

北九州市内の腸管出血性大腸菌感染症発生状況(2019-2020)

保健福祉局保健環境研究所 ○藤崎 道子、有川 衣美、大羽 広宣

1 はじめに

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で第三類感染症に分類されている、腸管出血性大腸菌(EHEC)感染症は保健所への届出と同時に、地方衛生研究所(地衛研)で分離菌株の生化学性状、血清・毒素型等を確認した後、詳細解析のため菌株等を国立感染症研究所(感染研)に送付している。

2019-2020年に当研究所に搬入されたEHECは、2019年が39検体、2020年が19検体であった。今回、地域的な疫学傾向を調査したのでその解析結果を報告する。

2 腸管出血性大腸菌感染症の発生状況

感染者数(全て散発事例のため、搬入、事例、感染者数は同数)の内訳を表1に、月別発生数を図1に示す。

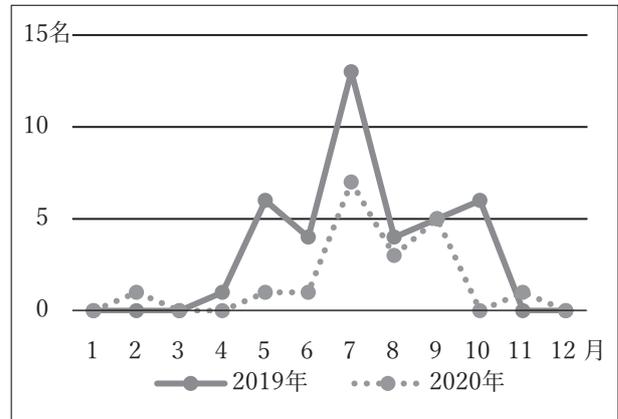


図1 腸管出血性大腸菌感染症月別発生数

表1 血清・VT型別感染者数<sup>※1</sup>

大腸菌血清型 <sup>※2</sup>	ペロ毒素(VT)	感染者数(名)		MLVA型 <sup>※3</sup> 集積情報
		2019	2020	
O157H7	1,2	25	4	2019: 10名19c011 2019: 4名19c053
O157H7	2	2	2	
O157H-	1,2	1	1	
O157H-	1	1	0	
O26H11	1	0	2	
O26H-	1,2	0	2	2名17m2024
O26H-	1	1	0	
O103H2	1	4	2	2019: 3名16m4021
O103Hg8	1	0	1	
O121H19	2	1	1	
O91H-	1	1	0	
O111H8	1	0	1	20m3016,下と同一者
O111H-	1	0	1	20m3016,上と同一者
O145H-	2	0	1	
O115H10	1	1	0	
O98Hg21	1	1	0	
O8H4	2	1	0	
O8Hg28	2	0	1	
合計		39名	19名	

※1 無症状病原体保有者を含む  
 ※2 感染研で遺伝子型を決定したH血清群はHgと表記した。  
 ※3 国立感染症研究所で実施

月別発生件数

2019、2020年(両年)とも7月にピークがあり、夏季に多い全国的な傾向と一致していた。

O血清型別感染者数

主要な血清型について  
 2019年: O157-29名(約74%)、O103-4名(約10%)  
 2020年: O157-7名(約37%)、O26-4名(約21%)、O103-3名(約16%)

全国的には両年ともO157が最も多く約50%、O26が15-20%、O103が5-10%であり、本市の傾向もO26が全国比よりやや少ないものの概ね同様であった。

血清・VT型別

両年ともO157H7(VT1,2)の感染者数が最多であったが、2019年は全体の約64%を占め、特に多く発生していた。これは後述する広域発生事例が関連するためと考えられる。

重症例

溶血性尿毒症症候群(HUS)の事例が2019年に1件(幼児)あり、O157H7(VT1,2)が検出された。

重症化しやすい12歳以下の感染者数は2019年が8名(約20%)、2020年が5名(約26%)であった。

その他

2020年は2019年より搬入数が少ないが、これは他の感染症や食中毒案件の検体数も同様の傾向であった。国が感染症発生動向調査でまとめた全国のEHEC届出数でも2020年は3,088件と例年(例えば2019年は3,744件)と比べやや少なかった。

