.6	HPeV-3	男	2歳11ヶ月	咽頭	発疹症	発疹(紅疹)	中部
13	H26.6	HPeV-3	女	1歳4ヶ月	咽頭	手足口病	発熱・発疹	北部
14	H26.6	HPeV-3	男	5歳7ヶ月	咽頭	記載無し	発疹(全身に紅疹拡大している)	北部
15	H26.6	HPeV-3	女	4歳10ヶ月	咽頭	発疹症	咽頭炎, 発疹(紅疹・手足中心)	中部
16	H26.6	HPeV-3	女	4歳8ヶ月	咽頭	発疹	発熱(1日)	北部
17	H26.6	HPeV-3	男	5歳8ヶ月	便	手足口病, ウイルス肝炎	発疹(四肢, 体幹, 頬部に紅斑, 手掌, 足底に小発疹), 筋肉痛, 肝炎, 流行性筋痛症	北部
18	H26.7	HPeV-3	男	35歳7ヶ月	咽頭	流行性筋痛症	関節痛・筋肉痛, 高CK血症, 肝機能障害, 発疹	北部
19	H26.7	HPeV-3	女	3歳3ヶ月	咽頭	ヘルパンギーナ?, 手足口病?	口内炎, 発疹(丘疹)	中部
20	H26.7	HPeV-3	女	1歳10ヶ月	咽頭	ヘルパンギーナ	口内炎	北部
21	H26.8	HPeV-3	男	1歳1ヶ月	便	インフルエンザ様疾患	発熱3日, 上気道炎, 結膜炎	北部
22	H26.7	HPeV-3	女	1歳5ヶ月	便	感染性胃腸炎	下痢(水様性・泥状)	南部
23		HPeV-1	男	1歳4ヶ月	咽頭	記載無し	発熱	北部
24	H26.9	HPeV-3	男	0歳0ヶ月	咽頭・便・髄液・血清	新生児無呼吸症候群	発熱, 無呼吸発作	中部
25	H26.9	HPeV-1	男	1歳5ヶ月	便	感染性胃腸炎	下痢(泥状)	南部
26	H26.9	HPeV-1	男	1歳0ヶ月	咽頭	発疹症	上気道炎, 発疹(丘疹, 紅疹)咽頭発赤と不定形発疹・発疹は蕁麻疹様	中部

## 2. 新生児無呼吸発作の事例

表中 No.24 の男児。生後 24 日で発症。一部に発疹有り, 肺炎・麻痺・下痢は無く, CRP(-)。搬入された検体(咽頭ぬぐい液, 便, 髄液, 血清)全てから HPeV3 型を検出し, また塩基配列は全ての検体で一致した。BLAST で解析すると, 類似株とされるものが 2008 年に山形県から流行性筋痛症の原因として報告されている HPeV3 型であった。その後, 患児は軽快しているとのことである。

### まとめ及び考察

本県では, これまで HPeV の検査を実施しておらず, 過去からの流行状況は不明であるが, 今回検査した 2 年間で考察すると, 1 型は両年とも検出しており, これは, 全国的にも毎年検出報告があることから, 毎年県内でも発生していると推測できる。3 型及び 6 型はどちらかの年度のみ検出で, 特に平成 26 年度のみ検出している 3 型は, 大阪府でエンテロウイルス感染症疑い患者からの検出増加が報告<sup>3)</sup>されており, 本県でも同様にエンテロウイルス感染症(手足口病, ヘルパンギーナ, 発疹症等)と診断されていた事例が多かった。また, 全国的に HPeV3 型が多く検出されており, 本県も同様の結果であった。

HPeV は, 特に 3 型の重症度から, 近年注目されるウイルスであるが, 臨床症状だけでは他のウイルス性疾患

との鑑別が困難で, またその認知度は十分ではない。特に 0 歳児では敗血症や中枢神経系症状など重症例の報告もあることから, 今後の検出情報などに注視し, 積極的な情報提供により症例集約・検査の実施など検討していきたい。

なお, HPeV3 型はおおよそ 3 年周期で流行しており<sup>6)</sup>, 2017 年前後の発生動向については, 特に注視する必要があると考えている。

### 謝辞

検体の提供にご協力いただいた奈良県感染症発生動向調査病原体定点の先生方に, また, 陽性コントロールを分与いただくなどご指導いただいた, 愛知県衛生研究所伊藤雅先生に深謝いたします。

