

III 報 告

時系列分析による感染症の発生予測に関する研究

笹嶋 肇 高階 光榮

インフルエンザ、水痘、手足口病、流行性耳下腺炎の4疾患について、過去17年間の感染症サーベイランス事業で得られた秋田県の定点当りの平均患者発生報告数を基に、時系列分析手法を用いて予測モデルの作成について検討した。その結果、対象とした4疾患についての発生予測が可能であり、数期先までは高い精度の予測値が得られることが判明した。なお、インフルエンザについては、病原体ウイルス検出数を説明変数とした多変量 ARIMA 分析でモデル投入効果を検討したが明確な効果は見いだせなかった。

キーワード：感染症、予測、時系列分析、ARIMA

I はじめに

1976年に秋田県において全国に先駆けて実施した「微生物定点観測」と「患者発生情報収集システム」を柱とする微生物監視体制は、1987年からの国の感染症サーベイランス事業に継承され全国的な情報収集還元体制が開始された。また、1987年1月からのコンピュータオンライン化により情報の迅速化が図られた。1999年には「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」の施行によって、感染症発生動向調査事業の法定化が行われた。その後、2003年11月には狂牛病、SARS、炭疽菌、トリインフルエンザなどの発生への対応を含めた法律が一部改正され、新たな感染症の発生に伴う法律上の整備が行われている。この中で、小児科疾患やインフルエンザ、性感染症などの5類感染症については、蔓延防止のため常に動向を把握し科学的根拠に基づいた適切な情報提供が求められており、法律では「国の感染症発生動向調査の結果等に基づいて、必要な情報を一般国民や医療関係者に提供・公開していくことによって、発生・まん延を防止すべき感染症」に分類されている。

このように、感染症発生動向調査では、患者情報や病原体検出情報を基に流行状況を収集解析し、関係機関に対して適切に提供することが基本的な機能である。加えて、今後の流行状況について科学的根拠を伴った情報を確保することも感染症危機管理を含めた予防対策に関連する重要な機能の一つである。

そこで本研究では、現行の5類感染症定点把握対象疾患の予防対策支援のために、これまで蓄積されたデータを基にして秋田県の患者発生を予測するための方法について検討した。

II 対象と方法

1. 患者データ

対象疾患は、インフルエンザ、水痘、手足口病、流行性耳下腺炎の4疾患とした。

秋田県内の患者データは、コンピュータオンラインが開始された1987年第1週から2003年第52週までの17年間に指定医療機関（以下、定点）から週別に報告された患者データを1定点当たりの患者報告数（報告数/定点）として集計し、これを「患者発生規模」とした。ただし、1987年第1週～1999年12週の患者データは当初の登録定点数が分母のため、報告例のない医療機関がある場合には実際のデータより小さい値であった。そこで、秋田県感染症情報センターに報告された定点数（以下、実定点数）を分母として再集計し、保健所別・疾病別・週別の時系列データに再構築した。なお、1999年13週以降の患者発生規模については、国の感染症発生動向調査システムは実定点に対応しているためそのまま用いた。

2. 病原体検出データ

インフルエンザについて、1997年～2003年までの秋田県内の病原体のウイルス検出データを用いた。

3. 解析方法

時系列データは独立でないため通常の回帰分析法の仮定条件を満たさない場合が多い。このため、時間軸上の構造的・周期的変動を考慮した手法が必要であるが、本研究では時系列分析として広く用いられている ARIMA モデル（自己回帰和分移動平均モデル）を用いて検討した。

ARIMAは線形時系列モデルで一般式は次のように表わされる。

$$\phi(B)\Phi(Bs)\omega t = \theta(B)\Theta(Bs)at \quad (1)$$

ここで、各演算子は

$$\begin{aligned}\phi(B) &= 1 - \phi_1 B - \phi_2 B^2 - \dots - \phi_p B^p \\ \Phi(B) &= 1 - \Phi_1 B^s - \Phi_2 B^{2s} - \dots - \Phi_P B^{Ps} \\ \theta(B) &= 1 - \theta_1 B - \theta_2 B^2 - \dots - \theta_r B^r \\ \Theta(B) &= 1 - \Theta_1 B^s - \Theta_2 B^{2s} - \dots - \Theta_Q B^{Qs}\end{aligned}$$

また、 $\omega_t = \nabla_s^D \nabla^d Z_t$ Z_t : 確率過程 a_t : 誤差項 (ホワイトノイズ) ∇ : 差分演算子

であるが、(1) 式を要約して次のような表示方法が使用されている。

$$\text{ARIMA}(p, d, q)(P, D, Q)_s$$

ここで、パラメータ p, d, q, P, D, Q は次のような意味をもつ。

- p : 自己回帰過程の階数 P : 季節変動自己回帰過程の階数
- d : 定常化のための差分階数 D : 季節階差の数
- q : 移動平均過程の階数 Q : 季節移動平均過程の階数
- s : 季節変動の期間

最も単純なモデルは 1 階の自己回帰モデル AR(1) と 1 階の移動平均モデル MA(1) であり、ARMA(1, 1) は AR(1) と MA(1) の混合モデルである。また対象データは定常化されている必要がある。定常とは期待値と分散が一定でデータ間で相関をもつことを意味し、これら 3 つの条件が満たされていなければならない。このため一般的には差分法が適用されている。

また、ARIMA(1, 1, 1) は原時系列に差分 1 (非季節階差 1) を施した ARMA を示し、ARIMA(1, 1, 1)(1, 1, 1)52 は、原時系列に差分 1 (非季節階差 1) と季節差分 1 (季節差分階差 1) を施した ARMA(1, 1)(1, 1) モデルを示す。なお、各モデルの確率過程の一般項は次のとおりである。

- AR モデルの一般項

$$Z_t = \phi_1 Z_{t-1} + \phi_2 Z_{t-2} + \dots + a_t \quad (2)$$

- ARMA モデルの一般項

$$\begin{aligned}Z_t &= \phi_1 Z_{t-1} + \phi_2 Z_{t-2} + \dots \\ &+ \phi_p Z_{t-p} + a_t - \theta_1 a_{t-1} - \theta_2 a_{t-2} - \dots - \theta_r a_{t-r}\end{aligned} \quad (3)$$

ARIMA モデルの解析は、SPSS 12.0J for windows Trends、及び Decision Time 1.0J (以下、DT) を用い、①定常化と周期分析、②モデル同定、③モデル診断、④予測モデルの手順で行った。

III 結 果

1. 患者データ

図 1-1 から図 1-4 に、実定点データで再集計した秋田県の週別患者発生規模のデータを折れ線グラフで示した。

2. 病原体検出データ

表 1 に、1997 年 1 月～2003 年 12 月までの、インフルエンザウイルス月別検出数を示した。

3. 時系列解析結果

1) インフルエンザ

(1) 定常化と周期分析

インフルエンザの 1987 年から 2003 年の患者発生データは、図 1-1 に示したように毎年冬季に発生規模が増加するパターンを示したが明確な長期トレンドは確認できなかった。周期分析の結果は、図 2-1 に示したように 52 週のピリオドグラムが最大で、次いで 26 週であった。つまり、現時系列の周期は 52 週 (1 年) であった。

(2) モデルの同定

原時系列の自己相関関数 (以下 ACF) と偏自己相関関数 (以下 PACF) は、図 2-2 と図 2-3 に示したように、共に指数的減衰パターンが観察された。これらの結果を基に DT を用いてパラメータを分析した結果、表 2-1 に示したとおり最終モデルとして ARIMA(1, 0, 2)(1, 0, 1)52 が得られた。

(3) モデルの診断

モデル診断のための適合度統計量としては、Trends で計算される赤池情報量基準 (以下、AIC)、Schwartz の Bayesian 基準 (以下、SBC) を用い、モデル診断指標としては Box-Ljung 統計量の P 値が 0.05 以上であること (残差がホワイトノイズである仮説が棄却されないこと) を指標とした。

Ljung-Box 統計量の P 値は、表 2-2 に示したようにラグ 16 までが 0.05 以上で、この期間までのモデル残差がホワイトノイズである仮説は棄却されなかった。

(4) 予測モデル

これらの結果から、予測モデルは次のとおりであった。

$$(1 - 0.631B)(1 - 0.996B^{52})Z_t = (1 + 0.531B + 0.217B^2)(1 - 0.959B^{52})a_t$$

図 2-4 に観測値と適合値をプロットしたグラフを、図 2-5 に 1993 年 13 週～2004 年 52 週までの予測値を加えたものをプロットしたグラフを示した。予測期間は 1 周期の 52 週分としたが、ARIMA の特性から予測期間が長いほど予測値の信頼幅が大きくなるため、4 期先くらいまでが実用的な予測値であった。

(5) 病原体ウイルス検出データによる多変量 ARIMA

インフルエンザの主な原因ウイルスは A ソ連型、A 香港型、B 型の 3 種類に分類される。そこで、これらのウイルス検出データを用いた多変量 ARIMA

モデルについて検討した。

前段として各ウイルスの検出数の周期について分析したところ、3種類のウイルス検出数の周期は、図2-6、図2-7、図2-8に示したとおりいずれも52週であった。表2-3には1997年から2003年までの期間についてのこれまでと同様のARIMA(単変量ARIMA)分析をした結果を、表2-4にはウイルス検出数を説明変数とした多変量ARIMA分析結果を示した。AICとSBCを比較すると、共に単変量ARIMAに比べて多変量ARIMAの値が小さく、ウイルス検出数を独立変数に導入することでわずかに予測精度が向上したものの、実用的効果が期待できる程ではなかった。

2) 水痘

(1) 定常化と周期分析

水痘の1987年から2003年の患者発生データは、図1-2に示したように1987年から1988年にかけて長期減少トレンドが観察された。これは、水痘の主な罹患年齢である0~5歳人口の減少を反映しているものと推測された。また、年変動が著しくスペクトル分析の結果、図3-1に示したように26週と52週の周期が認められたが、これをグラフで観察すると第1週から第26週間でのAパターンと27週以降52週までのBのパターンに分類された。そこで、周期26週と周期52週の2つのパターンについて分析を行った。また、図3-2と図3-3に示したように、原時系列のACFは直線的減衰パターンで、PACFはラグ2まで大きな値で、その後ラグ6までStandard error(標準誤差)範囲を超えた。ACFパターンは季節変動が考えられることを示したため季節階差1に非季節性階差1を追加して分析した。結果は図3-4と図3-5に示すようにACFはラグ3まで大きな値を示した。

(2) モデルの同定

原時系列の周期を26としてDTによりARIMA(0, 1, 3)(1, 0, 1)26が選択された。この結果に基づいて、Trendsで分析した結果は表3-1に示したように、AICは1626、SBCは1654であった。また、原時系列の周期を52とした結果ARIMA(0, 1, 3)(0, 1, 1)52が選択され、AICは1545、SBCは1568であった。モデルはAIC、SBCが小さい方が優れたモデルであることから、これらを基にDTでパラメータを分析した結果、表3-2に示したように最終モデルとしては、ARIMA(0, 1, 3)(0, 1, 1)52が選択された。

(3) モデルの診断結果

ARIMA(0, 1, 3)(0, 1, 1)52母自己相関係数の

検定のためのBox-Ljung統計量のP値は、図3-6に示したようにラグ10までが0.05以上で、この期間までのモデル残差がホワイトノイズである仮説は棄却されなかった。

(4) 予測モデル

以上の結果より予測モデルは次のとおりであった。 $\nabla \nabla_{52} Z_t = (1 - 0.713B + 0.277B^2 - 0.198B^3)(1 - 0.803B^{52})$ at

図3-7に1987年~2003年までの観測値に対するモデルの適合値、図3-8に1993年13週~2004年52週までの予測値を含めたグラフを示した。

3) 手足口病

(1) 定常化と周期分析

手足口病の1987年から2003年の患者発生データは、図1-3に示したように年別の発生規模に差がみられた。スペクトル分析によって、図4-1に示したように最大周期は52週であった。

(2) モデルの同定

図4-2と図4-3に示したACF及びPACFの結果を参考にモデルの階差と次数を決定した。PACFがラグ1で切れているがACFが直線的に減少しているためデータが定常化されていないと判断された。定常化した非季節階差1のデータを図4-4と図4-5に示した。それらの結果を基にDTによりパラメータを分析した結果、表4-1に示したようにARIMA(0, 1, 5)(1, 0, 1)52が選択された。

(3) モデルの診断

Trendsでモデル診断の結果は、図4-6に示したように、Box-Ljung統計量のP値はラグ16まで0.05以上で、この期間までのモデル残差がホワイトノイズである仮説は棄却されなかった。

(4) 予測モデル

以上の結果から表4-1の同定結果が採用され、予測モデルは次のとおりであった。

$(1 - 0.982B_{52}) \nabla Z_t = (1 + 0.019B + 0.125B^2 + 0.130B^3 + 0.097B^4 - 0.122B^5)(1 - 0.945B^{52})$ at

図4-7に1987年~2003年までの観測値に対するモデルの適合値を、図4-8に1993年13週~2004年52週までの予測値を含めたグラフを示した。

4) 流行性耳下腺炎

(1) 定常化と周期分析

流行性耳下腺炎の1987年から2003年の患者発生規模は、図1-4に示したように年変動が明確でなかったが、スペクトル分析の結果、図5-1に示したように最大のピリオドグラムを示す期間は104週、次いで52週、26週の順であった。そこで、周期26週、52週、104週について分析した。

図5-2と図5-3に示したように、原時系列のACFは直線的減少を示しPACFはラグ3まで大きい値を示した。周期26系列の非季節階差1のACFとPACFを図5-4と図5-5に、周期52系列の非季節階差1のACFとPACFを図5-6と図5-7に示したが、周期による違いはみられなかった

(2) モデルの同定

これらの結果を基にDTを用いてパラメータ分析を行った結果、非季節階差1で周期26系列と周期52系列、周期104系列の3種類が得られた。このうち、周期26系列と周期52系列及び周期104系列についてのモデル同定結果を表5-1、表5-2、表5-3に示した。適合度統計量のAICとSBCは周期52系列の値が最小のため、モデルとしてARIMA(2, 2, 1)(1, 0, 1)₅₂が選択された。

(3) モデルの診断

Ljung-Box 統計量のP値は、図5-8に示したようにラグ16までが0.05以上で、この期間までのモデル残差がホワイトノイズである仮説は棄却されなかった。

(4) 予測モデル

以上の結果から予測モデルは次のとおりであった。 $(1 + 0.959B + 0.383B^2)(1 - 0.969B^{52})\nabla Z_t = (1 + 0.317B)(1 - 0.917B^{52})at$

図4-9に1987年～2003年までの観測値に対するモデルの適合値を、図4-10に1993年13週～2004年52週までの予測値を含めたグラフを示した。

IV 考 察

感染症の患者データ解析についての幾つかの報告^{1)~3)}が見られるものの、スペクトル分析を用いたものが多い。感染症は、一般に感染源、感染経路、感受性保有者の要因等により発生し、呼吸器系感染症においては感受性保有者が感染源と間接触により感染する⁴⁾。このことから、一部の施設などの感受性保有率がわかっている局在的流行に関してはReed-Frostモデルなどが適しているが、広域的発生に拡張するためには非決定論的モデルを確立する必要がある。このようなことから、観測データによるスペクトル分析などが用いられていると考えられる。

予測モデルに関して、沖ら³⁾は気象データを用いた対数線形モデルを検討している。また、長谷川ら²⁾は過去データにスペクトル解析結果を当てはめて長期的傾向を求めているが、基本理論はCDCで採用し当所で運用してきたCPEG(Current-Past Experience Graph)と同様である。しかし、CPEGは過去の同時期の平均、標準偏差、標準化変数を指標としていることから、長期ト

レンドや異常値の扱いに検討の余地が残されている。

本研究で用いたARIMA時系列モデルは、BoxとJenkinsによって構築され⁵⁾、自己回帰と移動平均の理論を基礎としている。Allard Rら^{6)~9)}は感染症の予測解析にARIMAやSARIMA(季節変動を考慮したARIMA)が有効であることを報告している。本研究では、5類感染症の定点把握対象疾患のうち、①広域的流行が毎年繰り返され複数の病原体が検出される疾患としてインフルエンザ、②年間を通して発生がみられ季節的な変動パターンを示す水痘、③比較的狭い地域に限られ複数の病原体が検出される疾患として手足口病、④比較的狭い地域に限られ病原体が1種類の疾患として流行性耳下腺炎、の4疾患についての発生予測モデルについて検討した。その結果、4疾患についてARIMAモデルを適用によって秋田県の週別平均患者発生規模の予測が可能であると考えられた。

インフルエンザについては、Aソ連型・A香港型・B型のウイルス検出データが多く収集されていることから、独立変数に組み込んで多変量ARIMAモデルを試みた。しかし、用いたデータでは患者発生モデルに対する効果は充分ではなかった。これは、各シーズンにおいて単独ウイルスによる発生はほとんどみられず、複数のウイルスによる発生の多いことが原因と推察された。予測モデルの評価としては、ARIMAモデルで決定されたパラメータによって1周期までは予測が可能である。しかし予測値の信頼限界は予測期間が長ければ大きくなるため、実用的な精度の比較的高い期間はモデルの自己回帰や移動平均の次数を考慮して3週から5週先までである。ただし、県内の平均患者発生規模データが得られた時点でモデルに追加する逐次予測法によって、その時点からの予測が可能となる。

また、本研究で採用したモデルは線形時系列モデルであり、データ内部構造を自己回帰と移動平均によって解析し適合させる理論である。非線形時系列モデルとの比較検討については、今後の課題としたい。

V ま と め

インフルエンザ、水痘、手足口病、流行性耳下腺炎の4疾患について、線形時系列モデルの一つであるARIMAモデルを用いて患者発生予測モデルの作成を検討し、いずれの疾患についてもARIMAモデルによる発生予測が可能であることを明らかにした。ただし、インフルエンザウイルス検出データのモデルへの組込効果を検討したが明確な効果は見いだせなかった。

ARIMAモデルでは、自己回帰や移動平均の次数が1~3であるため、現時点から数期先までは精度高く予測できることが明らかになった。今回作成したモデルに

よって、3～5期先まで精度の高い予測データが求められるので、感染症情報センターにおける患者の発生予測解析においてもその目的を十分に達成できると考えられた。

文 献

- 1) 沖 典男, 他. スペクトル解析による感染症流行の周期特性, 兵庫県衛生研究所研究報告, 29; 1994: 1-7.
- 2) 長谷川信作, 他. 感染症発生動向調査情報の迅速還元と流行予測. 情報処理学会論文誌, 1999; 40: 132-140.
- 3) 沖 典男, 他. 感染症サーベイランス患者発生予測の検討, 兵庫県衛生研究所研究報告, 33; 1998: 81-86.
- 4) 坂本州弘, 疫学と疫学モデル. 金芳堂, 1985; 255-289.
- 5) W. Vandeer著 (藁谷千風彦・他訳). 時系列入門—ボックス—ジェンキンスモデルの応用. 東京都. 多賀出版. 1988.
- 6) Allard R. Use of time-series analysis in infectious disease surveillance. Billetin of the World Health Organization 1998; 76: 327-333.
- 7) G. David Williamson Ginner, Weatherby Hudson. A monitoring system for detecting aberrations in public health surveillance reports. Statistics in Medicine 1999; 18: 3283-3298.
- 8) Flavio Fonseca Nobre, Ana Beatriz Soares Monterio, Paulo Roberto Tellers, and G. David Williamson. Dynamic linear model and SARIMA: a comparison of their forecasting performance in epidemiology. Statistics in Medicine 2001; 20: 3051-3069.
- 9) Maarten J. Postma, Dirk Ruwaard, and Hans(J.) C. Jager, Projecting utilization of hospital in-patient days in The Netherlands: A time series analysis. Journal of Mathematics Applied in Medicine & Biology 12, 185-202.