また、無症状病原体保有者は2019年が8名(約20%)、2020年が3名(約16%)であった。

表2 分離菌株の薬剤感受性と血清・VT型、MLVA型との関係

年	耐性薬剤数	薬剤	株数	血清型 (VT)	MLVA 型 / コンプレックス
2019	5 剤	ABPC,KM,ST,SM,TC	1	O115H10 (VT1)	
	4 剤	ABPC,CP,SM,TC	1	O8H4 (VT2)	
	2 剤	ABPC,CTX	10	O157H7 (VT1,2)	18m0249/19 c 011
	2 剤	ABPC,CTX	1	O157H7 (VT1,2)	19m0470/19 c 053 p
	2 剤	ABPC,SM	1	O26H- (VT1)	19m2051
	1 剤	SM	1	O91H- (VT1)	18m8007
	1 剤	SM	1	O157H- (VT1,2)	19m0339
	1 剤	CP	1	O121H19 (VT2)	19m5025
	2020	1 剤	SM	1	O103H2 (VT1)
1 剤		TC	1	O145H- (VT2)	18m6003

### 3 分離菌株の薬剤感受性

分離菌株の薬剤感受性試験を行った。対象薬剤はアムピシリン(ABPC)、セフトキシム(CTX)、ゲンタマイシン(GM)、カナマイシン(KM)、ノルフロキサシン(NFLX)、イミペネム(IPM)、メロペネム(MEPM)、シプロフロキサシン(CPFX)、セフトジジム(CAZ)、クロラムフェニコール(CP)、SXT(ST)、ナリジク酸(NA)、ホスホマイシン(FOM)、セフォキシチン(CFX)、アミカシン(AMK)、ストレプトマイシン(SM)、テトラサイクリン(TC)、コリスチン(CL)の18剤で、Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI)の方法に従い、Kirby-Bauer法に基づいたディスク法(BDセンシディスク)を用いた。

2019年39株のうち17株(約44%)が、2020年19株のうち2株(約11%)が1剤以上の薬剤に耐性を示した。内訳を表2に示す。

4剤以上に耐性を示した2菌株はともに、O157等の主要な血清型ではなかった。

供試菌株は全てカルバペネム系薬剤(MEPM、IPM)に感受性があったが、CTXに耐性を示すものが11株あった。これらの基質特異性拡張型β-ラクタマーゼ産生(ESBL)及びAmpC型β-ラクタマーゼ遺伝子の有無を調べるため、PCRを実施したところ、11株全てからESBL産生遺伝子を含むCTX-M-1グループ遺伝子及びTEM型遺伝子が検出された。

### 4 広域発生事例

2018(平成30)年2月8日付け通知(健感発0208第1号、薬生食監発0208第1号)により、O157、O26等主要な血清型の遺伝子型別検査を反復配列多型解析法(MLVA)へ統一化を図ることが示された。

2020年時点で、当研究所は検査体制が未整備であったため、感染症発生動向調査事業実施要綱等に基づき、速やかに菌株を感染研に送付し、解析結果の送付を受けた。

全国の解析結果は、分子疫学サーベイランスとして、地衛研や保健所等関係機関で情報共有している。

分子疫学解析結果の一致、すなわちMLVA型/コンプレックスの一致は関連性を強く示唆する。2019年、全国5以上の機関で検出された広域コンプレックスは15種類で、このうちMLVA型18m0249・MLVAコンプレックス19c011は、全国の検出数22株中、本市で同年6～8月に分離されたものが10株と、全国の約45%を占めていた。

この10株は全て前述の薬剤感受性試験でABPC、CTXの2剤に耐性を示し、かつPCR検査によりESBL産生遺伝子が検出されている。これらから2019年夏季に疫学的関連性の不明なABPC及びCTX耐性のEHECが市内で集積していたことを示唆するものであった。

### 5 まとめ

EHECの疫学調査と分子疫学解析を進めることで、散発事例についても、市内での集積の有無や広域的な拡がりをとらえることができるようになってきている。EHEC感染症は、毎年自治体をまたぐ広域株がみられることから、本研究所も今秋より機器を更新しMLVA解析に必要な検査体制の整備を急いでいるところである。