### 文献

- 1) 相澤悠太, 他:IASR, 35, 220,(2014)
- 2) 宮田一平, 他:IASR, 35, 221,(2014)
- 3) 中田恵子, 他:IASR, 35, 221-222,(2014)
- 4) Harvala H, et al.:*J Clin Microbiol*, 46,3446-3453(2008)
- 5) Mizuta K, et al.:*Emerg.Infect.Dis.*,18,1787-1793(2012)
- 6) パレコウイルス検出状況, 2005~2015 年, IASR

## RS ウイルスの検出状況：2013-2014

北堀吉映・川辺千明・米田正樹・杉本大地・稲田眞知・中野守

An Epidemic of RS virus in 2013-2014

Yoshiteru KITAHORI・Chiaki KAWABE・Masaki YONEDA・Dichi SUGIMOTO・

Machi INADA and Mamoru NAKANO

### 緒言

RS ウイルス感染症は乳幼児の代表的な呼吸器感染症で、原因となるウイルスは血清型で A 型と B 型に大別され、さらにサブグループに区別される。わが国で検出される A 型の多くは NA1 で、B 型は BA 型である。2011 年、Eshaghi A<sup>1)</sup>らは、カナダのオンタリオ州で 2010 年から 2011 年の間に収集したサーベイランス検体から、G 蛋白領域の C 末端第 2 可変領域に 72 塩基の反復配列が挿入された変異株が発見され ON1 と命名した。その後、ON1 類似株は韓国、中国、南アフリカ<sup>2)</sup>などから相次いで検出されている。わが国でも 2012 年頃から横浜市、千葉市、沖縄県などで確認された。本県においても、2013 年 9 月に感染症発生動向調査として医療機関から提出された喘息性気管支炎患者から ON1 類似株を検出し報告<sup>3)</sup>したところである。

本報では、ON1 類似株のその後の流行状況が如何なるものかについて調査を実施したので報告する。

### 材料と方法

#### 1. 調査対象

奈良県感染症発生動向調査事業要綱に基づき、2013 年 1 月から 2014 年 12 月の間に小児科病原体定点医療機関から提供された呼吸器疾患と診断された患者咽頭ぬぐい液のうち、インフルエンザウイルスを検出した症例を除く 223 例（2013 年：145 例、2014 年：78 例）を調査対象とした。患者情報は検査票（年齢、発病日、臨床症状）の記載によって疫学資料とした。

#### 2. ウイルス型種解析

咽頭ぬぐい液から QIAamp Viral RNA Mini kit (Qiagen 社)を用い添付のプロトコールに従って RNA を抽出した。検出プライマーは Parveen<sup>4)</sup>らの報告に従い ABG490 および F164 を用いた。さらに A 型については、AG655 および F164、B 型については BG517 および F164 を用い Semi-nested PCR を

実施した。その後、アガロースゲル電気泳動で遺伝子産物の確認と回収を行い、塩基配列判読を実施した。遺伝子配列は BLAST 解析で型を確定した。

### 結果

#### 1. 年別および月別検出状況と患者情報

RS ウイルスの検出頻度は、2013 年は 32.4% (47/145)、2014 年は 17.9% (14/78) であった。月別の患者発生を観察すると、2013 年は 9 月から 12 月の間で全体の 85%を占め、最多は 9 月が 13 例、10 月が 12 例の検出であった。2014 年も同様に 9 月から 12 月の間で比較すると、全体の 79%を占め最多は 11 月で 6 例の検出があった。インフルエンザ流行と重なる 1 月から 3 月の間の検出は 2013 年で 10.6%、2014 年は 14.3%で、主な流行季はインフルエンザシーズンに先行するものであった。

患者年齢は 0 歳から 2 歳児とそれ以上で比較すると、0 歳から 2 歳児は 78.3% (47/60)、3 歳児以上は 21.6% (13/60) であった(図)。なお、母集団が検出数と異なる理由は、2013 年 10 月の患者年齢が不明なためである。RS ウイルスを検出した患者の主な症状は、気管支炎、細気管支炎、インフルエンザ様症状で、わずかであったが肺炎と診断を受けた患者もあった。また、発熱はほぼ 100%で、中には 40℃を超える記載が 6 例 (9.8%) 含まれており、最高値は 38.6 から 39.0℃であった。