図1-1 インフルエンザ患者発生規模（1987年～2003年）

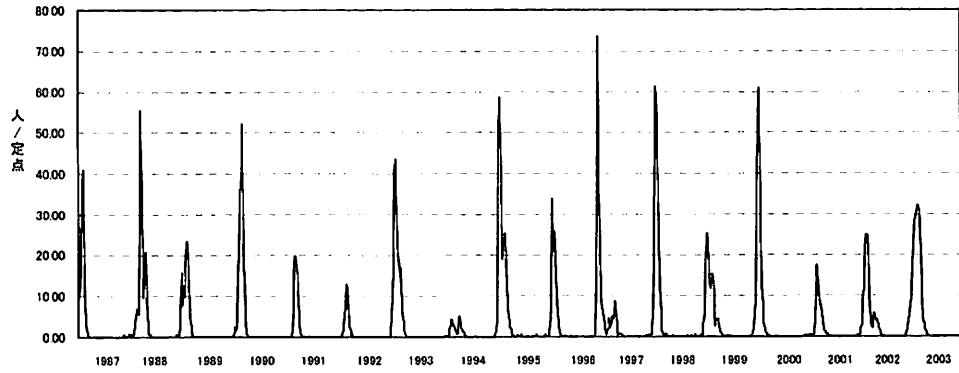


図1-2 水痘患者発生規模（1987年～2003年）

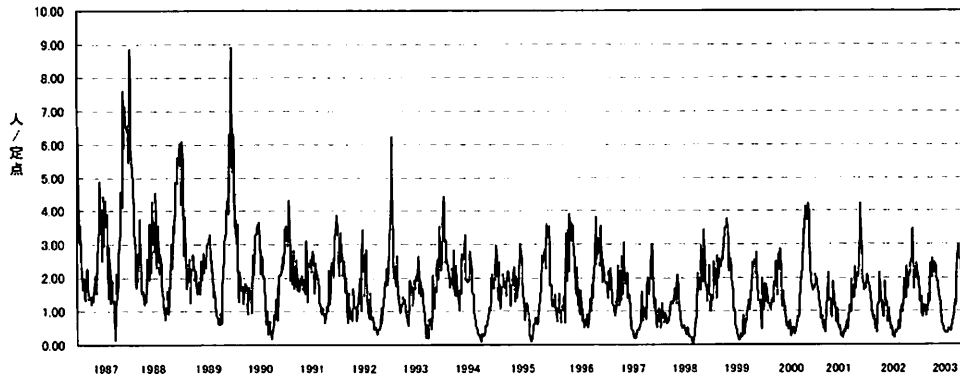


図1-3 手足口病患者発生規模（1987年～2003年）

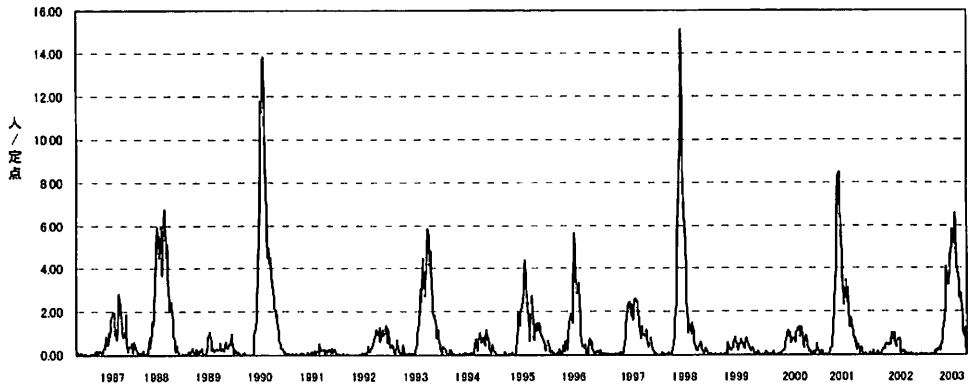


図1-4 流行性耳下腺炎患者発生規模（1987年～2003年）

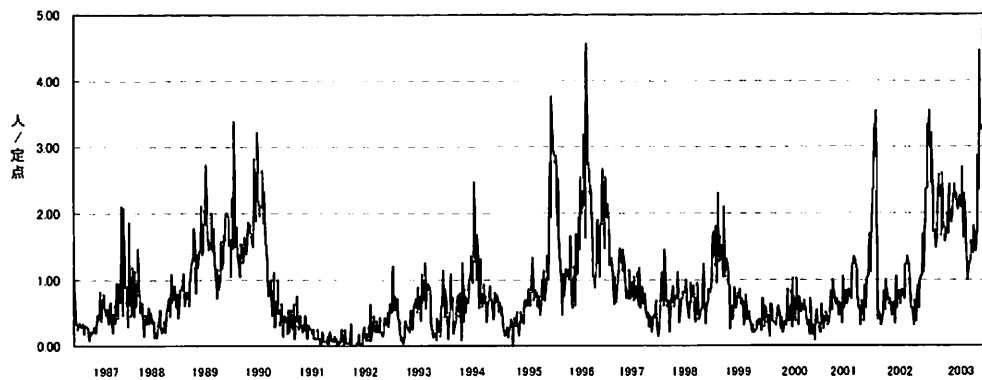


表1 インフルエンザウイルス月別検出数（秋田県：1997年－2003年）

年	月	FluA H1	FluA H3	FluB	総計	年	月	FluA H1	FluA H3	FluB	総計
1997	1		34		34	2000	7				0
1997	2		4	6	10	2000	8				0
1997	3		2	22	24	2000	9				0
1997	4		1	36	37	2000	10				0
1997	5			13	13	2000	11				0
1997	6			1	1	2000	12				0
1997	7				0	2001	1				0
1997	8				0	2001	2	5	4	7	16
1997	9				0	2001	3	2		6	8
1997	10				0	2001	4	6	6	19	31
1997	11				0	2001	5	1		1	2
1997	12				0	2001	6				0
1998	1	2	47		49	2001	7				0
1998	2		49		49	2001	8				0
1998	3		2		2	2001	9				0
1998	4			1	1	2001	10				0
1998	5				0	2001	11				0
1998	6				0	2001	12				0
1998	7				0	2002	1	15	17		32
1998	8				0	2002	2	29	35		64
1998	9				0	2002	3	12	33	2	47
1998	10				0	2002	4		1	15	16
1998	11				0	2002	5		1	6	7
1998	12		1	1	2	2002	6				0
1999	1		107		107	2002	7				0
1999	2		55	15	70	2002	8				0
1999	3		7	46	53	2002	9				0
1999	4				0	2002	10				0
1999	5				0	2002	11				0
1999	6				0	2002	12		2	1	3
1999	7				0	2003	1		15	7	22
1999	8				0	2003	2		13	18	31
1999	9				0	2003	3		2	13	15
1999	10				0	2003	4				0
1999	11				0	2003	5				0
1999	12				0	2003	6				0
2000	1	10	55		65	2003	7				0
2000	2	12	8		20	2003	8				0
2000	3	11	1		12	2003	9				0
2000	4	1	1		2	2003	10				0
2000	5	1			1	2003	11				0
2000	6				0	2003	12				0

FluA H1 : インフルエンザウイルス A ソ連型
 FluA H3 : インフルエンザウイルス A 香港型
 FluB : インフルエンザウイルス B 型

図 2 - 1 ピリオドグラム (インフルエンザ)

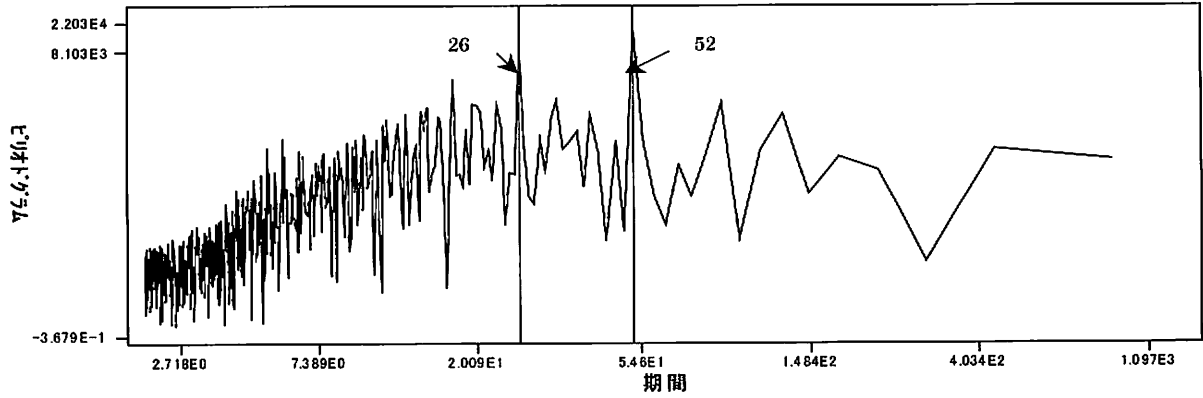


図 2 - 2 ACF (インフルエンザ)

Lag	Corr.	Err.	-1	-.75	-.5	-.25	0	.25	.5	.75	1	Box-Ljung	Prob.
1	.869	.034					.	*****				670.308	.000
2	.658	.034					.	*****				1054.786	.000
3	.464	.034					.	*****				1246.217	.000
4	.322	.034					.	*****				1338.337	.000
5	.212	.034					.	***				1378.209	.000
6	.117	.033					.	*				1390.401	.000
7	.034	.033					.	*				1391.406	.000
8	-.027	.033					*	.				1392.038	.000
9	-.063	.033					*	.				1395.617	.000
10	-.086	.033					*	.				1402.234	.000
11	-.101	.033					*	.				1411.391	.000
12	-.114	.033					*	.				1422.972	.000
13	-.122	.033					*	.				1436.281	.000
14	-.127	.033					**	.				1450.738	.000
15	-.130	.033					**	.				1465.926	.000
16	-.131	.033					**	.				1481.334	.000

Plot Symbols: Autocorrelations * Two Standard Error Limits .

図 2 - 3 P A C F (インフルエンザ)

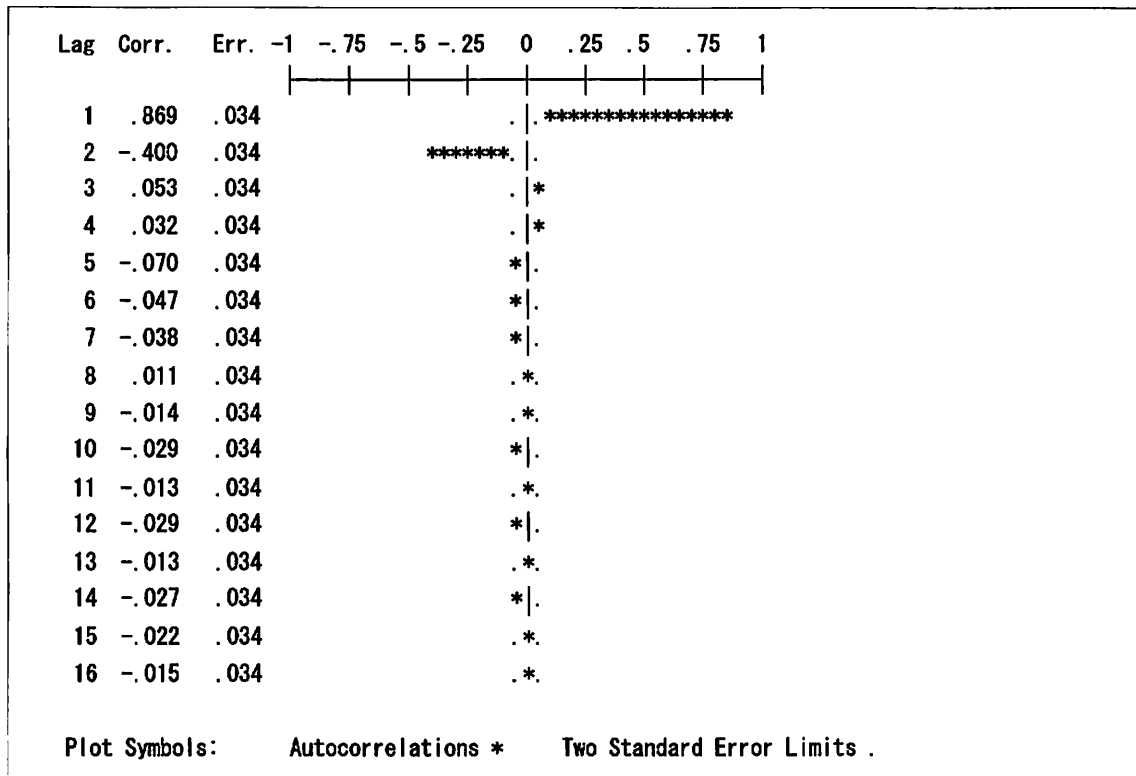


表 2 - 1 ARIMA モデル同定結果 (インフルエンザ)

FINAL PARAMETERS:				
Standard error	3.9489649			
Log likelihood	-2489.6842			
AIC	4991.3683			
SBC	5020.075			
Analysis of Variance:				
	DF	Adj. Sum of Squares	Residual Variance	
Residuals	878	14446.882	15.594324	
Variables in the Model:				
	B	SEB	T-RATIO	APPROX. PROB.
AR1	.6313721	.0382741	16.496063	.00000000
MA1	-.5307369	.0457902	-11.590629	.00000000
MA2	-.2168111	.0421564	-5.143024	.00000033
SAR1	.9955605	.0194255	51.250197	.00000000
SMA1	.9591153	.0904095	10.608564	.00000000
CONSTANT	3.6555867	1.2672757	2.884602	.00401496

表 2 - 2 モデル診断結果 (インフルエンザ)

ARIMA (1, 0, 2) (1, 0, 1)52の残差 ACF

Autocorrelations: ERR_1 Error for Flu_pref from ARIMA

Auto- Stand.

Lag	Corr.	Err.	-1	-.75	-.5	-.25	0	.25	.5	.75	1	Box-Ljung	Prob.
1	.006	.034					.*					.037	.847
2	.006	.034					.*					.065	.968
3	.017	.034					.*					.331	.954
4	-.023	.034					.*					.791	.940
5	-.017	.034					.*					1.051	.958
6	-.011	.033					.*					1.156	.979
7	-.051	.033					* .					3.448	.841
8	-.031	.033					* .					4.316	.828
9	-.010	.033					.*					4.412	.882
10	-.017	.033					.*					4.665	.912
11	-.024	.033					.*					5.184	.922
12	-.025	.033					.*					5.728	.929
13	-.005	.033					.*					5.752	.955
14	.002	.033					.*					5.755	.972
15	-.011	.033					.*					5.866	.982
16	-.020	.033					.*					6.220	.986

Plot Symbols: Autocorrelations * Two Standard Error Limits .

Total cases: 884 Computable first lags: 883

図2-4 観測値とモデル適合値の比較グラフ (インフルエンザ)

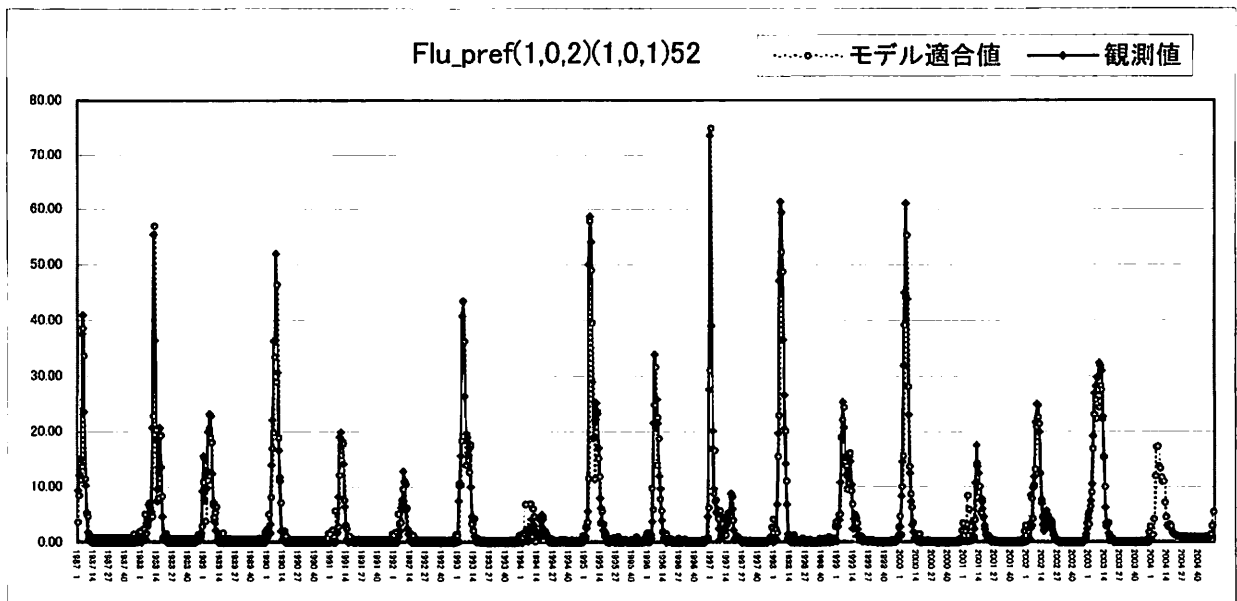


図2-5 観測値・モデル適合値・52週先までの予測値 (インフルエンザ)

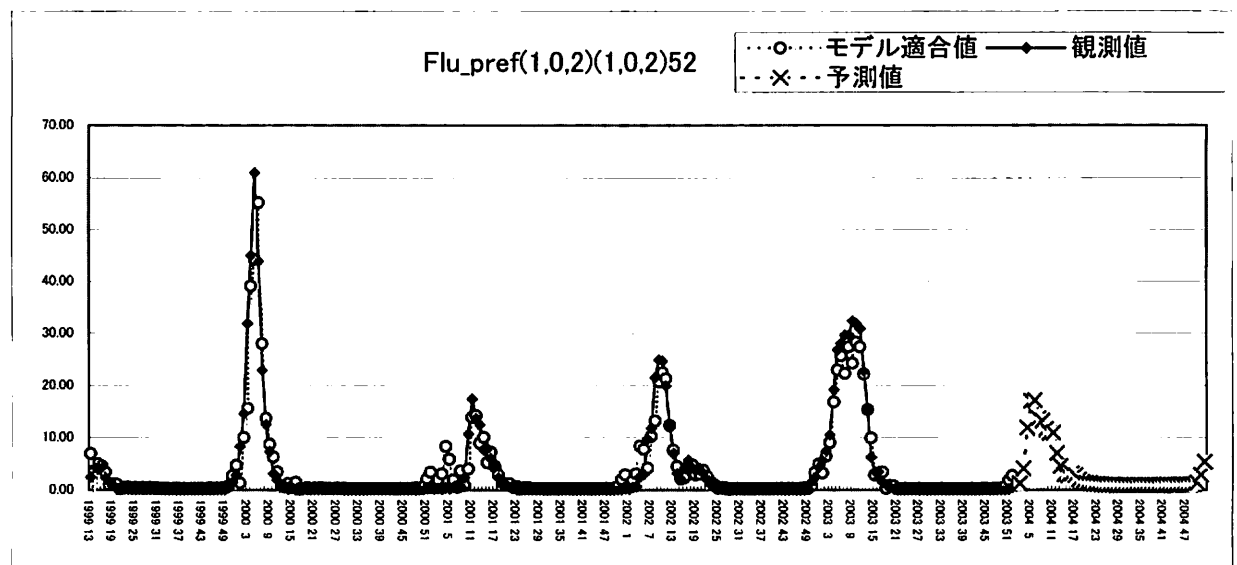
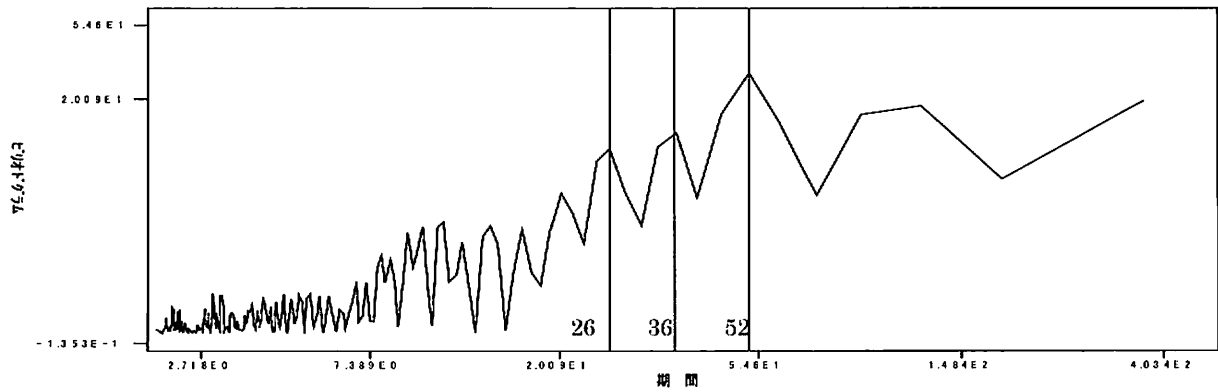
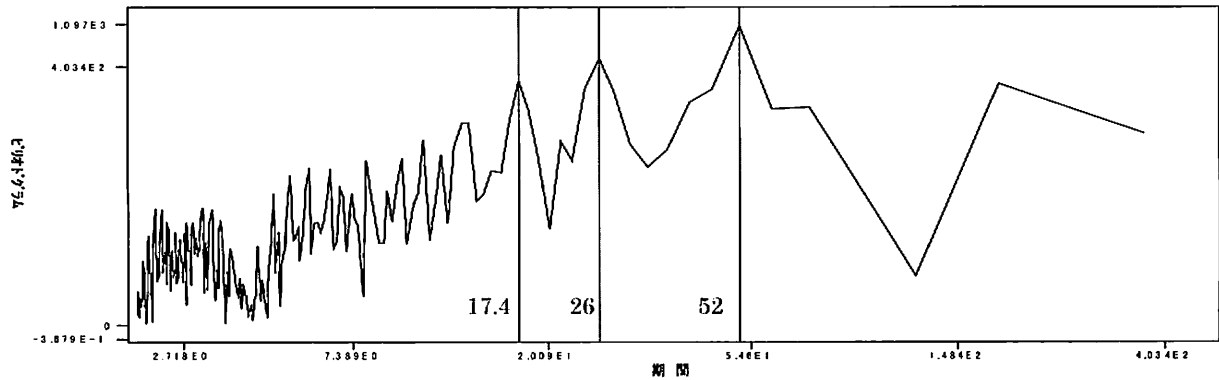