これら疫学情報を関連部署間で速やかに情報共有し、感染拡大防止に努めることが重要である。

### 文献

- 1) 泉谷秀昌、謙一、伊豫田淳、大西真：病原体微生物検出情報、Vol41 No.5, 65-72
- 2) 泉谷秀昌、謙一、伊豫田淳、大西真：病原体微生物検出情報、Vol42 No.5, 87-97
- 3) 研究代表者 渡邊治雄「食品由来薬剤耐性菌のサーベイランスのための研究」平成30年度～令和2年度総合研究報告書
- 4) 地研協議会保健情報疫学部会「腸管出血性大腸菌MLVAハンドブック(O157、O26、O111編)」第一版(ver1.2)

市内流通カンパチ等に寄生する*Unicapsula seriolae*の汚染実態調査

保健福祉局保健環境研究所 ○藤崎 道子、有川 衣美、大羽 広宣

## 1 はじめに

近年、鮮魚の生食により一過性の嘔吐・下痢等を引き起こす有症事例が全国的に報告されており、その病因物質として粘液胞子虫類による食中毒の可能性が指摘されるようになってきた<sup>1)</sup>。

このため、平成24年、ヒラメの生食による食中毒の病因物質として、粘液胞子虫*Kudoa septempunctata*が追加された<sup>2)</sup>が、カンパチやヒラマサに寄生する粘液胞子虫である*Unicapsula seriolae*が病因物質と考えられる有症事例も全国で散見されている<sup>1)</sup>。

このような状況を踏まえ、当研究所においても、*U.seriolae*の検査体制の確立を目指すこととし、同時に実施した汚染実態調査において、いくつかの知見が得られたので報告する。

## 2 検体

- (1) 令和2年5月～令和3年8月の間に市内魚介類販売店で販売されたカンパチとヒラマサ各17検体(丸一尾もあるが、多くは刺身かブロック)
- (2) 平成31年4月に発生した食中毒疑い事案の際に搬入された患者便22検体及び従事者便1検体

## 3 方法

- (1) 定量的リアルタイムPCR(以下qRT-PCR)
 

魚肉は、魚1検体につき2-4ヶ所から約50mgを採取し、厚労省通知「*Kudoa septempunctata*の検査法(以下通知法)」<sup>3)</sup>を参考にQIAamp DNA Mini Kit(QIAGEN)を用いてDNAを抽出し、鋳型DNAとした。

便は厚労省通知「食中毒患者便からの*Kudoa septempunctata* 遺伝子検出法(参考)」<sup>4)</sup>に準じ検査を実施し、冷凍保存していた患者及び従事者由来のDNA抽出物を解凍し、鋳型DNAとした。

魚肉及び便由来の両試料とも、大西らの論文<sup>5)</sup>による方法で*U.seriolae*をターゲットとしたqRT-PCRを実施した(表1)。装置はABI7500Fast(Thermo Fisher Scientific)を用いた。

表1 qRT-PCR反応調整液と反応条件

PCR反応液(Total:20 $\mu$ l)	$\times 1(\mu$ l)	最終濃度( $\mu$ M)
DW	3.6	
TaqMan Universal Master Mix	10	
ROX reference dye II ( $\times 50$ )	0.4	
10 $\times$ Primer/Prove Mix <sup>*</sup>	2	Primer4 Prove 2.5
鋳型DNA	4	
※TE89.5 $\mu$ lに100 $\mu$ MのPrimerF、R各4 $\mu$ l、Prove2.5 $\mu$ lを加えたもの		
PCR反応条件	95 $^{\circ}$ C 10分 1cycle →95 $^{\circ}$ C 15秒、60 $^{\circ}$ C 60秒 45cycle	

- (2) コンベンショナルPCR
 

魚肉及び便由来の両試料とも大西らの論文<sup>5)</sup>による方法でコンベンショナルPCRを実施した。

なお、大西らの論文<sup>5)</sup>におけるPCR反応条件の「30サイクル」を「40サイクル」に変更し、比較した。
- (3) 顕微鏡検査
 

qRT-PCR及びコンベンショナルPCRで*U.seriolae*遺伝子が確認された場合は大西らの論文<sup>5)</sup>による方法で顕微鏡検査を実施した。