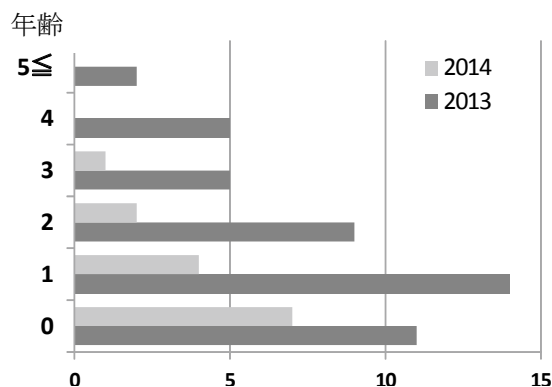


図 RS ウイルス検出患者の年齢分布

## 2. ウイルス解析

A型およびB型のサブグループ分類は表1に示した。2013年はA型13株(27.6%)、B型34株(72.3%)、2014年はA型10株(71.4%)、B型4株(28.6%)であった。A型に分類されるON1とNA1の検出は、2013年が各々7株(53.8%)と6株(46.2%)、2014年は9株(90.0%)と1株(10.0%)であった。なお、B型はすべてBAに分類された。

表 RSウイルスのサブグループ解析

Season	No. of positive samples			
	Total	Group A		Group B. BA
		ON1	NA1	
2013	47 (32.4%)	7	6	34
2014	14 (17.9%)	9	1	4

## 考 察

RSウイルス感染症は、RSウイルスを病原体とする乳幼児に多い急性の呼吸器感染症である。インフルエンザと同様に、飛沫および接触感染により伝播する。主な症状は下気道炎や細気管支炎で、乳幼児の肺炎の50%程がRSウイルス感染症と言われており、乳幼児の感染症としては重要な疾患である。発生動向については、2003年の感染症法の改正により対象疾患に加わり、全国の定点医療機関から適時患者報告数が寄せられ本疾患の流行状況や患者情報が徐々に明らかとなってきた。これまでの取り組みの成果は、国立感染症研究所感染症疫学センターのIDWRに掲載されており、要約すると、①2011年以降、7月頃から報告数が増加するようになった。②患者は1歳以下で全体の約70%以上で、3歳児以下で全報告数の90%以上である。

今回調査した、2013年と2014年の月別の患者発生を見ると、2013年は9月から12月の間で全体の85%を占めた。2014年も同様に9月から12月の間で全体の79%を占めており、本疾患の流行季はインフルエンザシーズンに先行する様相であることが判明した。また、患者年齢は0歳から2歳児での全体の78.3%を占め、3歳児以上が21.6%で低年齢が好発年齢であった。

ON1は2010年にカナダで入院例から検出された新しい遺伝子型で、従来のNA1の亜型である。本県では2013年に始めて類似株を検出した。この株について詳細な解析を行ったところ、アミノ酸相同性および系統樹解析から、アミノ酸配列ではカナダ、韓国、ドイツと同一株で、系統樹解析では横浜市、沖縄県、神

奈川県と解析領域に限って完全に一致するものであった<sup>3)</sup>。今回、ON1類似株の流行状況を調査したのは、ON1類似株がG蛋白可変領域に遺伝子変異が生じているため細胞吸着に影響が生じることが予想されるためである<sup>5)</sup>。調査の結果は、2013年は全ウイルスに占めるON1類似株は14.9%(7/47)であったものが、2014年は64.3%(9/14)と明らかに増加していた。しかし、A型の検出例数が10株と少ないにもかかわらず、従来のNA1株が1株検出されたこと、また同シーズンにB型も検出され、結果的にA型とB型の混合流行であったことなどから、新たな抗原として感染性は増したものの、全てがON1類似株の転化するほどの感染力では無かったことが示唆された結果であった。

最後に、G蛋白領域のアミノ酸の挿入変異は、過去にB型でも起こっており世界に拡大した経緯があることから、今回のON1類似株の出現も緩やかながら大勢となる可能性があり、注意深い監視が必要である。また、ウイルスの分子疫学として臨床学的特徴についても検証が急がれる。

## 謝 辞

感染症発生動向調査にご協力いただいた、奈良県医師会の諸先生方に深謝いたします。

## 文 献

- 1) Eshaghi A, Duvvuri VR, Lai R, *et al.*: *PLoS One* 7:e32807 (2012)
- 2) Agoti CN, Otieno JR, Gitahi CW, *et al.*: *Emerg. Infect. Dis.*, 20:950-959 (2014)
- 3) 川辺千明, 米田正樹, 稲田眞知, 他. 臨床とウイルス, 42:247-253 (2014)
- 4) Parveen S, Sullender WM, Fowler K, *et al.*: *J. Clin. Microbiol.*, 44:3055-3064 (2006)
- 5) Levine S, Klaiber-Franco R, Paradiso PR, *et al.*: *J. Gen. Virol.*, 68:2521-2524 (1987)