図2-6 インフルエンザウイルスAソ連型検出データ周期分析結果



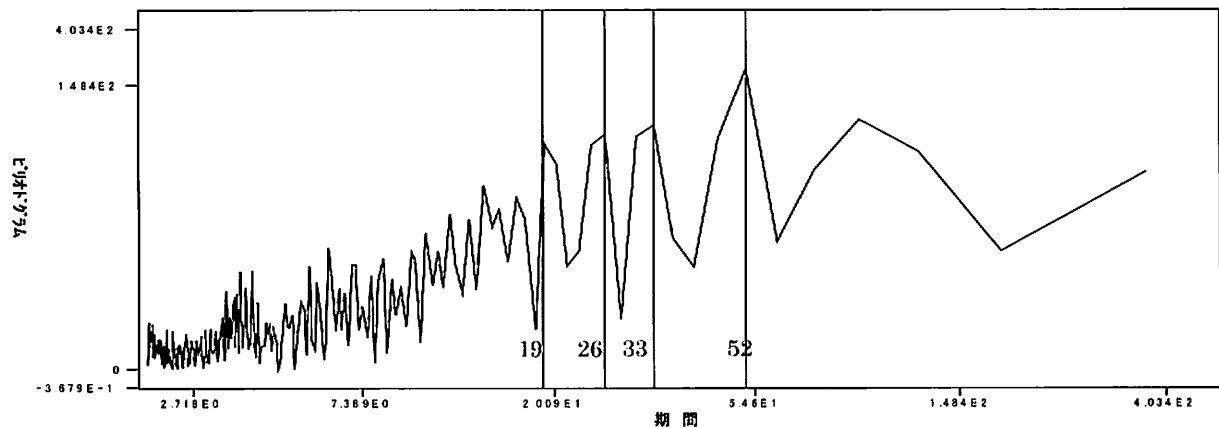
インフルエンザウイルスAソ連型のピリオドグラムは52週が最大で、以下36週、26週の順であった。

図2-7 インフルエンザウイルスA香港型検出データ周期分析結果



インフルエンザウイルスA香港型のピリオドグラムは52週が最大で、以下26週、17.4週の順であった。

図2-8 インフルエンザウイルスB型検出データ周期分析結果



インフルエンザウイルスB型のピリオドグラムは52週が最大で、以下33週、26週、19週の順であった。

表 2 - 3 単変量 ARIMA (インフルエンザ)

FINAL PARAMETERS:				
Number of residuals	364			
Standard error	2.7191028			
Log likelihood	-880.05065			
AIC	1772.1013			
SBC	1795.4842			
	DF	Adj. Sum of Squares	Residual Variance	
Residuals	358	2683.0658	7.3935199	
Variables in the Model:				
	B	SEB	T-RATIO	APPROX. PROB.
AR1	.8012052	.0361443	22.166835	.00000000
MA1	-.8431835	.0470905	-17.905587	.00000000
MA2	-.5562727	.0475287	-11.703938	.00000000
SAR1	.6053040	.3030081	1.997650	.04651095
SMA1	.4903341	.3293815	1.488651	.13745959
CONSTANT	4.7649236	2.0370485	2.339131	.01987803

- 1) 独立変数：週別定点当り平均患者発生報告数
 2) 分析期間：1997年から2003年

表 2 - 4 多変量 ARIMA (インフルエンザ)

FINAL PARAMETERS:				
Number of residuals	363			
Standard error	2.6718407			
Log likelihood	-870.8473			
AIC	1759.6946			
SBC	1794.7442			
	DF	Adj. Sum of Squares	Residual Variance	
Residuals	354	2577.4819	7.1387325	
Variables in the Model:				
	B	SEB	T-RATIO	APPROX. PROB.
AR1	.7964157	.0365320	21.800467	.00000000
MA1	-.8735450	.0471876	-18.512176	.00000000
MA2	-.5693470	.0470706	-12.095592	.00000000
SAR1	.5357578	.2681855	1.997713	.04651256
SMA1	.3876733	.2913275	1.330713	.18413987
Aソ連型	.4357429	.2197946	1.982501	.04819599
A香港型	.0977759	.0423891	2.306626	.02165251
B型	-.2438453	.1159564	-2.102905	.03617961
CONSTANT	4.7021982	2.0475441	2.296506	.02223040

- 1) 独立変数：週別定点当り平均患者発生報告数、インフルエンザウイルスAソ連型検出数、同A香港型検出数、同B型検出数
 2) 分析期間：1997年から2003年

図 3-1 ピリオドグラム (水痘)

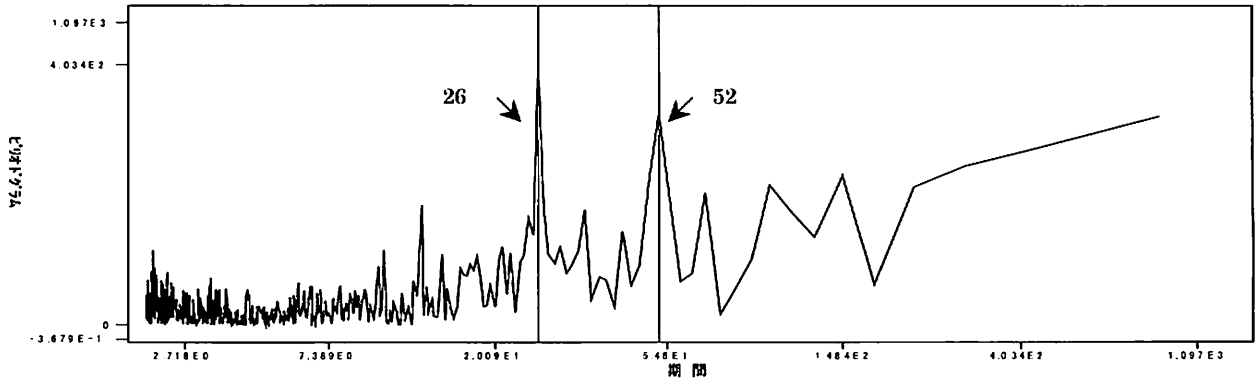


図 3-2 ACF (水痘)

Auto- Stand.	Lag	Corr.	Err.					Box-Ljung	Prob.					
				-1	-.75	-.5	-.25	0	.25	.5	.75	1		
1	.808	.034	*****	578.417	.000			
2	.802	.034	*****	1149.486	.000			
3	.685	.034	*****	1566.873	.000			
4	.603	.034	*****	1891.003	.000			
5	.491	.034	*****	2106.053	.000			
6	.387	.033	*****	2239.737	.000			
7	.292	.033	*****	2315.799	.000			
8	.168	.033	**	2340.999	.000			
9	.082	.033	*	2346.992	.000			
10	-.001	.033	*	2346.993	.000			
11	-.064	.033	2350.622	.000			
12	-.119	.033	*	2363.260	.000			
13	-.130	.033	**	2378.436	.000			
14	-.152	.033	**	2399.138	.000			
15	-.140	.033	**	2416.825	.000			
16	-.123	.033	*	2430.528	.000			

Plot Symbols: Autocorrelations * Two Standard Error Limits .

図3-3 PACF (水痘)

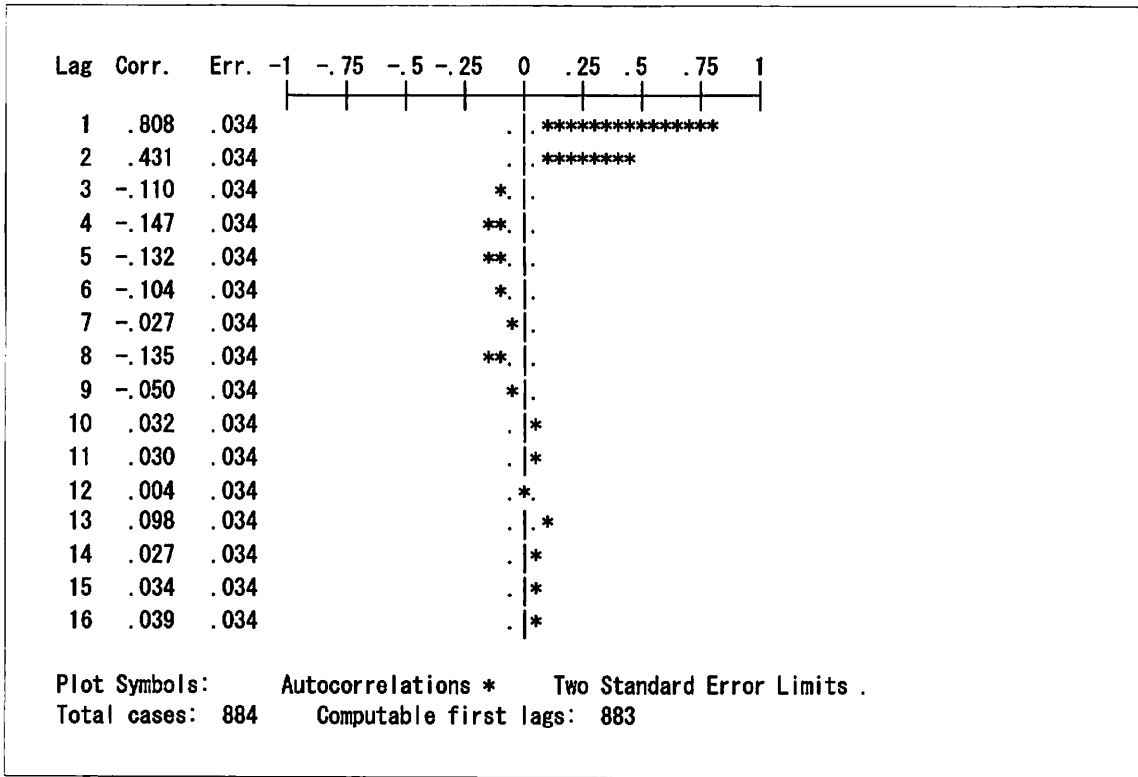


図3-4 非季節階差1+季節階差1のACF (水痘)

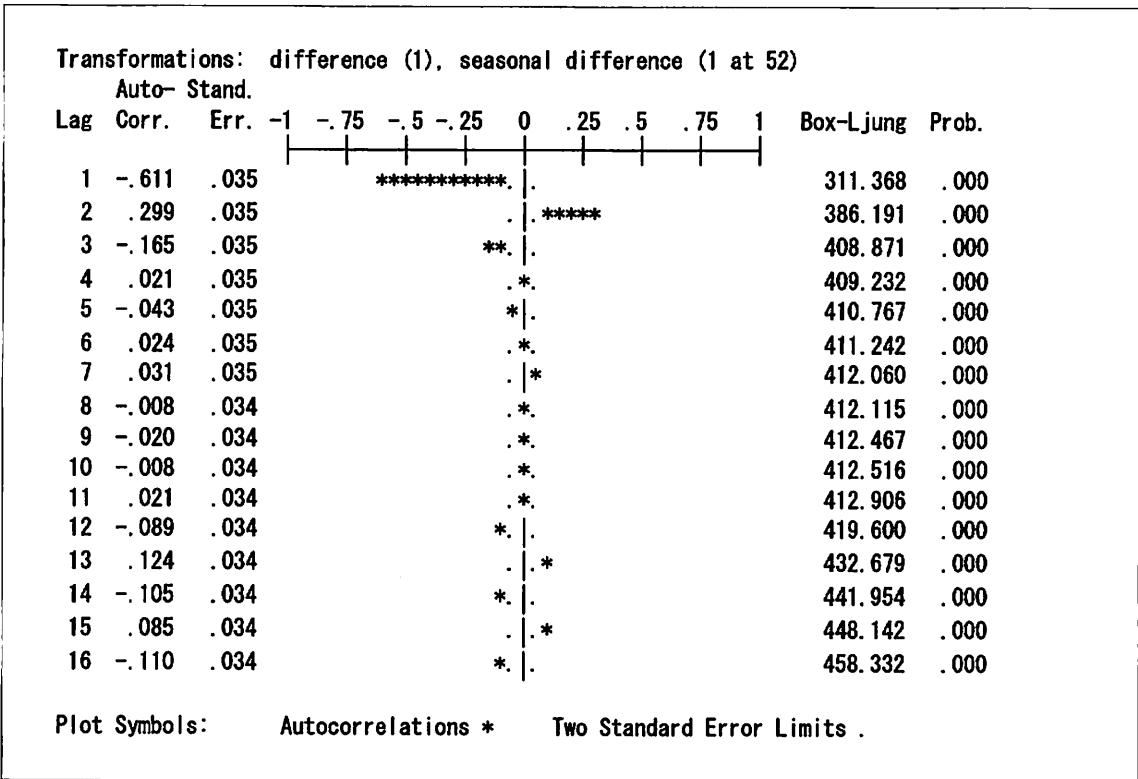


図3-5 非季節階差1+季節階差1のPACF (水痘)

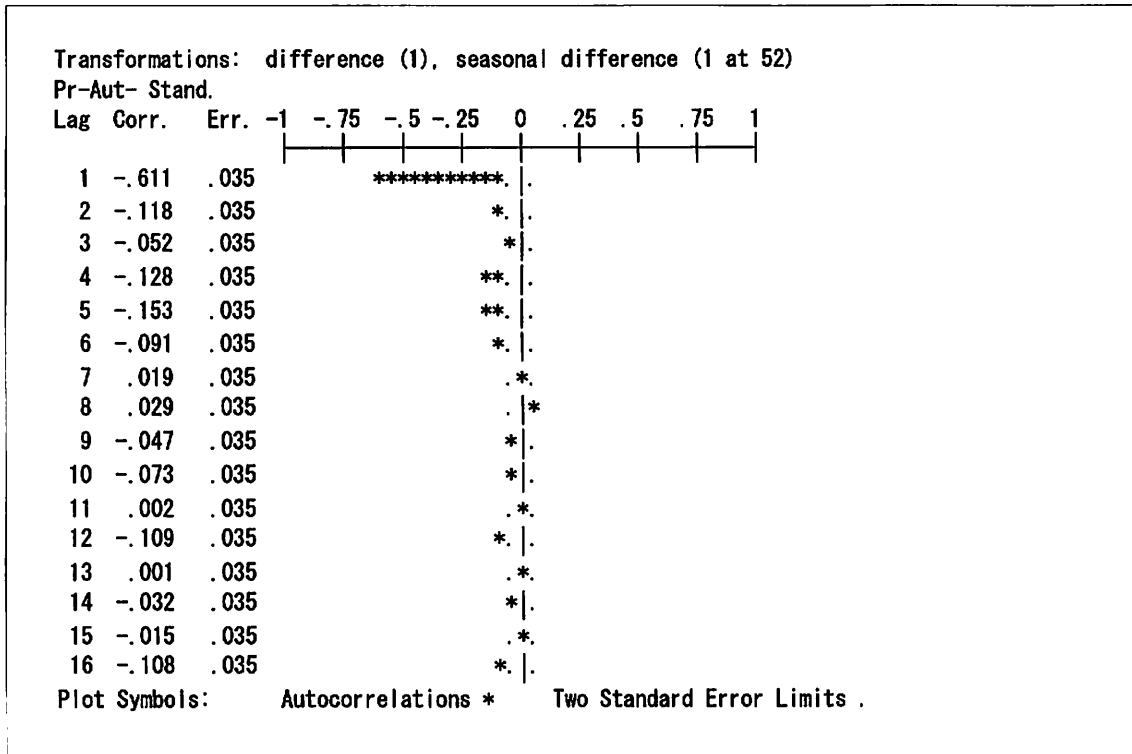


表3-1 周期26のARIMAモデル同定結果 (水痘)

FINAL PARAMETERS:

Standard error	.59598339
Log likelihood	-807.01869
AIC	1626.0374
SBC	1654.7373

Analysis of Variance:

	DF	Adj. Sum of Squares	Residual Variance
Residuals	877	321.51366	.35519620

Variables in the Model:

	B	SEB	T-RATIO	APPROX. PROB.
MA1	.63193101	.03300221	19.14814	.00000000
MA2	-.29659486	.03787103	-7.83171	.00000000
MA3	.14317867	.03303262	4.33446	.00001630
SAR1	.99120350	.00500613	197.99787	.00000000
SMA1	.92000594	.02405107	38.25218	.00000000
CONSTANT	-.00127569	.03624764	-.03519	.97193337

表 3 - 2 周期52の ARIMA モデル同定結果 (水痘)

FINAL PARAMETERS:

Number of residuals 831
 Standard error .59099707
 Log likelihood -767.52751
 AIC 1545.055
 SBC 1568.6682

Analysis of Variance:

	DF	Adj. Sum of Squares	Residual Variance
Residuals	826	308.02734	.34927753

Variables in the Model:

	B	SEB	T-RATIO	APPROX. PROB.
MA1	.71284506	.03327908	21.420218	.00000000
MA2	-.27712723	.04014684	-6.902840	.00000000
MA3	.19752125	.03321348	5.947021	.00000000
SMA1	.80306407	.02967219	27.064540	.00000000
CONSTANT	-.00025871	.00206897	-.125045	.90051847

図 3 - 6 モデル診断結果 (水痘)

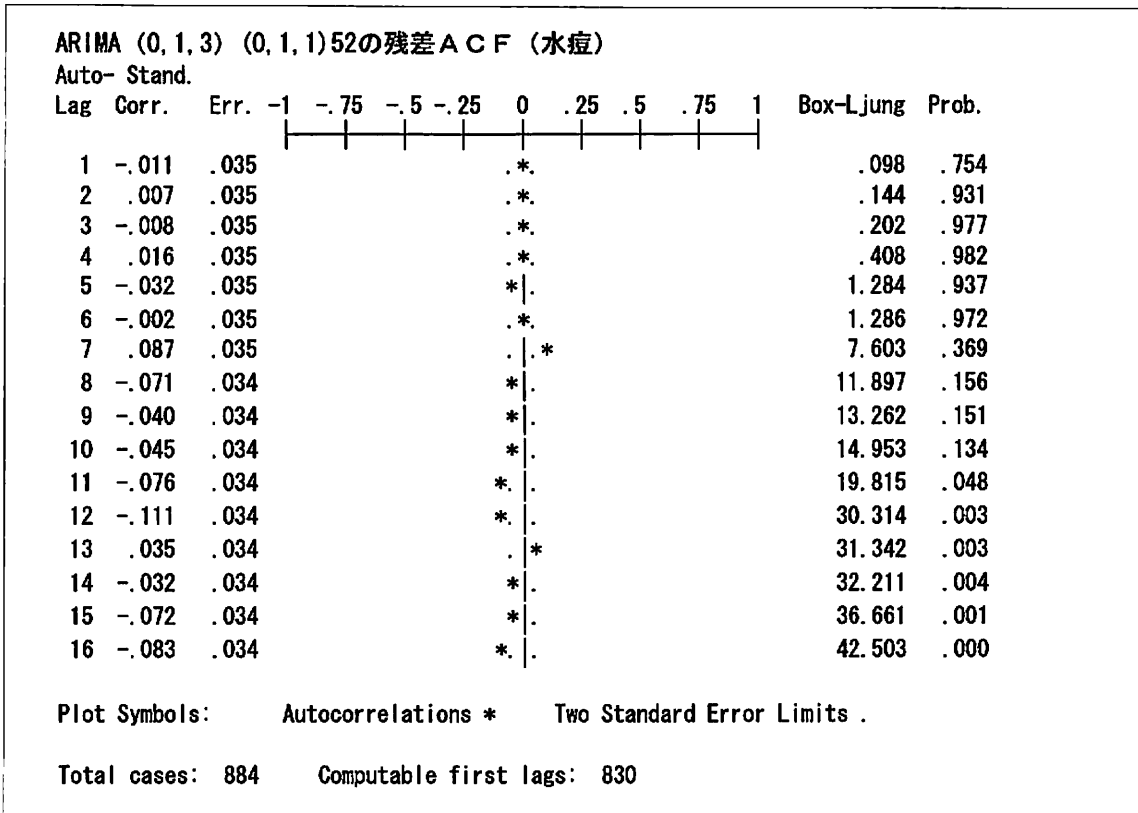


図3-7 観測値とモデル適合値のグラフ表示 (水痘: 1987年1週~2003年52週)

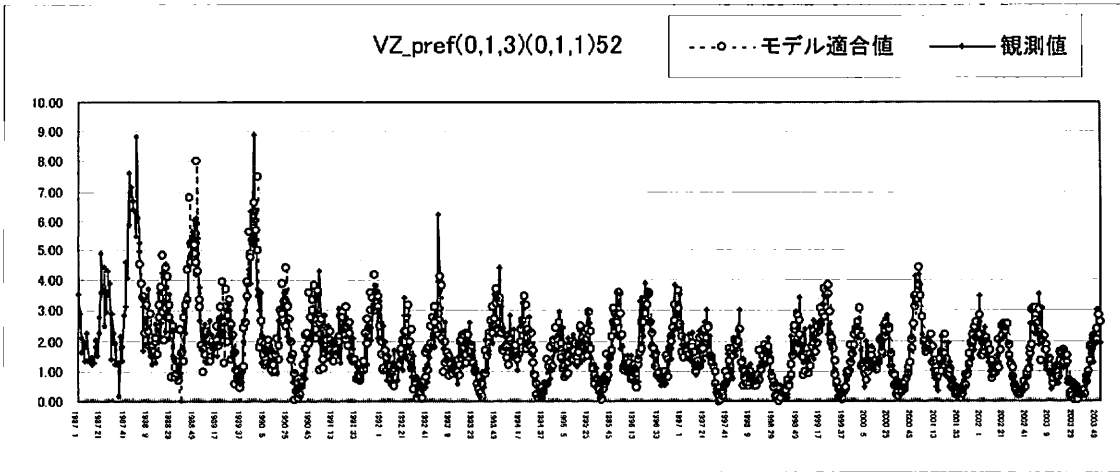


図3-8 観測値・モデル適合値・52週先までの予測値 (水痘)