## 4 結果

- (1) qRT-PCR
 

カンパチ1検体由来のDNA抽出液2試料から*U.seriolae*遺伝子が検出された(表2)。
- (2) コンベンショナルPCR
 

カンパチ1検体由来のDNA抽出液2試料から、1試料は明確に陽性と判定できたが、1試料はバンドが非常に薄く、疑陽性とした(表2)。

PCR反応条件における「30サイクル」と「40サイクル」の比較結果について、魚肉由来試料では「40サイクル」への変更により陽性コントロールのバンドはより明瞭になったが、複数検体でターゲット(429bp)付近に非特異バンドが出現した。このことから魚肉由来試料は「30サイクル」の方がよいと思われた。しかし、便由来試料では「40サイクル」はターゲット(429bp)付近に非特異バンドがなく、陽性コントロールのバンドがより明瞭に認められ、感度上昇が期待できた。
- (3) 顕微鏡検査

*U.seriolae*遺伝子が確認されたカンパチ1検体で顕微鏡検査を行ったところ、定量限界未満(定量限界:10<sup>5</sup>孢子/g)であった。しかし魚肉懸濁液を遠心処理後、直接塗抹したサフラニン単染色標本では極糸を出した豆もやし状の*U.seriolae*孢子が確認できた。

表2 検出した*Unicapsula seriolae*

由 来		令和2年3月購入カンパチ1検体	
遺 伝 子 検 査		抽出液1	抽出液2
	qRT-PCR遺伝子量 (copy rRNA/g)	3.1×10 <sup>6</sup>	4.7×10 <sup>5</sup>
	ConventionalPCR	陽性	疑陽性
顕 微 鏡	定量検査	定量限界(10 <sup>5</sup> 孢子/g)未満	
	染色標本	陽性	

## 5 考察

過去5年間に市内で*U. seriolae*による健康被害の事例はないが、今回の汚染実態調査で市内流通のカンパチ・ヒラマサ34検体のうち1検体から*U. seriolae*が検出された。福岡市が2015-2017年にかけて、計5回カンパチ延べ76検体での市場調査<sup>6)</sup>では、26検体がPCR検査陽性であった。また平成26年に東京都内で購入したカンパチでの市場調査<sup>5)</sup>では50検体中22検体でPCR検査陽性であり、今回の汚染実態調査よりPCR陽性の検体数が多い。これは試買した時期や回数、検体数等が関係している可能性があるが、同一の魚由来DNA抽出液でも遺伝子量に差が見られたという報告<sup>7)</sup>もあり、1検体あたりのDNA試料数(サンプリング数)を増やすことも検討する必要がある。

今回、実際の食中毒検査や試薬管理を想定し、DNA抽出からqRT-PCRまでを通知法と同一条件にしたことで、*K. septempunctata*と*U. seriolae*の両検査が同じ試薬・方法で実施可能であることが分かった(表1)。

また、コロナウイルス検査用に増設整備した核酸抽出装置(QIAcube-QIAGEN)を使用できたことで、多くの検体から効率よくDNA抽出することができた。

食中毒事例では食品残品がなく、便検体のみというケースもある。便検体のDNA検査はqRT-PCR及びPCRのサイクル数を40でのコンベンショナルPCRがより有効と考えられた。

現時点で*U. seriolae*のヒトへの健康影響は不明な点が多く、病因解明等のため国から各自治体へ情報・検体提供の依頼がなされている<sup>8)</sup>。今後も保健所と連携し、検体採取に努めていきたい。

## 謝 辞

本調査にあたり陽性コントロールの分与、参考資料の提供及びご助言いただきました国立医薬品食品衛生研究所衛生微生物部大西貴弘室長に深謝いたします。

## 文 献

- 1) 大西貴弘ら、日本食品微生物学会雑誌33 (3) .150-154.2016「生鮮魚介類の生食に関連した有症苦情事例残品に含まれる粘液胞子虫の検出」
- 2) 厚生労働省「食品衛生施行規則の一部改正について」：平成24年12月28日付け食安第1228第7号
- 3) 厚生労働省「*Kudoa septempunctata*の検査法につ

いて」：平成28年4月27日付け生食監発0427第3号

- 4) 厚生労働省「食中毒患者便からの*Kudoa septempunctata*遺伝子検出法(参考)について」：平成26年5月26日付け事務連絡
- 5) 大西貴弘ら、食衛誌Vol.59, No.1「カンパチの生食に伴う有症苦情事例残品中の*Unica-psula seriolae*寄生量の定量的解析の検討」
- 6) 丸山浩幸ら、福岡市保環研報,43,2018「生食用魚類に寄生する多殻目粘液胞子虫の検査法の検討及び汚染実態調査」
- 7) 福留智子ら、令和元年度宮崎県衛生環境研究所研究発表会抄録「新たな食中毒の原因としての粘液胞子虫類の鮮魚実態調査について」
- 8) 厚生労働省「食中毒調査に係る病因物質不明事例の情報提供について(協力依頼)」：平成27年7月2日付け事務連絡

市内流通食肉の食中毒菌汚染実態について

保健福祉局保健環境研究所 ○角 沙千奈、有川 衣美、大羽 広宣

1 はじめに

毎年全国的に細菌やウイルス等を原因とする食中毒が発生しており、本市においても、食中毒予防のため衛生指導や汚染食品の排除等に加え、未然防止対策の一環として、流通食品の食中毒菌汚染実態調査を行っている。

今回、食中毒原因食品として上位を占める肉類、中でも、加熱不十分によって食中毒リスクが高まる牛レバーを検体とし、腸管出血性大腸菌及びカンピロバクター・ジェジュニ/コリの汚染実態調査を行った。

一方、令和元年に当研究所で腸管出血性大腸菌O113を検出した際、O抗原不明のまま検査を進めたところ、その後の作業量及び試薬等の使用量が膨大になってしまった。このことから、生菌の確認検査前にO抗原遺伝子検査を行う方が、その後の作業量等の軽減や効率化につながるとの知見が得られた。このため、腸管出血性大腸菌については、従来当研究所では行っていなかった検査法を用いてVT遺伝子(腸管出血性大腸菌の毒素遺伝子)及びO抗原遺伝子(O157等大腸菌のO血清型遺伝子)の同時検出を試み、有用性が確認できたので併せて報告する。

2 検査内容

検 体：市内流通牛レバー 28検体

検 査 法：平成30年度食品の食中毒菌汚染実態調査の実施について(平成30年5月29日 生食発0529第5号)

※両菌種の検査フローを図1、2に示す。

調査期間：令和3年2月8～17日(No.1～10)、同年8月10～18日(No.11～20)、同年8月16～24日(No.21～28)

使用培地：(腸管出血性大腸菌)

増菌用培地：mEC培地、選択分離培地：CT-SMAC培地及びCT-クロモアガー STEC  
(カンピロバクター)