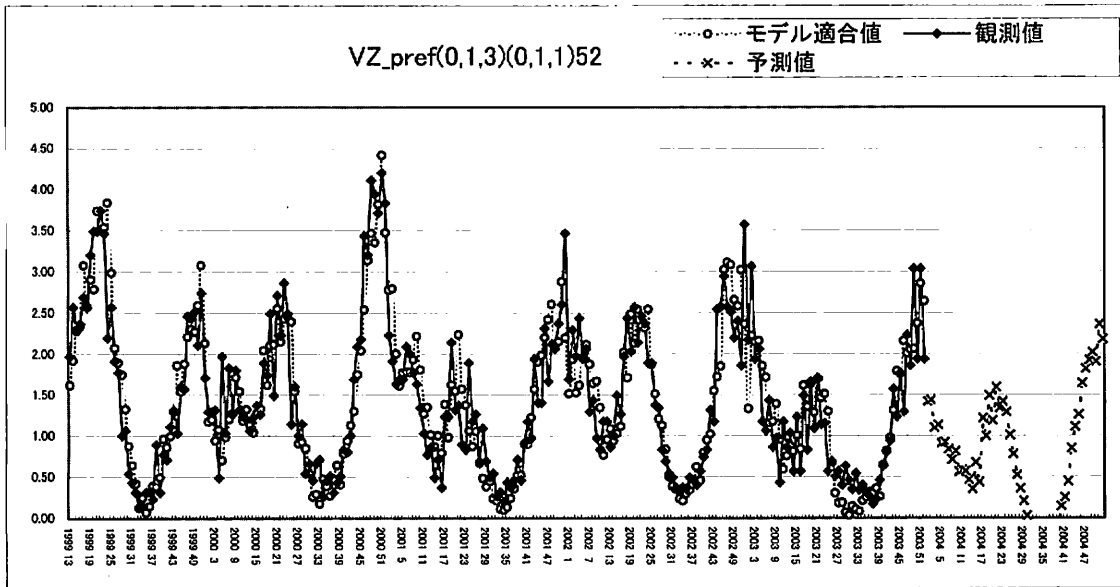


図4-1 ピリオドグラム (手足口病)

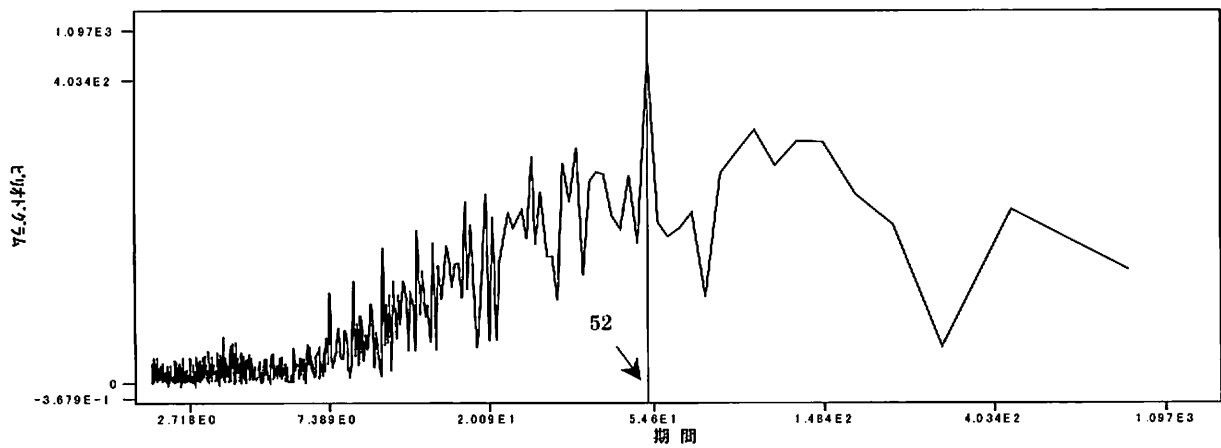


图 4-2 ACF (手足口病)

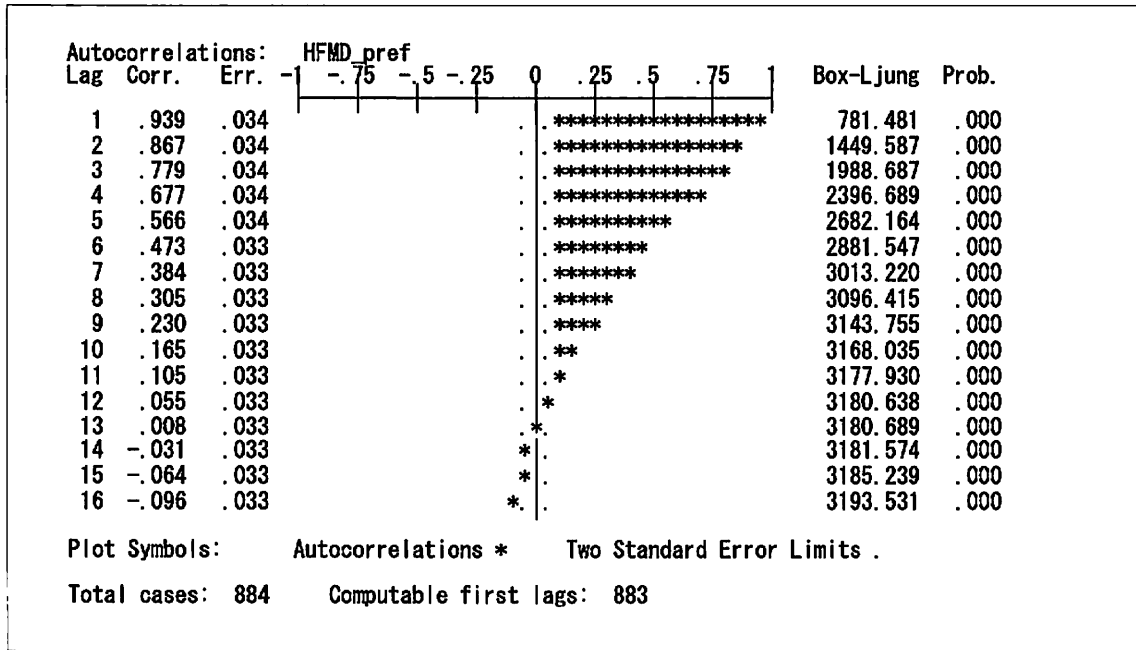


图 4-3 PACF (水痘)

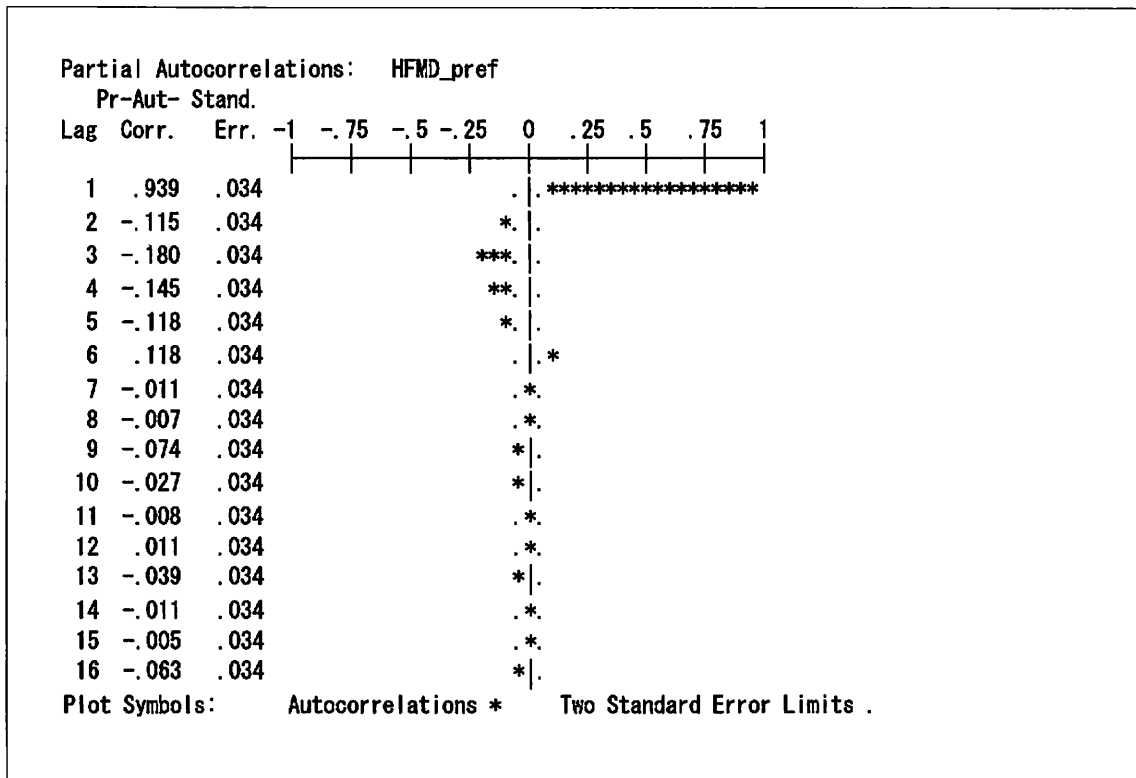


図 4 - 4 非季節階差 1 の ACF (手足口病)

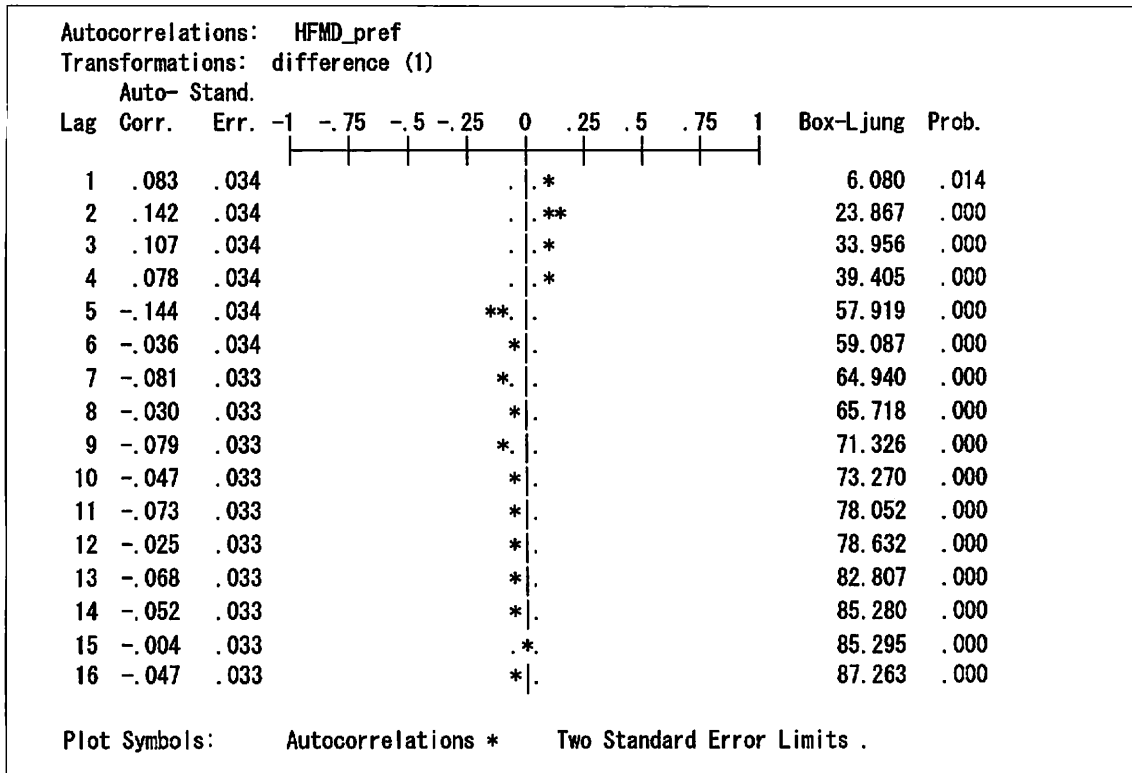


図 4 - 5 非季節階差 1 の PACF (手足口病)

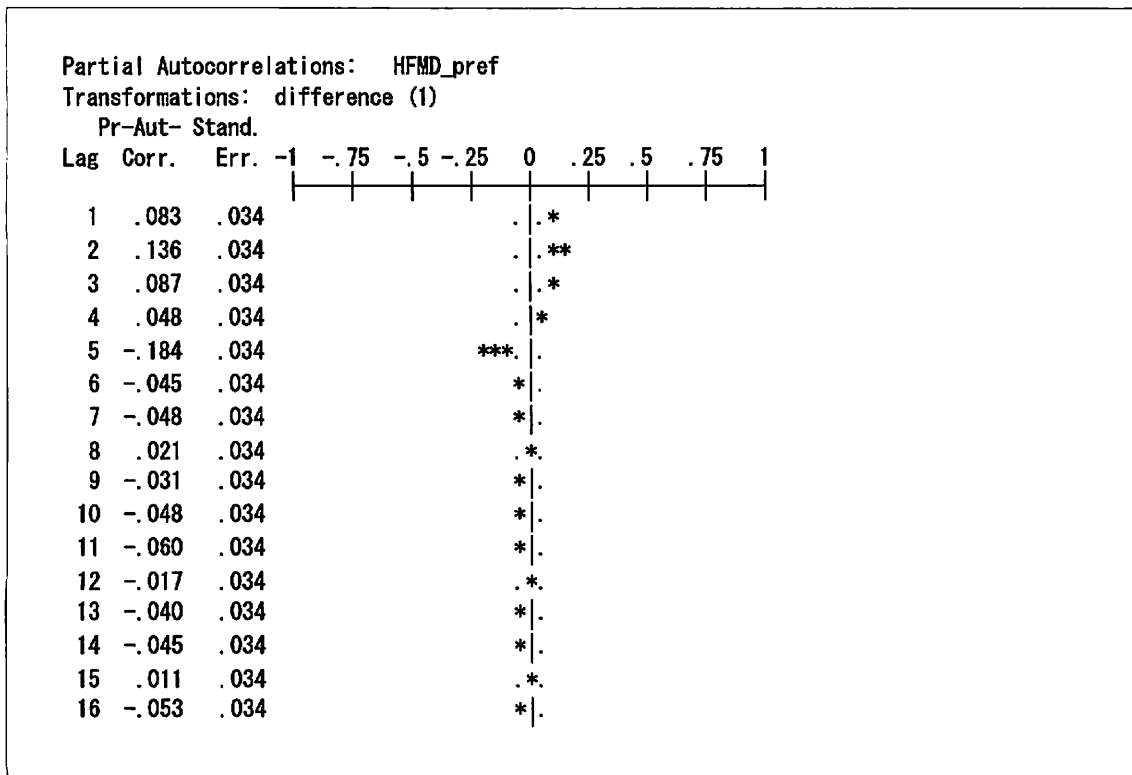


表 4 - 1 モデル同定結果 (手足口病)

FINAL PARAMETERS:				
Number of residuals	883			
Standard error	.59527985			
Log likelihood	-798.38556			
AIC	1610.7711			
SBC	1644.2544			
Analysis of Variance:				
	DF	Adj. Sum of Squares	Residual Variance	
Residuals	876	315.37577	.35435810	
Variables in the Model:				
	B	SEB	T-RATIO	APPROX. PROB.
MA1	-.01926268	.03359789	-.573330	.56656844
MA2	-.12455443	.03331523	-3.738664	.00019701
MA3	-.12993941	.03328329	-3.904044	.00010186
MA4	-.09661151	.03328288	-2.902739	.00379195
MA5	.12159693	.03343723	3.636573	.00029242
SAR1	.98174045	.04682565	20.965868	.00000000
SMA1	.94455053	.08355490	11.304550	.00000000

図 4 - 6 モデル診断結果 (手足口病)

ARIMA (0,1,5) (1,0,1)52の残差 ACF													
Autocorrelations:													
	Auto-	Stand.											
Lag	Corr.	Err.	-1	-.75	-.5	-.25	0	.25	.5	.75	1	Box-Ljung	Prob.
1	.002	.034					*					.005	.946
2	.006	.034					*					.035	.982
3	-.004	.034					*					.049	.997
4	-.006	.034					*					.080	.999
5	-.016	.034					*					.313	.997
6	-.021	.034					*					.713	.994
7	-.070	.033					*					5.117	.646
8	-.025	.033					*					5.657	.686
9	-.066	.033					*					9.568	.387
10	-.019	.033					*					9.876	.451
11	-.059	.033					*					13.012	.293
12	-.013	.033					*					13.162	.357
13	-.051	.033					*					15.459	.280
14	-.039	.033					*					16.834	.265
15	.018	.033					*					17.130	.311
16	-.032	.033					*					18.054	.321

図4-7 観測値とモデル適合値のグラフ表示(手足口病)

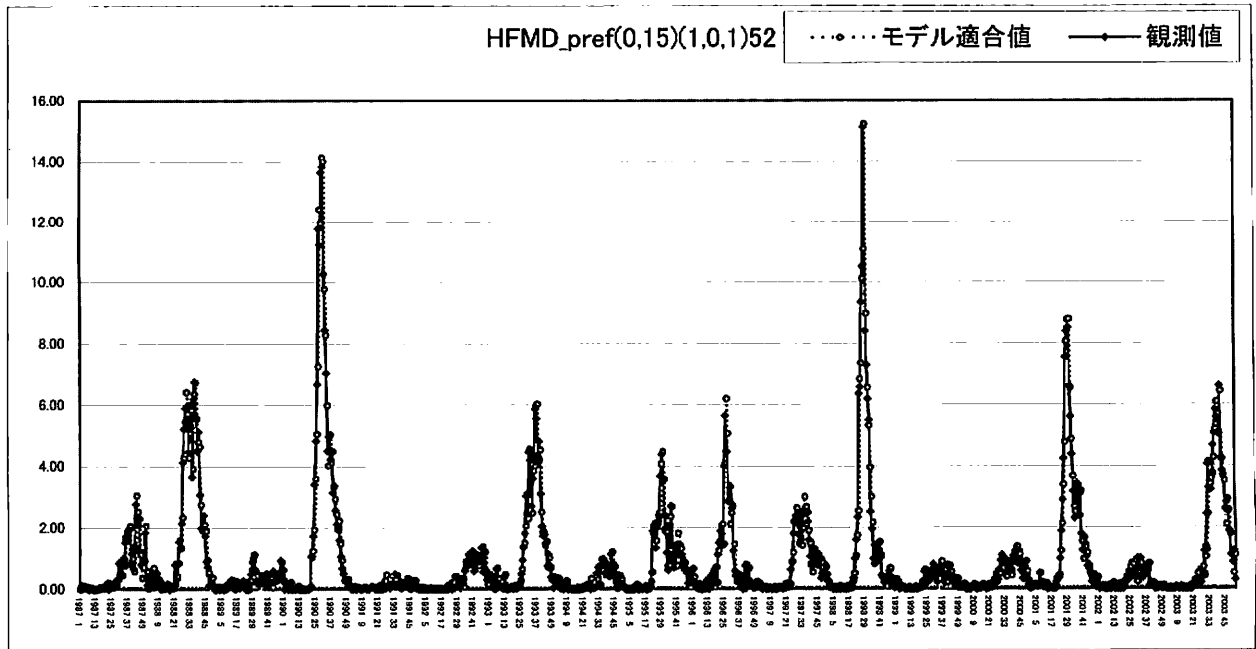


図4-8 観測値・モデル適合値・52週先までの予測値(手足口病)

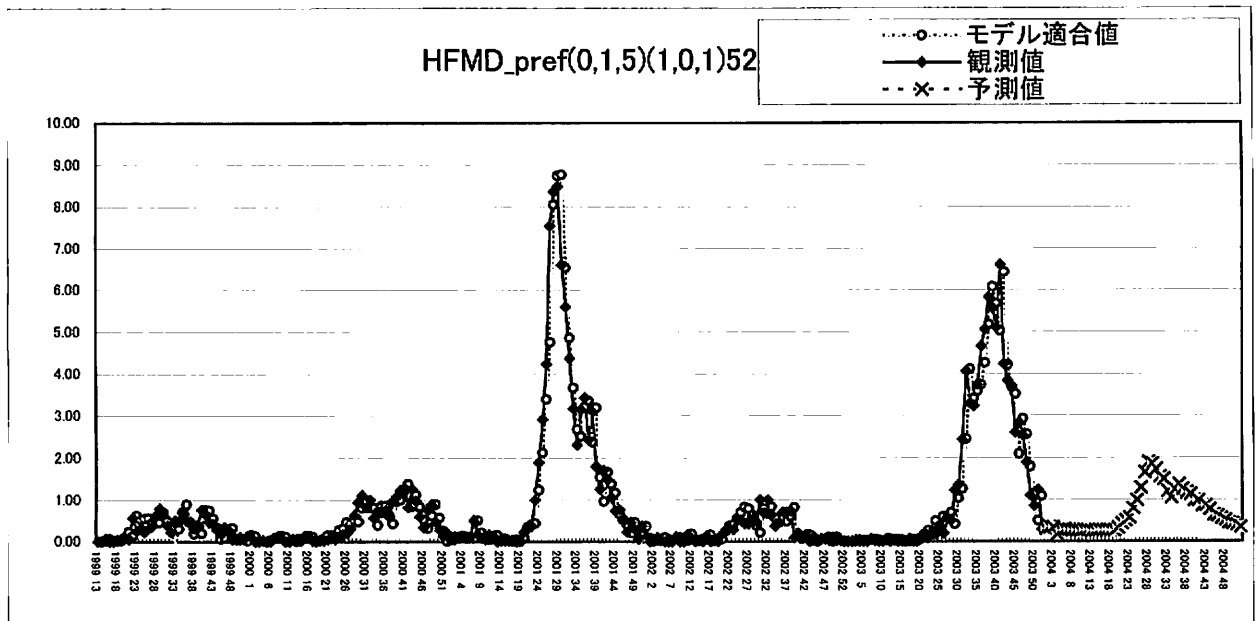


図 5 - 1 ピリオドグラム (流行性耳下腺炎)

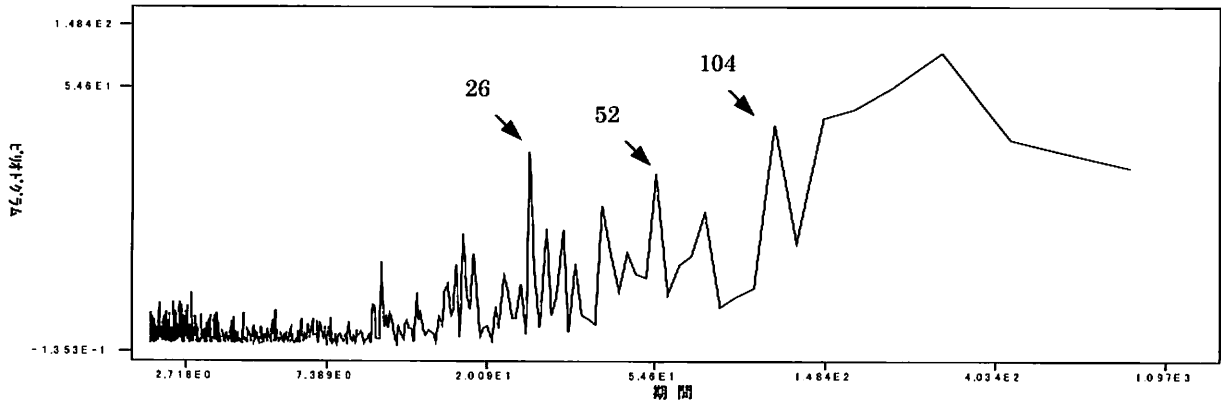


図 5 - 2 ACF (流行性耳下腺炎)

Lag	Corr.	Err.	-1	-.75	-.5	-.25	0	.25	.5	.75	1	Box-Ljung	Prob.
1	.817	.034						*****				592.430	.000
2	.825	.034						*****				1197.196	.000
3	.785	.034						*****				1744.746	.000
4	.719	.034						*****				2204.253	.000
5	.703	.034						*****				2644.698	.000
6	.647	.033						*****				3018.076	.000
7	.615	.033						*****				3355.602	.000
8	.583	.033						*****				3659.580	.000
9	.552	.033						*****				3932.811	.000
10	.537	.033						*****				4190.838	.000
11	.515	.033						*****				4429.201	.000
12	.491	.033						*****				4645.600	.000
13	.485	.033						*****				4857.083	.000
14	.470	.033						*****				5055.571	.000
15	.453	.033						*****				5240.438	.000
16	.446	.033						*****				5419.979	.000

Plot Symbols: Autocorrelations * Two Standard Error Limits .

図 5 - 3 P A C F (流行性耳下腺炎)

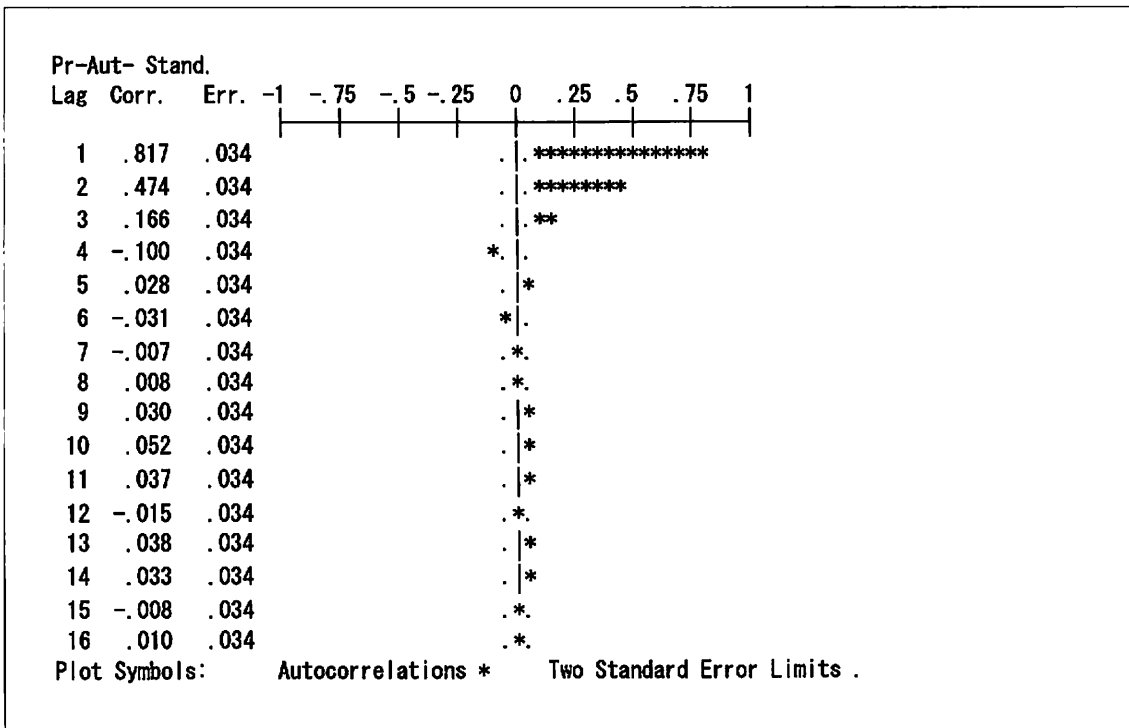


図 5 - 4 非季節性階差 1 周期26の A C F (流行性耳下腺炎)

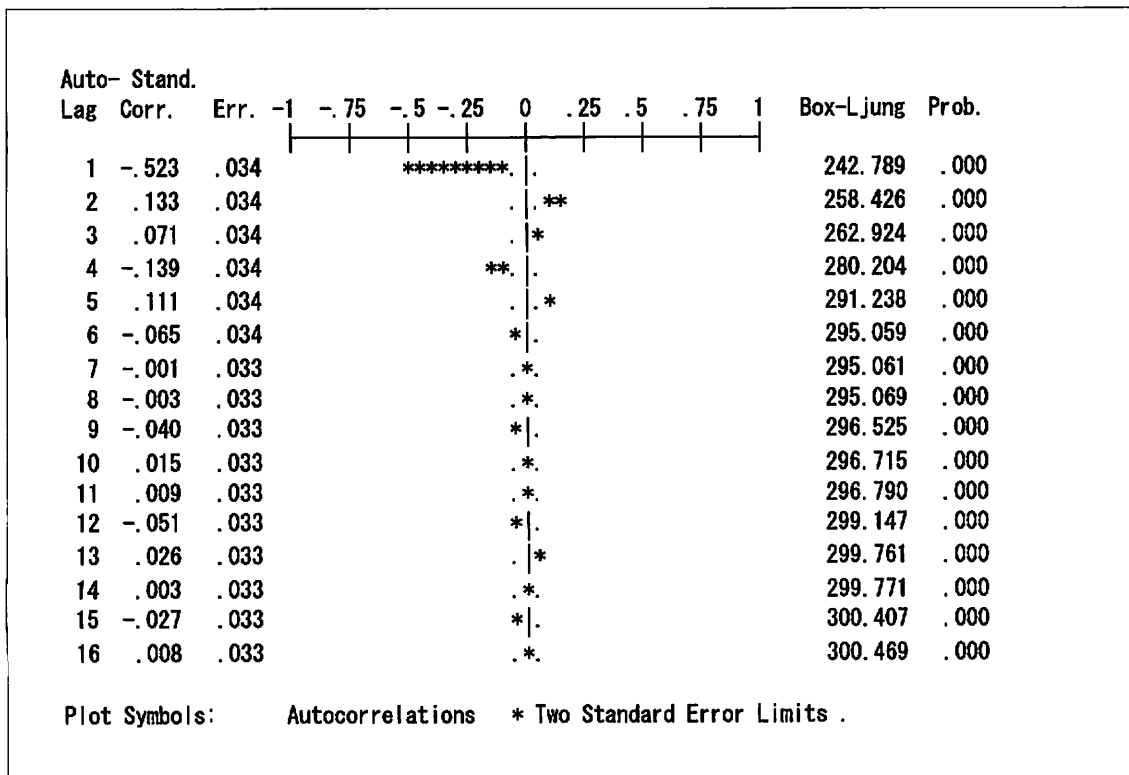


図5-5 非季節性階差1周期26のPACF (流行性耳下腺炎)

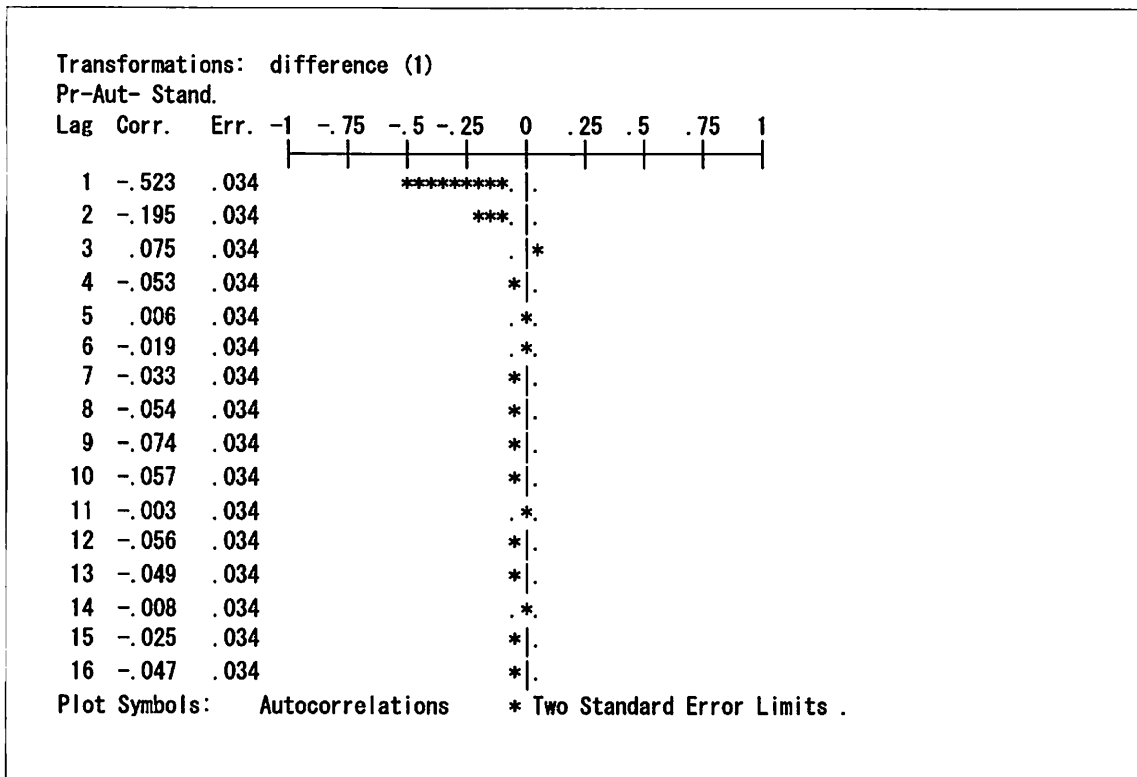


図5-6 非季節性階差1周期52のACF (流行性耳下腺炎)

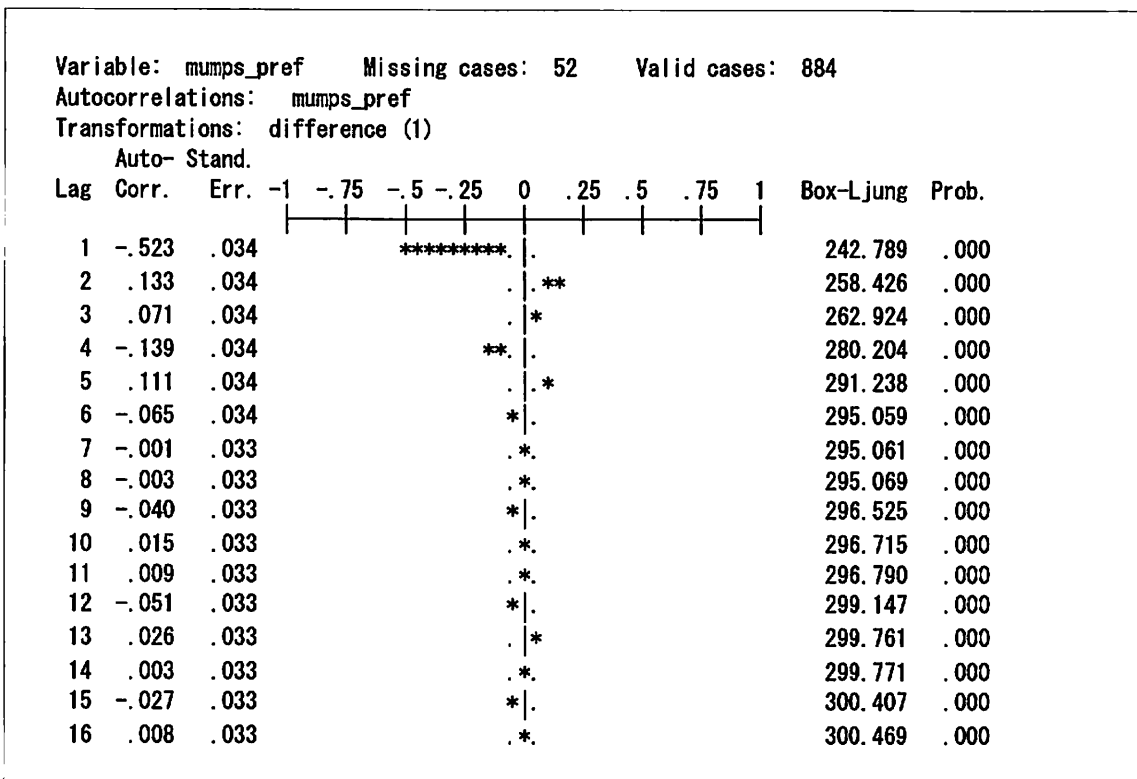


図 5 - 7 非季節性階差 1 周期52の P A C F (流行性耳下腺炎)

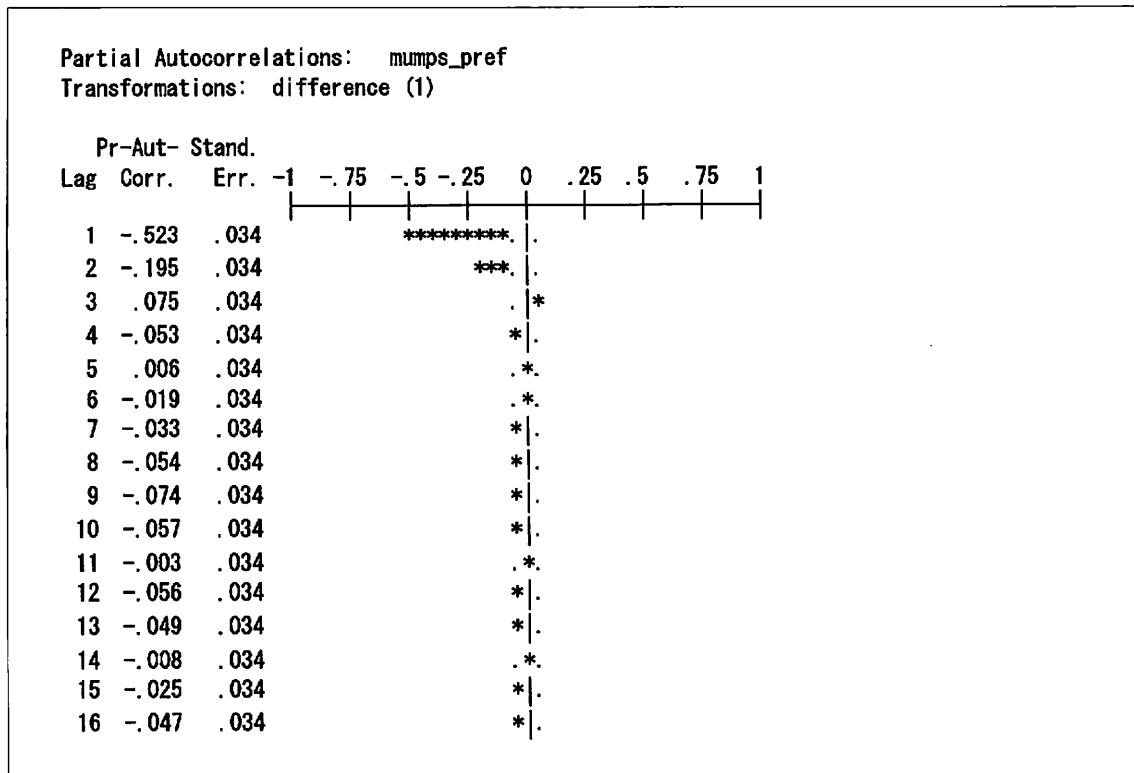


表 5 - 1 モデル同定：周期26 (流行性耳下腺炎)

Split group number: 1 Series length: 884
 Melard's algorithm will be used for estimation.

FINAL PARAMETERS:

Number of residuals	883
Standard error	.36467419
Log likelihood	-363.65251
AIC	739.30503
SBC	768.00498

Analysis of Variance:

	DF	Adj. Sum of Squares	Residual Variance
Residuals	877	117.81526	.13298727

Variables in the Model:

	B	SEB	T-RATIO	APPROX. PROB.
AR1	-1.0035574	.12134360	-8.270378	.00000000
AR2	-.3989905	.06263812	-6.369772	.00000000
MA1	-.3795880	.12989946	-2.922168	.00356531
SAR1	.9914737	.03703749	26.769459	.00000000
SMA1	.9705506	.07091077	13.686928	.00000000
CONSTANT	-.0008287	.01098039	-.075471	.93985757

表 5 - 2 モデル同定：周期52（流行性耳下腺炎）

Split group number: 1 Series length: 884
 Number of cases skipped at end because of missing values: 52
 Melard's algorithm will be used for estimation.

FINAL PARAMETERS:

Number of residuals 883
 Standard error .36183128
 Log likelihood -358.53066
 AIC 729.06131
 SBC 757.76126

Analysis of Variance:

	DF	Adj. Sum of Squares	Residual Variance
Residuals	877	116.45388	.13092187

Variables in the Model:

	B	SEB	T-RATIO	APPROX. PROB.
AR1	-.95906069	.12235447	-7.838379	.00000000
AR2	-.38261036	.06500084	-5.886237	.00000000
MA1	-.31718173	.13077000	-2.425493	.01548851
SAR1	.96894276	.05828986	16.622835	.00000000
SMA1	.91732200	.09223888	9.945069	.00000000
CONSTANT	-.00099128	.01046143	-.094756	.92453068

表 5 - 3 モデル同定：周期104（流行性耳下腺炎）

Split group number: 1 Series length: 884
 Melard's algorithm will be used for estimation.

FINAL PARAMETERS:

Number of residuals 883
 Standard error .3681176
 Log likelihood -368.54866
 AIC 749.09732
 SBC 777.79727

Analysis of Variance:

	DF	Adj. Sum of Squares	Residual Variance
Residuals	877	119.12856	.13551057

Variables in the Model:

	B	SEB	T-RATIO	APPROX. PROB.
AR1	-1.0444064	.11962348	-8.7307814	.00000000
AR2	-.4122545	.05941290	-6.9388042	.00000000
MA1	-.4441338	.12815151	-3.4656929	.00055453
SAR1	-.7167929	.34140350	-2.0995477	.03605388
SMA1	-.7738868	.32380577	-2.3899724	.01705987
CONSTANT	-.0008824	.00751205	-.1174621	.90652077

図5-8 モデル診断結果 (流行性耳下腺炎)

ARIMA (2, 1, 1) (1, 0, 1)52の残差ACF

Auto- Stand.

Lag	Corr.	Err.	-1	- .75	- .5	- .25	0	.25	.5	.75	1	Box-Ljung	Prob.
1	-.005	.034					.*					.020	.887
2	-.020	.034					.*					.372	.830
3	-.026	.034					*					.971	.808
4	-.013	.034					.*					1.117	.892
5	-.008	.034					.*					1.180	.947
6	-.033	.034					*					2.137	.907
7	-.028	.033					*					2.854	.898
8	-.054	.033					*					5.483	.705
9	-.050	.033					*					7.747	.560
10	-.015	.033					.*					7.960	.633
11	-.021	.033					.*					8.371	.680
12	-.053	.033					*					10.906	.537
13	.018	.033					.*					11.193	.595
14	.015	.033					.*					11.406	.654
15	-.026	.033					*					12.004	.679
16	-.013	.033					.*					12.145	.734

Plot Symbols: Autocorrelations * Two Standard Error Limits .