増菌用培地：カンピロプレストン/100、選択分離培地：mCCDA及びスキロー改良培地

使用機器：(コンベンショナルPCR法) C1000 Touch サーマルサイクラー、(ランプ法) LA-320C、

(リアルタイムPCR法) 7500 Fast Real-Time PCR System

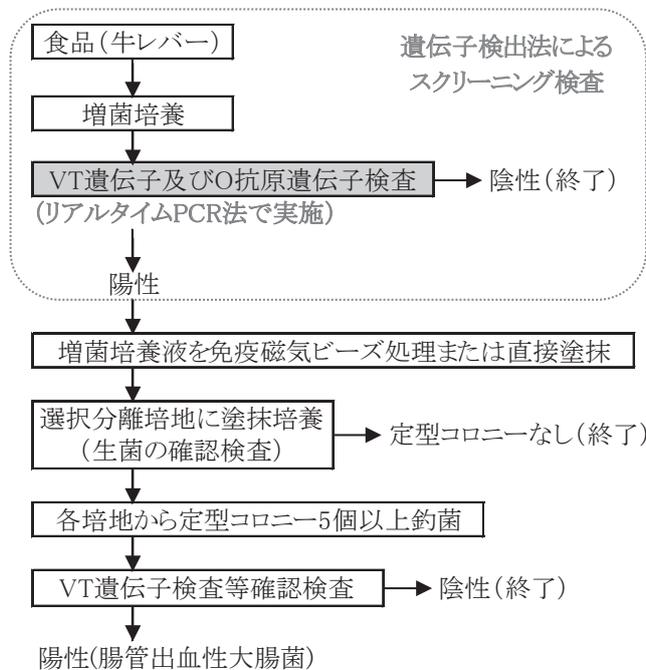


図1 腸管出血性大腸菌の検査フロー

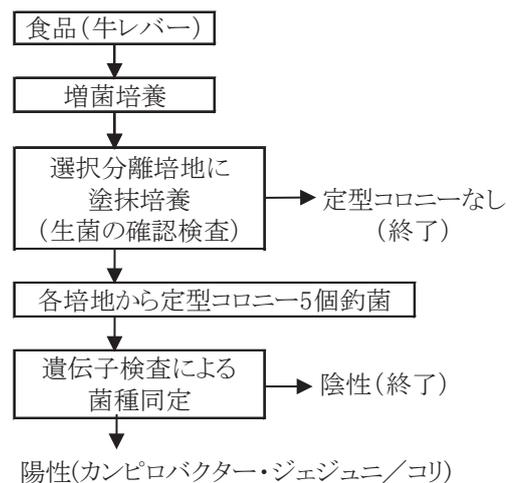


図2 カンピロバクターの検査フロー

### 3 結果と考察

腸管出血性大腸菌について、VT遺伝子及びO抗原遺伝子のスクリーニング検査を実施したところ、No.4、24、28の3検体からVT遺伝子を検出した。これら3検体について生菌の確認検査を実施したが、No.4はコロニーが生育せず、No.24は非定型コロニーであった。生菌が確認できなかった理由としては、すでに菌が死滅していたことや培養不能状態にあったこと等が推測される。No.28は定型コロニーが生育したものの、VT遺伝子の確認検査は陰性であった。このため、通常はコロニー5個以上を個別に確認検査するところ、まとめてかき取って再度VT遺伝子の確認検査を行ったが、これも陰性であった。なお、No.11～28について、リアルタイムPCRの結果が判明する前に生菌の確認検査に進んだところ、VT遺伝子を検出できなかった検体でも定型コロニーが生育したものや、O抗原遺伝子のみ検出された検体が確認された。これらについて念のためVT遺伝子の確認検査を行ったところ全て陰性となり、28検体全て腸管出血性大腸菌陰性であることが判明した(陽性率0%)。(表1参照)

カンピロバクターについては、生菌として培地に生育したものの遺伝子検査(コンベンショナルPCR法)で、28検体中ジェジュニはNo.3、8、20の3検体、コリはNo.5の1検体検出した(陽性率14.3%)。

平成11～22年度に全国的に実施された、牛レバー(加熱用)の汚染実態調査結果では、腸管出血性大腸菌陽性率0.5%(4/763)、カンピロバクター陽性率8.4%(64/763)となった<sup>1)</sup>。カンピロバクター陽性率のみ比較すると、本市は全国平均よりも高いが、現段階では検体数が少ないため評価は困難であった。

また、腸管出血性大腸菌のスクリーニング検査として、当研究所で従来実施しているコンベンショナルPCR法やランプ法(以下、「従来法」という。)とリアルタイムPCR法を比較したところ、従来法よりもリアルタイムPCR法の優位性が確認された。従来法では、食品によっては正しく判定できないものもあり、特にレバーはランプ法の場合、反応阻害が起きるため適用できない<sup>2)</sup>。リアルタイムPCR法は、検出感度に優れ、何よりO抗原遺伝子も同時に検出することができる点で非常に優れた手法である。一方、運用にはコストがかかるため、目的や検体に合わせて適切な検査法を選択する必要があると考えられた。(表2参照)

### 4 まとめ

牛レバーを原因とする最近の食中毒事件としては、飲食店で低温殺菌したとされる牛レバ刺し(平成30年：茨城県)、加熱調理用の牛生レバーの自宅での生食(令和3年：茨城県)等があり、どちらも病因物質がカンピロバクターと断定されている。また、加熱不十分な食肉が原因と思われる腸管出血性大腸菌による食中毒事件も毎年発生している。

今回の汚染実態調査の結果、市内流通の牛レバーからカンピロバクター・ジェジュニ/コリを検出した。また腸管出血性大腸菌の生菌の検出はなかったものの、複数の検体からVT遺伝子を検出した。本市においても前述のような食中毒事件が発生する恐れは十分にあると考えられる。