図5-9 観測値とモデル適合値のグラフ (流行性耳下腺炎)

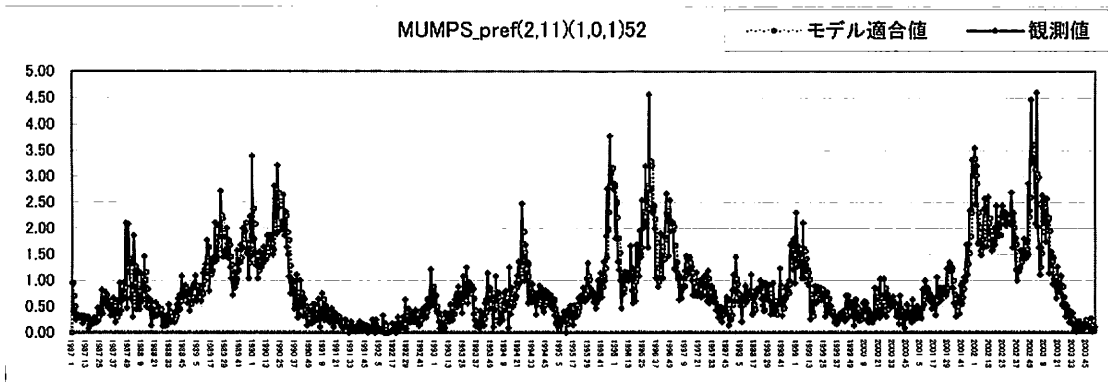
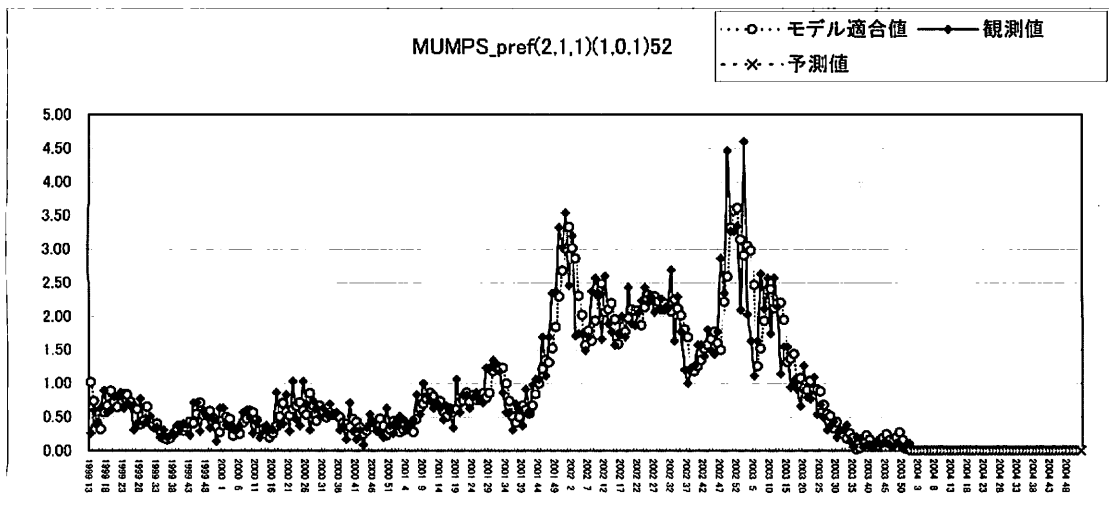


図5-10 観測値とモデル適合値及び52週先までの予測値 (流行性耳下腺炎)



腸管出血性大腸菌（EHEC）の感染疫学解明に関する調査研究

八柳 潤 齊藤志保子 今野 貴之

2001年から2003年にかけて市販輸入牛肉、県内でと殺されている牛のヒト型 EHEC 汚染・保菌実態を調査し、ヒト由来株と牛由来株の分子疫学的性状を比較した。県内でと殺されている牛や畜産農家における飼育牛がヒト型 EHEC を保菌していること、及び市販食肉がヒト型 EHEC により汚染されている事実が明らかとなった。また、感染源全体に占める割合は小さいと考えられるものの、飼育牛自体も県内における EHEC 感染事例における感染源としての意義を持つものと考えられた。O121、O91、O157、O111抗原特異検出用 PCR を導入し、O26、O103抗原特異検出用 PCR の開発に着手した。これらの PCR は、今後、県内における EHEC 感染者の診断精度の向上と感染源調査の迅速化・精度向上に大きく寄与すると考えられた。本研究により県内における EHEC 感染源の多様性が示され、県内における EHEC の感染源対策を構築する際には、この感染源の多様性を考慮する必要があるものと考えられた。

キーワード：腸管出血性大腸菌、飼育牛、市販輸入牛肉、*eaeA*、*saa*、PFGE

I はじめに

腸管出血性大腸菌（EHEC）はベロ毒素（VT）を産生する大腸菌であり、ヒトに下痢、激しい腹痛、出血性大腸炎を、また、時に致命的となる溶血性尿毒症症候群（HUS）をも惹起する。EHEC には多彩な血清型が報告されているが、患者からの分離例が特に多い血清型は O157:H7 である。EHEC O157:H7 は 1996 年に全国的に食中毒を惹起して大きな社会問題となった。秋田県においては、1991 年に初めて EHEC O157:H7 による感染者が確認された¹⁾。その後、今日まで 15 年が経過したが、この間、1996 年に EHEC 感染症が指定伝染病となり、EHEC 感染症の感染源、家族内感染の有無などが詳細に調査される体制が整った。また、給食従事者の定期検便が法制化され、その検査対象が VT 産生菌すべてとされたことにより、秋田県総合保健事業団に VT を対象としたスクリーニング検査体制が構築された。さらに、秋田県においては 1996 年にパルスフィールド電気泳動（PFGE）による EHEC 分離株の分子疫学的性状の比較を実施可能な体制が確立され、また、市販の型別用血清では型別できない EHEC の血清型を決定するために、国際大腸菌型別センターとのコンタクトも確保した。EHEC の分離同定技術もこの間、大幅に改良されており、EHEC の検査技術は 1991 年当時と比較して長足の進歩を遂げたといえる。

EHEC 感染症対策がこのように充実してきたことにより、この 15 年間で秋田県における EHEC 感染症の発生状況、HUS 患者の発生状況、O157 以外の EHEC 感染症発生状況、給食従事者の EHEC 感染状況などは次第に明らかになってきた。しかしながら、EHEC の感

染源に関する知見は EHEC 感染症対策においてとりわけ重要であるにもかかわらず、ほとんど集積されていないのが現状である。実際、秋田県で 15 年間に発生した EHEC 感染事例のなかで、感染源が判明した事例は極めて少ない。牛は EHEC を腸管内に保菌していることから、EHEC 感染症の感染源として重要であると考えられている²⁾。しかし、県内の肉牛の EHEC 保菌率や県内で発生する EHEC 感染事例に牛が実際にどの程度関与しているかについては、これまで全く明らかにされていない。さらに、県内で市販されている輸入牛肉の EHEC 汚染実態、及び感染源としての意義を示す具体的データも得られていない。従って、EHEC 感染源対策に関する科学的根拠は乏しい。

ヒトから分離される EHEC は腸管定着因子と考えられる *eaeA* 遺伝子³⁾、あるいは *saa* 遺伝子⁴⁾ を保有しているのに対して、牛から分離される株の大半はこれらの遺伝子を保有せずこれらの株のヒトに対する病原性には議論がある。このため、EHEC 感染源の解明を試みる場合、*eaeA* あるいは *saa* 遺伝子を保有する、「ヒト型 EHEC」の存在を指標とする必要がある。

本研究は、2001 年から 2003 年に市販輸入牛肉、県内でと殺されている牛のヒト型 EHEC 汚染・保菌実態を解明するとともに、ヒト由来株と牛由来株の分子疫学的性状を比較検討することにより、県内における EHEC 感染症の感染源としての意義を明らかにすることを目的として実施した。

II 方 法

1. 牛便からのヒト型 EHEC の分離

1) 供試検体

秋田県中央食肉衛生検査所の多大な協力により、と殺された牛の直腸便の提供を受けた。検体数は2001年：126検体、2002年：150検体、2003年：176検体、合計452検体であった。

2) ヒト型 EHEC 分離方法

ヒト型 EHEC 分離・同定方法の概要は図1のとおりである。

2. 市販食肉からのヒト型 EHEC の分離

1) 供試検体

小売店で購入した牛肉、計341検体を供試した。その内訳は表1のとおりである。

2) ヒト型 EHEC 分離方法

牛便からのヒト型 EHEC 分離方法に準じた。検体量は25 g、Buffered Peptone Water (BPW) 量は225 mlとした。

3. 分離株の分子疫学的性状比較

1) 供試菌株

2002年に分離された EHEC O157牛由来株5株とヒト由来株9株(図2)、2003年に分離された EHEC O157牛由来株2株とヒト由来株5株(図3)、及び EHEC O103牛由来株2株とヒト由来株3株(図4)を供試した。

2) 分子疫学的性状比較

分離株の分子疫学的性状比較は、国立感染症研究所が示した環太平洋パルスネット用のプロトコールに従い、パルスフィールド電気泳動により行った。得られたパターンのクラスター解析と系統樹作成には Fingerprinting II ソフトウェアを使用した。

4. 牛が感染源と考えられた EHEC 感染事例、その他特記すべき事例の解析

2003年5月29日に本荘保健所管内で発生した畜産農家の EHEC O26 散発感染事例において、飼育牛7頭の糞便、飲用水2検体を対象として感染源調査を実施した。また、6月24日に秋田市保健所管内で発生した焼肉店を原因施設とする EHEC O157 食中毒事例について、患者・保菌者由来株の PFGE パターンを比較した。

図1 牛便からのヒト型 EHEC 分離方法

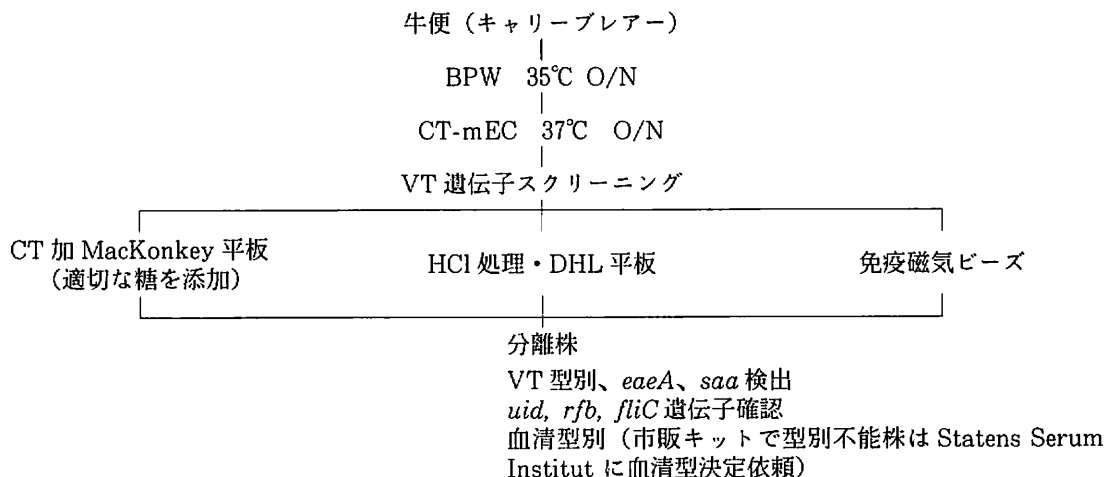
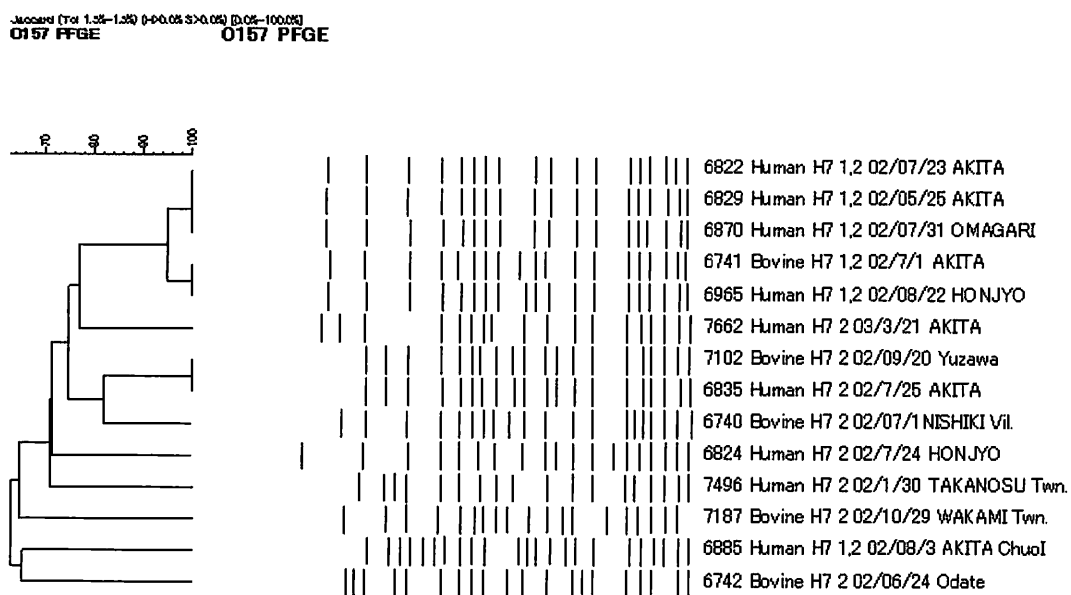


表1 EHEC 検索に供した市販牛肉一覧

年	検 体 数				計
	USA	オーストラリア	外国(不明)	国産	
2001	46	6	3	—	55
2002	41	18	—	18	77
2003	77	51	45	36	209
計	164	75	48	54	341

図2 ヒト、および牛由来 EHEC O157 分子疫学解析結果と供試株一覧 (2002年)



菌株番号	血清型	VT型	検体受領年月日	由来	管轄保健所・産地
6741	O157 : H7	VT-1&2	2002/7/1	牛	秋田市
6822	O157 : H7	VT-1&2	2002/7/23	散発	秋田市
6829	O157 : H7	VT-1&2	2002/5/25	散発	秋田市
6870	O157 : H7	VT-1&2	2002/7/31	散発	大曲
6885	O157 : H7	VT-1&2	2002/8/3	散発	秋田中央
6965	O157 : H7	VT-1&2	2002/8/22	家族内	本荘
6740	O157 : H7	VT-2	2002/7/1	牛	西木村
6742	O157 : H7	VT-2	2002/6/24	牛	大館
7102	O157 : H7	VT-2	2002/9/20	牛	湯沢
7187	O157 : H7	VT-2	2002/10/29	牛	若美町
6824	O157 : H7	VT-2	2002/7/24	家族内	本荘
6835	O157 : H7	VT-2	2002/7/25	散発	秋田市
7496	O157 : H7	VT-2	2003/1/30	業態者	鷹巣
7662	O157 : H7	VT-2	2003/3/21	散発	秋田市

5. EHEC の同定に係る検査技術の導入・開発

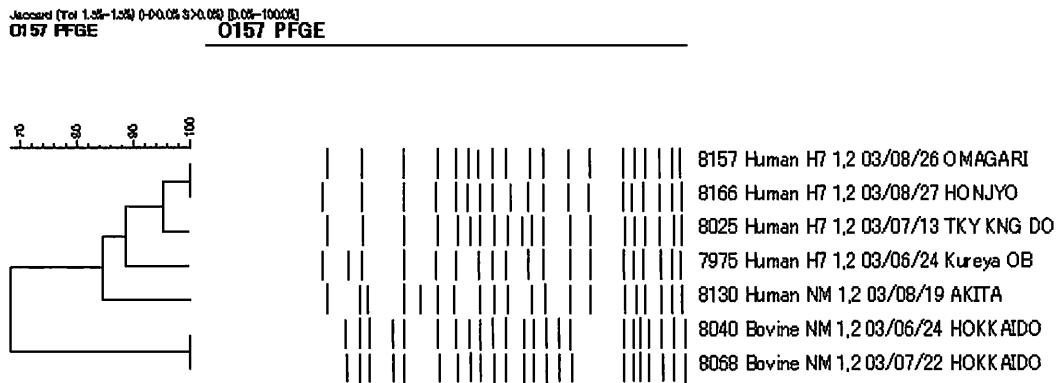
1) O 抗原合成遺伝子群を標的とした O 抗原特異検出 PCR

秋田県で散発患者からの検出頻度が高い EHEC O157⁵⁾、O26、O121⁶⁾、O91⁷⁾、O111⁸⁾ の分離・同定の効率化と高精度化、及び血清型別検査精度の向上を目的として、O 抗原合成遺伝子群を標的とした O 抗原特異検出 PCR を導入した。

2) 2001年に報告された EHEC の付着因子 *saa* (STEC autoagglutinating adhesin) 遺伝子検出用 PCR の導入

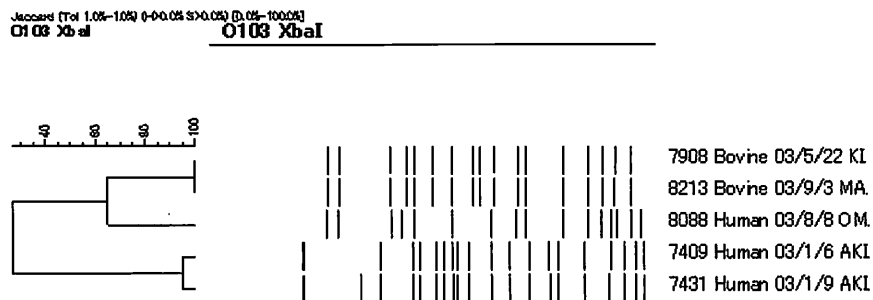
HUS 患者から分離され、既知付着遺伝子を保有しない EHEC O113 : H21 から新たな腸管付着因子として同定された *saa* 遺伝子の同定用 PCR⁴⁾ を導入した。

図3 ヒト、および牛由来 EHEC O157分子疫学解析結果と供試株一覧（2003年）



菌株番号	血清型	VT型	検体受領年月日	由来	管轄保健所・産地
8040	O157 : NM	VT-1, 2	2003/6/24	牛	北海道
8068	O157 : NM	VT-1, 2	2003/7/22	牛	北海道
8130	O157 : NM	VT-1, 2	2003/8/19	散発	秋田市
7975	O157 : H7	VT-1, 2	2003/6/24	集団	大館・秋田市
8025	O157 : H7	VT-1, 2	2003/7/13	集団	秋田市
8157	O157 : H7	VT-1, 2	2003/8/26	家族内	大曲
8166	O157 : H7	VT-1, 2	2003/8/27	散発	本荘

図4 ヒト、および牛由来 EHEC O103分子疫学解析結果と供試株一覧（2003年）



菌株番号	血清型	VT型	検体受領年月日	由来	管轄保健所・産地
7908	O103	VT-1	2003/5/22	牛	北海道
8213	O103	VT-1	2003/9/3	牛	増田町
7409	O103	VT-1	2003/1/6	散発	秋田市
7431	O103	VT-1	2003/1/9	業態者	秋田市
8088	O103	VT-1	2003/8/8	業態者	大曲

Ⅲ 結 果

1. 牛便からのヒト型 EHEC の分離

秋田県中央食肉衛生検査所の協力により提供を受けた牛の直腸便、合計452検体から分離されたヒト型 EHEC の一覧を表2に示した。2001年の検討では大雄村産牛1頭から EHEC O26 VT-1が1株分離されたが、EHEC O157、他のヒト型株は分離されなかった。2002年には県内各地産の牛5頭から EHEC O157：H7が分離され、また、北海道産牛2頭から付着遺伝子として *saa* を保有する EHEC O178：H19が分離された。2003年には北海道産牛2頭から EHEC O157、北海道産牛と増田町産牛各1頭から EHEC O103 VT-1、北海道産牛各1頭から EHEC O165 VT-1&2、EHEC O156：H25 VT-1、そして *saa* 遺伝子を保有する O113 VT-2が分離された。これらのうち、県内でヒトから分離例がある血清型は、O26、O157：H7、O103、O156：H25である。ただし、

O156：H25は無症状保菌者からのみの分離である。なお、O165は大阪で HUS 患者から分離されている EHEC の血清型であり、O113はオーストラリアで HUS 患者からの分離報告がある血清型である。一方、O178：H19は県内においてヒトからの分離報告がなく、国内においても分離例がほとんど無い血清型である。今回、EHEC O157：H7の保菌率は0.4%であった。以上の結果は、県内で食肉生産のためにと殺されている牛が実際にヒト型 EHEC を保菌していることを示していた。

2. 市販食肉からのヒト型 EHEC の分離

市販牛肉から分離されたヒト型 EHEC、及び VTEC の一覧を表3に示した。341検体のうち、2002年に検討したオーストラリア産牛肉の1検体から *saa* 遺伝子を保有するヒト型株である EHEC O113：H21 VT-2+が分離された。しかし、今回検討した範囲では EHEC O157、EHEC O26など、*eaeA* 遺伝子を保有し、県内で

表2 県内のと殺牛の直腸便から分離されたヒト型 EHEC 分離株一覧 (2001-2003年)

受領年月日	血清型	VT 型	付着遺伝子	産地	菌株番号
2001/7/13	O26	VT-1	<i>eaeA</i>	大雄村	EC5337
2002/7/1	O157：H7	VT-1&2	<i>eaeA</i>	秋田市	EC6741
2002/7/1	O157：H7	VT-2	<i>eaeA</i>	西木村	EC6740
2002/6/24	O157：H7	VT-2	<i>eaeA</i>	大館市	EC6742
2002/9/20	O157：H7	VT-2	<i>eaeA</i>	湯沢	EC7102
2002/10/29	O157：H7	VT-2	<i>eaeA</i>	若美町	EC7187
2002/10/29	O178：H19	VT-1&2	<i>saa</i>	北海道	EC7188
2002/11/12	O178：H19	VT-1&2	<i>saa</i>	北海道	EC7242
2003/5/21	O113	VT-2	<i>saa</i>	北海道	EC7907
2003/5/21	O103	VT-1	<i>eaeA</i>	北海道	EC7908
2003/6/24	O165	VT-1&2	<i>eaeA</i>	北海道	EC8042
2003/6/24	O157：H7	VT-1&2	<i>eaeA</i>	北海道	EC8040
2003/7/22	O157：NM	VT-1&2	<i>eaeA</i>	北海道	EC8068
2003/9/3	O103	VT-1	<i>eaeA</i>	増田町	EC8213
2003/11/25	O156:H25	VT-1	<i>eaeA</i>	北海道	EC8359

表3 市販牛肉から分離された EHEC/VTEC 分離株一覧 (2001-2003年)

購入年月日	菌種	血清型	VT型	付着遺伝子	由来	菌株番号
2002/11/5	EHEC	O113：H21	VT-2	<i>saa</i>	オーストサイコロステーキ	EC7206
2003/11/4	VTEC	O2：H25	VT-2	-	牛ホルモン	EC8304
2003/11/4	VTEC	O2：H25	VT-2	-	牛ホルモン	EC8305
2003/12/1	VTEC	O168：H8	VT-2	-	牛ホルモン	EC8360
2003/12/8	VTEC	Out	VT-2	-	牛ホルモン	EC8400

散発患者から高頻度に分離される血清型の EHEC は検出されなかった。一方、冷凍牛ホルモンは購入したロットのほとんどすべてが米国産であり、VT 遺伝子保有株が比較的高頻度に検出されたが、分離株はすべて *eaeA*、*saa* 遺伝子のいずれをも保有せず、ヒト型 EHEC とは遺伝子型が異なっていた。これらの株はヒト型 EHEC と区別して VTEC と呼称することとした。

3. 分離株の分子疫学的性状比較

図 2 に 2002 年に分離された EHEC O157 牛由来株 5 株とヒト由来株 9 株の PFGE パターン比較結果を系統樹として示した。2002 年 7 月 1 日に秋田市産牛から分離された EHEC O157 : H7 VT-1&2+ 6741 株と 2002 年 8 月 22 日に本荘保健所管内で発生した家族内感染事例から分離された EHEC O157 : H7 VT-1&2+ 6965 株が同一パターンを示し、2002 年 9 月 20 日に湯沢産牛から分離された EHEC O157 : H7 VT-2+ 7102 株と 2002 年 7 月 25 日に秋田市保健所管内で発生した散発患者から分離された EHEC O157 : H7 VT-2+ 6835 株が同一パターンを示した。また、ヒト由来株のうち 2002 年 5 月 25 日に秋田市保健所管内で発生した散発患者、7 月 23 日に秋田市保健所管内で発生した散発患者、2002 年 7 月 31 日に大曲保健所管内で発生した散発患者から分離された EHEC O157 : H7 VT-1&2+ 6829 株、6822 株、及び 6870 株のパターンが同一であった。なお、これら 3 株のパターンと 6741 / 6965 株のパターンの相同性が 94% であり、これらの 5 株が同一起源に由来する株のグループに属すると考えられた。その他の株のパターンの相同性は最大でも 82% であった。

一方、図 3 に示すとおり、2003 年に分離された EHEC O157 の患者由来株と牛由来株に同一パターンを示す株は認められなかった。また、図 4 に示すように、EHEC O103 のヒト由来株と牛由来株にも同一パターンを示す株は認められなかった。

4. 牛が感染源と考えられた EHEC 感染事例、その他特記すべき事例の解析

事例 1 : 2003 年 5 月 29 日に本荘保健所管内で発生した畜産農家の EHEC O26 散発感染事例

本荘保健所管内在住の 60 代女性が 2003 年 5 月 29 日に EHEC O26 VT-1+, *eaeA*+ に感染していることが判明した。感染源調査として、飲用水 2 検体、飼育牛 7 頭の糞便を採取して EHEC の検索を実施した。その結果、飲用水はいずれも EHEC 陰性であったが、飼育牛 7 頭のうち下痢症状を示していた子牛の糞便 1 検体から EHEC O26 VT-1+, *eaeA*+ が分離された。患者由来株と子牛由来株の PFGE パターンを比較した結果、両者のパターンが同一であることが明らかとなった。以上の結果から、本事例は飼育牛を感染源とする EHEC O26

VT-1+, *eaeA*+ 散発感染事例であると考えられた。

事例 2 : 2003 年 6 月 24 日に秋田市保健所管内で発生した、焼肉店を原因施設とする EHEC O157 : H7 食中毒事例

大館保健所管内、秋田中央保健所管内、秋田市保健所管内に在住する患者、計 4 名が 2003 年 6 月に相次いで EHEC O157 : H7 VT-1&2+ に感染していることが判明した。患者の行動調査結果から、患者がいずれも秋田市内にある某焼肉店を利用していたことが判明した。患者の家族や患者と共通行動をとっていた知人などを調査した結果、2 名の無症状保菌者が確認された。分離された 6 株の EHEC O157 : H7 VT-1&2+ の PFGE パターンがすべて同一であったことから、これらの患者・保菌者はいずれも同一の感染源に由来する EHEC O157 : H7 VT-1&2+ に感染していることが明らかとなり、感染者の行動調査結果と併せて、共通利用施設である某焼肉店が本事例の原因施設と考えられた。

5. EHEC の同定に係る検査技術の導入・開発

1) O 抗原合成遺伝子群を標的とした O 抗原特異検出 PCR

既報に従い、O157⁵⁾、O26、O121⁶⁾、O91⁷⁾、O111⁸⁾ 抗原の特異検出用 PCR 法を導入し、県内でこれまでに分離された株や血清型参照株を使用して文献に記載されたとおりの結果が実際に得られることを確認した。一方、O26 については GenBank に報告されている O26 抗原合成遺伝子群 (accession no. AF529080) のうち、O-Antigen polymerase 遺伝子 (*wzy* 遺伝子) 領域にプライマーを設計し、県内分離株を使用して O26 抗原保有大腸菌が設計とおりの陽性反応を示すことを確認した。この PCR 系については検査精度の更なる検討が今後の課題である。また、O103 については O 抗原合成遺伝子群の塩基配列が報告されていなかったためにその解読を試み、約 12Kb におよぶ O103 抗原合成遺伝子群の塩基配列の解読に成功した。

2) *saa* (STEC autoagglutinating adhesin) 遺伝子検出用 PCR の導入

Paton らが報告¹⁾した *saa* 遺伝子検出用 PCR を導入した。1991 年以降に県内で散発患者から分離された EHEC のほとんどすべてが *eaeA* 遺伝子を保有しているが、1997 年に本荘保健所管内で発生した家族内感染事例において、比較的重篤な症状を示した患者から分離された EHEC O150 : H8 VT-2+ は *eaeA* を保有していなかった。この株について *saa* 遺伝子の有無を検討した結果、この株は *saa* を保有することが明らかとなった。本研究においても牛便、及び牛肉由来 VT 遺伝子保有株について *eaeA* と共に *saa* 遺伝子の保有の有無を検討した。

IV 考 察

秋田県では1998年以降、年間約40事例の EHEC 感染事例が発生しているが、これまでに感染源や原因施設が特定された事例は極めて少ない。1989年の Karmali の総説²⁾のなかで既に、EHEC の Reservoir は牛であることが指摘されており、と殺過程で EHEC により汚染された牛肉が EHEC の感染源として重要であると考えられていた。このような知見に基づいて、我々は1992年に市販輸入牛肉を対象とした EHEC の汚染調査を実施し、オーストラリア産牛肉から VT-2遺伝子を保有する株を分離し、秋田市内で市販されている牛肉が実際に VTEC に汚染されていることを示した。また、県内で飼育されている牛の直腸便を対象として EHEC の検索を実施し、県内で飼育されている牛が VTEC を保菌していることも示した⁹⁾。その後、患者から分離される O157、O26、O103などの EHEC が腸管定着に関与する *eaeA* 遺伝子³⁾を保有していることが知られるようになり、また、患者から分離されるにもかかわらず *eaeA* 遺伝子を保有しない O113:H21などの EHEC が、2001年に Patton らにより *saa* という新たな腸管定着遺伝子¹⁾を保有していることが示され、EHEC のヒトに対する病原性とこれらの腸管定着因子の存在が密接に関連していると考えられるようになった。これまでの国内外の報告によると、牛や牛肉から分離される VT 遺伝子保有株の大半がこれらの腸管定着遺伝子を保有しない VTEC であり、これらの VTEC がヒトの病原菌としてどのような意義を持つかについては明らかではない。*eaeA* や *saa* を保有する EHEC を選択的に分離・同定する手法としては島根衛研の福島ら^{10) 11) 12)}が報告した塩酸処理法とセフィキシム・テルライト (CT) 選択剤の使用などが有効であり、当所においても感染源調査などに応用してその有用性を確認している。従って、今回、2001年から実施した調査ではこれらの選択分離技術を応用し、市販牛肉と県内でと殺される牛の糞便中の *eaeA* や *saa* 保有 EHEC を検索した。なお、1992年当時は *eaeA* や *saa* 遺伝子の意義が十分認識されるに至らず、かつ、これらの遺伝子を保有する EHEC の選択的な分離方法が開発されていなかったために、県内で実施した調査において使用した分離方法は極めてプリミティブな手法であり、実際に牛肉や牛便から分離された VT 遺伝子保有株はすべて腸管定着遺伝子を保有しない VTEC であった。

今回の調査により、県内で食肉生産目的でと殺されている牛がヒトの下痢症から分離されている EHEC O26、O157:H7、O103、及び無症状保菌者から分離されている EHEC O156:H25を実際に保菌していることが初めて示され、大阪府で HUS 患者から分離されている EHEC O165とオーストラリアで HUS 患者から分離さ

れている EHEC O113の保菌も確認された。牛がこれらの EHEC を保菌している事実と県内における EHEC 患者発生との関連は必ずしも明白ではない。この点についてさらに検討するため、牛からこれらの菌が分離された時期に県内で発生した患者から分離された菌のうち、牛由来株と血清型、VT 遺伝子型が一致する株について PFGE パターンを比較した。その結果、2002年の7月1日に秋田市産牛から分離された EHEC O157:H7 VT-1&2+ 6741株と8月22日に本荘保健所管内で発生した家族内感染事例から分離された EHEC O157:H7 VT-1&2+ 6965株のパターンが同一であること、及び9月20日に湯沢産牛から分離された EHEC O157:H7 VT-2+ 7102株と7月25日に秋田市保健所管内で発生した散発患者から分離された EHEC O157:H7 VT-2+ 6835株のパターンが同一であることが明らかとなった。これらの2事例において、牛とヒトから同一 PFGE パターンを示す EHEC O157:H7が分離された時期が1か月以上、あるいは約2か月隔たっている点が注目される。このことから、以上の結果は県内でと殺された牛が EHEC 患者発生に関与していたことの直接証拠とは必ずしもなり得ず、むしろ、同一起源から派生した EHEC が県内でヒトと牛に侵淫している事実を示すものと考えることが妥当といえる。なお、EHEC O103については検討した範囲で牛由来株とヒト由来株に同一 PFGE パターンを示す株は認められなかった。一方、今回の結果は牛がと殺される過程で食肉が EHEC に2次汚染される可能性をあらためて示すものと考えられる。この点については、食肉生産現場における HACCP システムの励行が2次汚染の発生防止のために極めて有用であるとされる。今回、検体の採取・提供に関して全面的に協力をいただいた秋田県中央食肉衛生検査所は、全国に先駆けて1999年8月から HACCP を導入しており、2次汚染防止に係る衛生管理は万全の体制が既に構築されているといえる。

市販食肉については、ヒトの下痢症から分離されている EHEC O26、O157:H7、O103の汚染を直接証明し得なかったが、オーストラリア産牛肉から EHEC O113:H21 VT-2+, *saa+*が分離された。EHEC O113:H21は県内で患者からの分離例がないが、このことは O113の型別血清が市販されていないために医療機関の検査室で十分な検索が実施し得ないことに起因するとも考えられる。一方、今回の調査で冷凍ホルモンから VTEC が高頻度に分離された。このことは、輸入牛肉のなかでもホルモンが EHEC に汚染される可能性が高いことを示唆するものと推察される。なお、供試した冷凍ホルモンの産地は、判明した限りにおいて米国であった。一方、秋田県内においても焼肉店を原因施設とする EHEC 集団

感染事例が発生している。これまでに発生した最大規模の事例は1999年に横手保健所管内で発生した EHEC O157 : H7を原因とする事例であったが、今回の検討期間においても2003年6月24日に秋田市保健所管内で EHEC O157 : H7を原因とする食中毒事例が発生している。また、焼肉店が原因施設として疑われたものの、事例との関連を証明するには至らなかった事例としては、1997年に横手保健所管内で発生した EHEC O157 : H7 感染事例、及び2001年に秋田市保健所管内で発生した HUS 発症をとまなう EHEC O157 : H7 感染事例がある。焼肉店においては、コストなどの理由により、提供される牛肉のなかで輸入牛肉がかなりの比率を占めるであろうことを勘案すると、県内における EHEC 感染事例の感染源としての輸入牛肉の意義については今後も注目する必要があると考えられる。なお、2004年は BSE 問題により米国からの牛肉の輸入が停止している。しかしながら、国立感染症研究所の感染症情報には2004年10月現在における全国の EHEC 感染者数が昨年以前の同時期における患者数とほぼ同数で推移していることが示されている。このことは、米国産牛肉の輸入停止が国内における EHEC 患者発生数に顕著な影響を及ぼしていないことを示しているものと考えられ、国内における EHEC 感染源の多様性を示唆しているものと推察される。

今回の検討期間中である2003年5月29日に本荘保健所管内で飼育牛を感染源とする畜産農家の EHEC O26 散発感染事例が発生した。秋田県においてはこれまで、1996年に畜産農家における EHEC O103 : H2 家族内感染事例¹³⁾、2000年に飼育牛が感染源と考えられた EHEC O121 家族内感染事例¹⁴⁾ が発生している。これらの事例はいずれも牛由来株と患者由来株の PFGE パターンが一致したことにより、牛が感染源と特定された事例である。なお、飼育牛や観光牧場の牛が感染源と特定された EHEC 感染事例は全国的にも散見される。以上の結果は、感染源全体に占める割合は小さいと考えられるものの、飼育牛自体も県内における EHEC 感染事例における感染源としての意義を持つことを示していると考えられ、このことも県内における EHEC 感染源の多様性を示すものと考えられる。

本調査研究を遂行する過程で、EHEC の血清型決定に有用である O 抗原合成遺伝子群を標的とした PCR を導入した。現在 PCR 法が報告されている O 抗原は O157、O111、O121、O91、O113、O104 であり、今回、これらのうち O157、O111、O121、O91 用 PCR を導入した。これらの血清型の EHEC のうち、O121 と O91 を型別するための国産型別用血清は市販されていない。そのため、県内で発生した患者から分離された菌の血清型を決定するには国際大腸菌クレブシエラセンターから輸入した

型別用血清を使用している。しかし、これらの輸入血清は非特異的凝集反応が強くみられ、検査精度が国産血清と比較すると相当低く、検査精度を確保するためには型別を実施する担当者に相当の経験が必要である点が問題であった。今回、O121、O91、O157、O111 抗原特異検出用 PCR を導入したことにより、これら4種類の O 抗原については原理の異なる2種類の手法により血清型の決定が可能となったために、従来と比較して検査精度の向上が実現した。さらに、培養液や分離平板に生じた多数の菌の中にこれら4種の O 抗原を保有する菌を検出可能となったことから、感染源調査などにおいて少数の菌を分離平板上で検索することも可能となり、感染源調査などの菌検索についても精度の向上が実現した。これらに加えて、O26 抗原合成遺伝子群を標的とした PCR を確立しつつある。また、O-Antigen polymerase 遺伝子や O-Antigen flipperse 遺伝子など、O103 抗原に特異的な遺伝子を特定し、それらを標的とするプライマーを設計することにより PCR 反応系を確立することが今後の課題である。今回の調査研究遂行過程で導入したこれらの PCR は、今後も県内における EHEC 感染者の診断精度の向上と感染源調査の迅速化・精度向上に大きく寄与すると考えられる。

本調査研究により得られた成績は、県内における EHEC 感染源の多様性を示すものと考えられた。県内における EHEC の感染源対策に取り組む際には、この感染源の多様性を考慮する必要があるものと考えられた。

V まとめ

- ・今回の調査研究により県内で食肉生産目的によりと殺されている牛や畜産農家における飼育牛がヒト型 EHEC を実際に保菌していること、及び市販食肉がヒト型 EHEC により汚染されている事実が明らかとなった。
- ・輸入牛肉と、と殺牛が実際の EHEC 感染事例の感染源であることは直接証明されなかったが、県内における EHEC 感染源の多様性が示唆された。
- ・県内における EHEC の感染源対策に取り組む際には、感染源の多様性を考慮する必要があることが浮き彫りとなった。
- ・本研究の当初計画にはなかったが、研究遂行過程における必要性から O121、O91、O157、O111 抗原特異検出用 PCR を導入した。また、O26、O103 抗原特異検出用 PCR も開発中である。これらの PCR は、今後、県内における EHEC 感染者の診断精度の向上と感染源調査の迅速化・精度向上に大きく寄与すると考えられる。

VI 文 献

- 1) 八柳 潤, 他. 秋田県で散発下痢症から分離された Vero 毒素産生性大腸菌の性状. 感染症誌, 1995 ; 69 : 1286-1293.
- 2) Karmali, M.A. Infection by Verocytotoxin-Producing *Escherichia coli*. Clin. Microb. Rev., 1989 ; 2 : 15-38.
- 3) McKee, M.L. et al. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 : H7 requires intimin to colonize the gnotobiotic pig intestine and to adhere to HEp-2 cells. Infect. Immun., 1995 ; 63 : 3739-3744.
- 4) Patton, A.W. et al. Characterization of *Saa*, a novel auto agglutinating adhesin produced by locus of enterocyte effacement-negative Shiga-toxigenic *Escherichia coli* strains that are virulent for humans. Infect. Immun., 2001 ; 69 : 6999-7009.
- 5) Maurer, J.J. et al. Development of Primers to O-Antigen Biosynthesis Genes for Specific Detection of *Escherichia coli* O157 by PCR. Appl. Environ. Microbiol., 1999 ; 65 : 2954-2960.
- 6) Pina, M. et al. Sequence of the *Escherichia coli* O121 O-Antigen Gene Cluster and Detection of Enterohemorrhagic *E. coli* O121 by PCR Amplification of the *wzx* and *wzy* Genes. J. Clin. Microbiol. 2003 ; 41 : 3379-3383.
- 7) Perelle, S. et al. Identification of the O-antigen biosynthesis genes of *Escherichia coli* O91 and development of a O91 PCR serotyping test. J. Appl. Microbiol., 2002 ; 93 : 578-764.
- 8) Paton, A.W. and Paton, J.C. Detection and Characterization of Shiga Toxigenic *Escherichia coli* by Using Multiplex PCR Assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, Enterohemorrhagic *E. coli* *hlyA*, *rfb* O111, and *rfb* O157. J. Clin. Microbiol., 1998 ; 36 : 598-602.
- 9) 八柳 潤, 他. 県内産牛肉および牛からのベロ毒素産生性大腸菌 (VTEC) の分離. 秋田県衛生科学研究所報, 1994 ; 38 : 27-32.
- 10) Fukushima, H. et al. An effective, rapid and simple method for isolation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26, O111 and O157 from faeces and food samples. Zentralbl Bakteriologie, 1999 ; 289 : 415-428.
- 11) Fukushima, H. et al. Hydrochloric acid treatment for rapid recovery of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26, O111 and O157 from faeces, food and environmental samples. Zentralbl Bakteriologie, 1999 ; 289 : 285-299.
- 12) Fukushima, H. et al. Selective isolation of *eae*-positive Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. J. Clin. Microbiol., 2000 ; 38 : 1684-1687.
- 13) 齊藤志保子, 他. 牛が感染源と考えられ Vero 毒素産生性大腸菌 O103 : H2による家族内感染事例, 感染症誌, 1998 ; 72 : 703-713.
- 14) Yatsuyanagi, J. et al. A case of Hemolytic-uremic syndrome associated with Shiga toxin 2-producing *Escherichia coli* O121 infection caused by drinking water contaminated with bovine feces. Jap. J. Infect. Dis., 2002 ; 55 : 174-176.

卵の脂質に関する調査研究

松田恵理子 松淵亜希子 小林 淑子 武藤 倫子

特殊卵の表示実態を調査し、併せて栄養成分分析を行い表示内容と比較検討した。また、脂質代謝に効果があるとされている杜仲茶を添加した飼料で飼育した鶏卵の脂質変化を調査した。杜仲茶添加飼育は3群とし、添加率を各々飼料の0%、1%、3%とした。

その結果、特殊卵に記載されている栄養表示値のなかには、分析結果と大きく異なったものがあり、その原因としては転記ミス等が推察された。また、杜仲茶添加による鶏卵のコレステロール量及びn-6系脂肪酸とn-3系脂肪酸の比(n-6/n-3)は、添加3%群で他の2群より低下傾向を示した。

キーワード：卵、表示、杜仲茶、コレステロール、脂肪酸、脂肪酸組成

I 目 的

鶏卵（卵）は栄養価が高く、しかも低廉である。市場では健康志向に着目した種々の特殊卵が市販されている。しかし、メーカーによって表示方法は様々であり、消費者にとって分かりにくい。

一方、栄養改善法（現健康増進法）が改訂されて「コレステロールに関わる強調表示基準」が設定された¹⁾。健康志向が高まるなか、コレステロール（CHO）、脂肪酸等の表示は食品を選択するうえで重要な情報であり、卵のコレステロール量あるいは脂肪酸量等を餌の成分で変えることができれば消費者のニーズに合った卵の生産にも結びつく。

杜仲は中国原産の落葉高木で、葉を焙煎した杜仲茶は血圧上昇抑制作用があるとして健康茶に用いられている²⁾。また、飼料に杜仲茶を混合して生育させた豚の皮下脂肪および腸管膜脂肪に、顕著な融点低下を認めたことが報告されている³⁾。

そこで、市販されている特殊卵及び普通卵の脂質組成を化学分析により正確に把握し、成分表示との関連について比較検討した。また、鶏の飼料に杜仲茶を添加し、鶏卵の脂質組成に与える影響について検討したところ、若干の知見が得られたので報告する。

II 調査方法

1. 表示調査

- 1) 特殊卵調査：各種特殊卵の脂質に関する表示内容をインターネットで調査した。又、一般に市販されている普通卵および特殊卵を化学分析し、表示値と比較した。
- 2) 試料：市販特殊卵16検体（7種）、普通卵29検体
- 3) 項目：卵重、卵黄重、コレステロール、脂肪酸

分析脂肪酸；ミリスチン酸（C14）、パルミチン酸（C16）、パルミトレイン酸（C16:1）、ヘプタデカン酸（C17）、ステアリン酸（C18）、オレイン酸（C18:1）、リノール酸（C18:2）、 α -リノレン酸（C18:3）、アラキドン酸（C20:4）、エイコサペンタエン酸（EPA、C20:5）、ドコサペンタエン酸（C22:5）、ドコサヘキサエン酸（DHA、C22:6）

- 4) 分析方法：脂質成分は卵黄10個を混合して測定し、卵重及び卵黄重を用いて全卵100gあたりの濃度（mg）で算出、これを1検体の値とした。

脂肪酸は「栄養表示基準における栄養成分等の分析法について⁴⁾」及び「五訂日本食品成分表分析マニュアルの解説⁵⁾」に従った。

2. 杜仲茶添加飼育調査の前実験

- 1) 調査期間：平成12年9月～13年4月
- 2) 試料：市販の普通卵、比内鶏及びホワイトレグホン（W.L.）の卵
- 3) 項目：II 1. 3) に同じ
- 4) 分析方法：II 1. 4) に同じ

3. 杜仲茶添加飼育調査

- 1) 調査期間：平成13年12月～14年6月
- 2) 試料：W.L. の卵

鶏卵の脂質組成が安定する頃に、W.L. を3群に分けて（試料に杜仲茶を添加しない0%群50羽、添加1%群25羽、添加3%群25羽）飼育し卵を採取した。また、卵の採取は、飼育開始後1週間経過後を第1回目とし、その後2週間に1回を目安に各群10個ずつを採取し、分析に供した。

- 3) 項目：産卵率、他はII 1. 3) に同じ
- 4) 分析方法：産卵率は（1ヶ月間の産卵個数/1ヶ月間の延べ生存羽数） \times 100から算出、他はII 1. 4)

に同じ

Ⅲ 結果と考察

1. 表示調査

1) 特殊卵のコレステロール及び脂肪酸表示

特殊卵に記載されている表示内容をインターネットで調査した結果を表1に示した。各メーカーで表示方法が異なっており、食品単位は卵黄及び全卵あたりの2種類、単位はmg、g、%の3種類であった。さらに数値を示さず「低コレステロール」、「一般卵よりx%減、通常のy倍」等の表示もあった。多価不飽和脂肪酸については、DHA、C18:3、C18:2、EPAについて表示されており、同様に表示方法は様々であった。栄養表示基準は一般表示と強調表示に分けられ、特殊卵の脂質内容に関する部分は強調表示に該当する。強調表示は絶対表示と相対表示があり、コレステロールについては相対表示が適用される。即ち、比較した食品に比べ100gあたり20mg以上低減され、かつ飽和脂肪

酸の含有量が食品100gあたり1.5g以上低減されることとなっている¹⁾。調査した表示にはコレステロール量と飽和脂肪酸量を併記したものはなく、また相対表示の低減に適したものもなく、比較対象なしの「低コレステロール」や「一般卵よりx%減」といった栄養表示基準に適合しない表示がみられた。さらに食品単位があいまいな表示もみられた。

2) 特殊卵の脂肪酸表示値と分析値等の比較

栄養表示基準において、表示値は分析値だけでなく理論値の記載も認められており、結果として表示値が正確であれば良いとされている⁶⁾。表示値の正確さを検討するために、特殊卵16検体(7種)、普通卵29検体について、表示値、分析値、食品成分表からの計算値の比較を行い、結果を表2に示した。DHAの表示があったA卵は表示が600mg/100gであったが、実際の分析値は105.8~138.8mg/100gとかなり低いレベルであった。また、比較表示の普通卵は125mg/100gで食品成分表からの計算値及び市販卵の分析値と大差は

表1 特殊卵の表示内容調査(件数)

表示方法	成分名	多価不飽和脂肪酸				
		コレステロール	DHA	リノール酸	α -リノレン酸	EPA
卵黄100g中のmg		2	2	1	1	
卵黄100g中のg		1				
全卵(可食部)100g中のmg		21	18		9	1
全卵(可食部)100g中のg			2	1	2	
卵1個あたりのmg			1			
%		3	1		1	
mg		6				
脂質9.8%の%			1	1	1	
低コレステロール		5				
一般卵よりx%減 通常のy倍		3				

<http://homepage3.nifty.com/takakis2/tokusyuu.htm>

表2 特殊卵の表示と分析値の比較

単位: mg/100g

脂肪酸成分名		ドコサヘキサエン酸 (DHA、C22:6)			リノール酸 (C18:2)	α -リノレン酸 (C18:3)		エイコサペンタエン酸 (EPA、C20:5)
		A卵	B卵	C卵	D卵	E卵	F卵	C卵
卵(メーカー、生産者別)	表示値	600	260	360	4460	160	700	40
	比較表示 (普通卵)	125	90	100	1300	40	-	0
分析値 計算値	分析値(n=1,4) (平均値)	105~138.8 (133.2)	190~308.1 (253.6)	493.3	883~1770 (1770)	170	1091	59
	食品成分表からの 計算値*	164			1220	27		0
普通卵分析値 (平均値、n=29)		50.3~265.5 (85.8)			883~1770 (1220.0)	17.3~56.9 (28.8)		0.3~11.8 (1.7)

* 食品成分表からの計算値 (mg/全卵100g) = 全卵の総脂肪酸量 (g/100g) × 脂肪酸総量100g当たりの脂肪酸(g) × 1000

なかった。そこで、表示値の根拠を検証するために成分分析書を確認したところ、1枚の成績書のなかに複数の単位が混在していた。即ち、600mg/100gは卵黄あたりの分析値であり、転記の際に誤って全卵あたりと表示したものと推察された。B卵は表示が260mg/100gに対して分析値が190.0~308.1mg/100g、平均253.6mg/100gとほぼ一致していた。C卵は表示が360mg/100gに対して分析値は493.3mg/100gと表示値を上回っていた。C18:2の表示があったD卵の場合、表示値は普通卵の3~5倍程度であり、比較表示の普通卵、食品成分表からの計算値より高かった。分析値は普通卵とほぼ同じ値であった。A卵と同じ生産者であることから、成分分析書の確認により転記ミスが推測された。C18:3の表示があったE卵は表示値160mg/100gと分析値の170mg/100gがほぼ一致し、また比較表示の普通卵、食品成分表からの計算値、普通卵の分析値のいずれよりも高かったことから表示は妥当と判断された。逆にF卵は表示値700mg/100gに対し、分析値が1091mg/100gと高く、また、食品成分表からの計算値と比較してもかなり高く、生産段階でC18:3を多く含むものの添加が推定された。EPAの表示があったC卵は表示値40mg/100g、分析値59mg/100gで普通卵の分析値1.7mg/100gとの差が大きく、EPAを多く含む飼料の添加が推定された。栄養表示基準が施行されたことにより、食品の栄養表示に一定のルール化が図られ、消費者が食品を選択する上で情報が得やすくなったとされている。しかし、実際には食品の表示方法はメーカー側に任せられているため、同じ食品でも同一でなく、特殊卵の表示も複雑であったり、正確さに欠けるものがあつた。今後は、表示方法の統一等、特殊卵の栄養表示の一元化が必要と考えられた。

2. 杜仲茶添加飼育調査の前実験

杜仲茶添加飼育調査の前段として普通卵、W.L.及び比内鶏の各卵について脂質含有量調査を行った。

1) 普通卵のコレステロール量

一般に市販されている普通卵のコレステロール量は

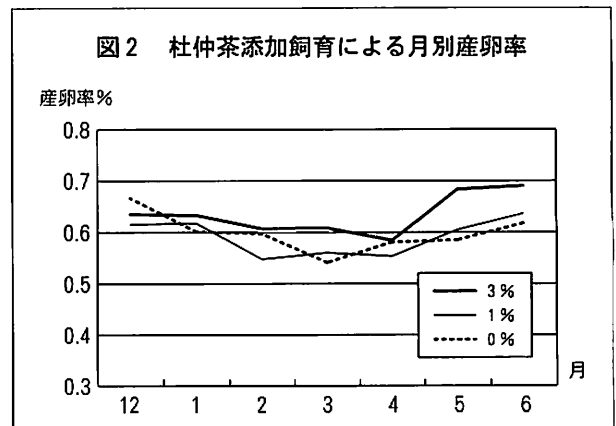
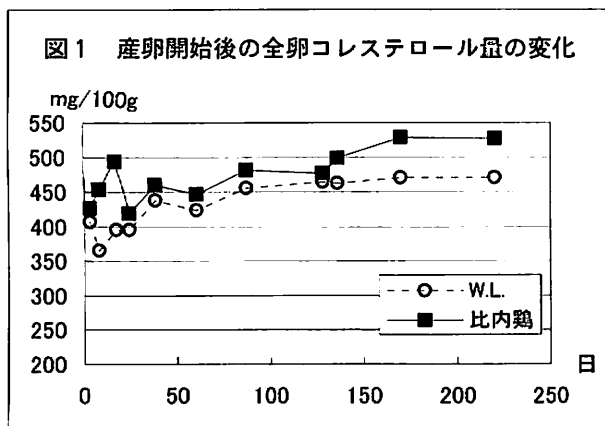
333.9~517.6mg/100g、平均399.0mg/100gであった。今回の結果では、卵によるバラツキが大きいものの、五訂食品成分表¹⁾の鶏卵のコレステロール値(420mg/100g)に比較して実測値の平均は低値を示した。栄養調査や食事指導の際には食品成分表の値を使用しているが、普通卵のコレステロール量は大きくばらついており、食品成分表の値と実際のコレステロール量は対応していない結果であった。食餌性コレステロールが、血清コレステロールに与える影響はおよそ20%で、残りは肝臓で合成される²⁾ため、摂取による影響は少ないといわれている。しかし、鶏卵は低廉で栄養価が高く、摂取頻度が高いため、血清コレステロールが高値の人にとってはコレステロール摂取量を1日300mg以下におさえるためにも考慮したい食品である³⁾。生産サイドでもコレステロール量を下げたり、脂質組成を変えることで付加価値を高めることを目的に餌や飼育方法を検討しており、そのため市場に流通している鶏卵のコレステロール量は五訂食品成分表の値より少ない状況であったものと推察された。

2) 普通卵の脂肪酸組成

一般に市販されている普通卵についてC14~C22:6を分析したところ、生産者やメーカーによる大きな違いはなく、いずれもC16、C16:1、C18、C18:1、C18:2、C20:4、C22:6が多く含まれていた。最も多く含まれていたのはC18:1、次いでC16であった。また、同一種の卵について各々季節変動をみたところ、いずれも大きな差はなかった。次に、脂肪酸組成を五訂食品成分表の組成と比較したところ、C22:6の分析値は平均でおよそ1.0%(0.6~1.3)であり五訂成分表の1.8%値よりは低かった。その他はほとんど同じであった。

3) 産卵開始後の鶏卵コレステロールの経日変化

産卵開始直後から、W.L.と比内鶏の卵のコレステロール量の変化をみた(図1)。W.L.の卵のコレステロール量は約90日まで上昇し、その後ほぼ一定になる傾向がみられた。比内鶏の場合は90日頃に一時安定するものの、その後さらに増加傾向を示し、170日前



後から一定になった。また、コレステロール量はW. L. が364.9~470.5mg/100g、比内鶏が419.5~528.5mg/100gで、平均値は各々470.5mg/100g、523.7mg/100gであり、種差が認められた。

3. 杜仲茶添加飼育調査

鶏は暑さ寒さに弱く、冬期に産卵率が低下するのが一般的である。しかし、添加3%群は0%、1%群に比べ冬期の落ち込みが少なく、春に向けて回復が著しかった(図2)。この原因は明らかではないが、杜仲茶の効果も否定できない。コレステロール量は、各群とも産卵開始直後から増減を繰り返しつつ増加し、9週まで差はみられなかった。しかし、15.6週以降から3%群が0%群、1%群より低下する傾向がみられた(図3)。これらの結果では0%群と1%群の差が明確ではなかったものの、3%群が他の2群に比較して低かったことからコレステロール低下に杜仲茶が関与していることが推察された。脂肪酸組成については、C22:6(DHA)等のn-3系多価不飽和脂肪酸が0%群、1%群より3%群で高い傾向がみられ(図4)、またC18:2等のn-6系多価不飽和脂肪酸は0%群より1%群、3%群で各々低い傾向がみられた(図5)。このことから、n-6系脂肪酸とn-3系脂肪酸の比(n-6/n-3)は、3%群で、0%、1%群より減少する傾向がみられた(図6)。これらの結果から、杜仲茶はコレステロールの低下及び脂肪酸組成に効果のあることが示唆された。

コレステロール低下等による動脈硬化予防の観点から、リノール酸の摂取を増やすという栄養指導が行われ、卵も含めた各種食品にリノール酸が添加されたことがあった。しかしリノール酸は長期的には血清コレステロールの低下に関与しないことがわかった¹⁰⁾。さらに、リノール酸の過剰摂取は代謝過程でアラキドン酸の増加を招き、アラキドン酸由来のエイコサノイドの産生過剰や脂肪酸バランスの変化が血栓性を上げ、逆に動脈硬化疾患を増やすことが明らかになった¹¹⁾。このため現在は、n-3系脂肪酸とn-6系脂肪酸のバランスが重視されるようになった。表1及び表2に示したように市場に出回る特殊卵にもn-3系脂肪酸を増やし、付加価値を付ける傾向が見られている。このような背景において、今回我々が検討した杜仲茶添加飼育の卵はコレステロール量は低めに、さらに脂肪酸組成バランスが従来のものより改良され、消費者のニーズに見合ったものになることが考察された。

IV まとめ

1. インターネットによる表示調査では栄養表示基準に適合しない表示が見られた。
2. 特殊卵の表示内容では、分析結果と表示内容が明らかに異なっているものがあり、その理由としては転記

図3 杜仲茶添加飼育による鶏卵コレステロール量の変化

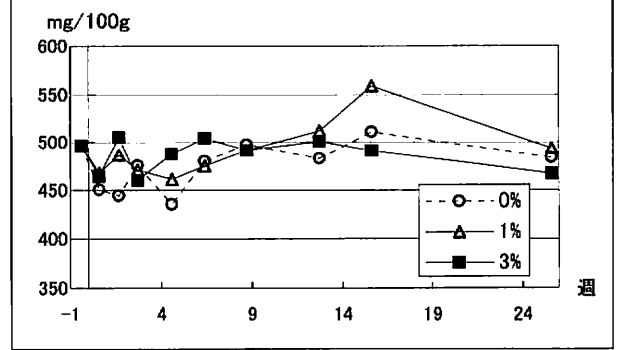


図4 杜仲茶添加飼育卵の脂肪酸組成の推移 (n-3)

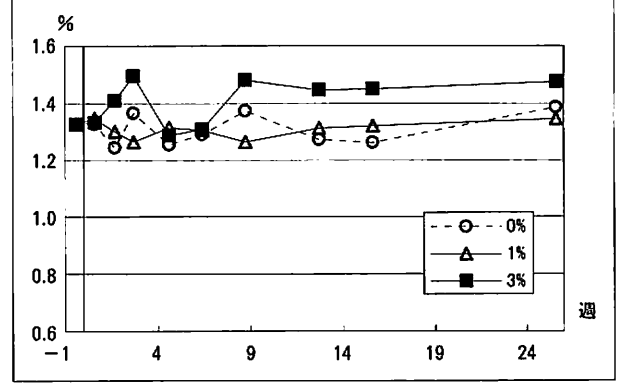


図5 杜仲茶添加飼育卵の脂肪酸組成の推移 (n-6)

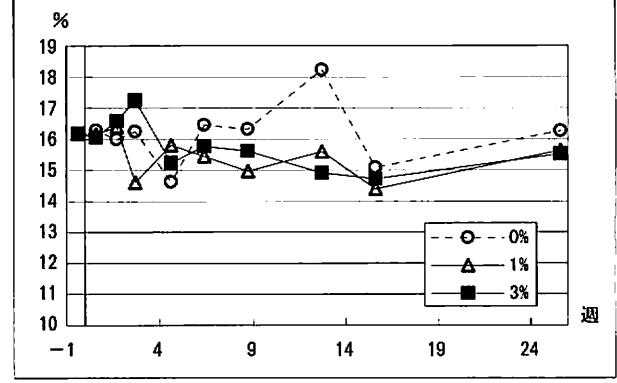
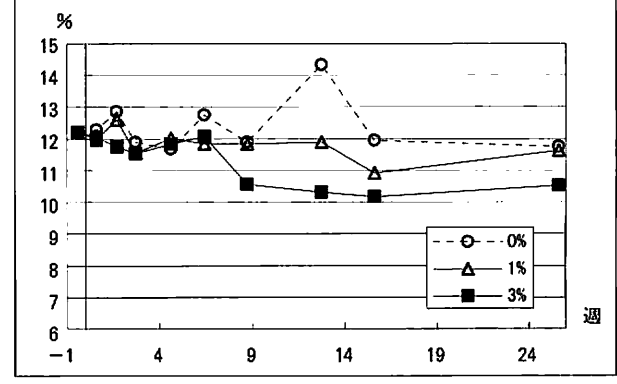


図6 杜仲茶添加飼育卵の脂肪酸組成の推移 (n-6/n-3)



ミス等が考えられた。

3. 普通卵のコレステロール量は、平均で399.0mg/100g (333.9~517.6mg/100g) と五訂食品成分表の値(420mg/100g) より低い結果であった。
4. 一般に市販されている普通卵の脂肪酸の分析結果では、生産者やメーカーによる違いはほとんどなく、多いのはC16、C16:1、C18、C18:1、C18:2、C20:4、C22:6であり、最も多く含まれていたのはC18:1、次いでC16であった。
5. 産卵開始直後からの鶏卵のコレステロール量の経日変動をみたところ、W.L. はおよそ90日で一定になった。比内鶏は、およそ90日で一時安定したものの、その後さらに高くなり、170日前後に一定になり、種差がみられた。
6. 杜仲茶添加飼育卵はコレステロール量及びn-6系脂肪酸とn-3系脂肪酸の比(n-6/n-3)が、3%群で、0%、1%群より減少する傾向がみられ、杜仲茶はコレステロール量の低下及び脂肪酸組成の変化に効果のあることが示唆された。

稿を終えるにあたり、鶏卵の提供並びに杜仲茶添加飼育調査に多大なるご協力をいただいた、秋田県畜産試験場の利部征夫、石塚条次並びに力丸宗弘の各氏に、厚くお礼申し上げます。

文 献

- 1) 古畑 公. 栄養表示基準におけるコレステロールの強調表示基準の設定について. 食品衛生研究, 1999; 49 (7): 15-30
- 2) 中沢慶久. 杜仲葉エキスの血圧降下作用に関する研究(第一報). Natural Medicines, 1997; 51 (5), 392-398.
- 3) 長谷川博之. 豚に杜仲茶を給餌した際の影響について. 平成12年度秋田県保健環境業務発表会抄録, 2000; 49
- 4) 平成11年4月26日付衛新発第13号, 1999
- 5) 財団法人分析センター編集: 分析実務者が書いた五訂日本食品成分表分析マニュアルの解説, 中央法規, 2002, 200-227
- 6) 新開発食品保健研究会監修: 改定早わかり栄養表示基準, 中央法規, 2001, 33-34
- 7) 香川美子監修: 五訂食品成分表2001, 女子栄養大学出版部, 2001, 202-203
- 8) 上島弘嗣, 岡山明編著: コレステロールを下げる健康教育, 保健同人社2002, 31
- 9) 健康栄養情報研究会編集: 第六次改定日本人の栄養所要量-食事摂取基準-, 第一出版, 2001, 56-57
- 10) Kazuko Hirai. et al. Low Eicosapentaenoic Acid and Higher Arachidonic Acid Levels in Sera of Young Adults in the Netherlands than in Japan. Environ. Health Prev. Med. 2000; 5: 60-65
- 11) 奥山治美. 脂質栄養指針は従来そのままよいか. 脂質栄養学, 1995; 4 (11): 16-25