以上のことから、食中毒発生防止の観点で各家庭においては、牛レバーをはじめとする食肉の衛生的な取り扱いと十分な加熱の重要性が再確認された。市民の食の安全のために、正確な汚染実態の把握と継続的な情報の集積が不可欠である。

### 5 出典

- 1)平成23年7月6日薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会食中毒・乳肉水産食品合同部会資料
- 2)「Loopam腸管出血性大腸菌検出試薬キット(外因性コントロール入り)」取扱説明書

表1 検査結果(腸管出血性大腸菌)

No.	スクリーニング検査		確認検査	
	VT遺伝子	O抗原遺伝子	生菌	VT遺伝子
4	+	O157+	-	-
18	-	-	+	-
20	-	-	+	-
22	-	O26+	非定型	-
24	+	O26+ O121+	非定型	-
27	-	O121+	+	-
28	+	-	+	-

表2 VT遺伝子検出法の比較

No.	コンベンショナルPCR法	ランプ法	リアルタイムPCR法
VT遺伝子○	○	○	○
O抗原遺伝子	×	○	○
同時検出	×	×	○
費用	○	△	△
検査時間	△	○	○
結果の数値化	×	○	○
初期DNAの定量	×	×	○
検出感度	△	○	◎
肝臓検体	△	×	○

## 北九州市における新型コロナウイルス感染症の検査体制について

微生物部門 ○小畑 勝也

北九州市保健環境研究所(以下「市保環研」という)における新型コロナウイルス(以下「SARS-CoV-2」という)に係る検査体制をはじめとする主な北九州市の取組は以下のとおりである。

### 1. 市保環研での取組

#### (1) SARS-CoV-2検査業務のルーチン化

令和2年1月に厚生労働省から全国の地方衛生研究所に対してSARS-CoV-2の検査対応への協力依頼文が発出されたため、市保環研でもSARS-CoV-2の検査を行うこととなった。当初は2～3日おきにしか検査依頼がなかったが、2月下旬から毎日五月雨式に検査依頼が来るようになったため、検体の受付時間を定め、PCR検査を原則1日2回行うこととした。

#### (2) 検査員の確保

国内での新規感染者数が増加し続け、検査依頼数の更なる増加が見込まれたため、ウイルス部門の職員を増員(所内での配置転換及びウイルス検査業務経験者への兼務辞令発令)するとともに、検査業務の補助要員を育成するため、所内のウイルス部門以外の職員に対しSARS-CoV-2検査のOJTを実施した。これにより、現在は平日5名、休日(土曜・日曜・祝日)4名の職員が交替で検査業務に従事している。

### 2. 本庁及び保健所での取組

#### (1) 北九州市PCR検査センターの設置

帰国者・接触者外来以外の医療機関からSARS-CoV-2感染疑いの相談があった際の検体採取を行う機関として、令和2年5月に旧市立八幡病院跡地に北九州市PCR検査センター(以下「PCRセンター」という)を設置した。

#### (2) 検体搬送業務の民間委託

市保環研で検査を行う検体は当初保健所の職員が市内医療機関から市保環研まで搬送していたが、検体搬送の効率化を図るために令和2年8月から民間の運送会社に市内の帰国者・接触者外来等で採取した検体の搬送業務を委託した。

#### (3) かかりつけ医でのSARS-CoV-2検査の開始

発熱等の症状のある患者が、かかりつけ医等の地域で身近な医療機関において適切に診療・検査を受けられるよう、発熱患者等の診療又は検査を行う医療機関を令和2年10月に「診療・検査医療機関」として指定した(北九州市域に247機関)。

#### (4) 他自治体との広域連携

クラスターの発生等により医療機関から1日の検査能力を超える検査依頼があったとき、またPCR試薬等の消耗品が不足したときは、平成26年に九州地方及び山口県の21自治体間で締結した「九州・山口九県における感染症に対する広域連携に関する協定」に基づき、自治体間で相互に支援した。

### 3. 現在の検査体制

市保環研、PCRセンター及びかかりつけ医の3者が主に以下の患者を対象にSARS-CoV-2の検査を行っている。

市保環研…帰国者・接触者外来及びクラスター疑い(学校・企業・福祉施設等の全員検査)

PCRセンター…濃厚接触者及び健康観察者

かかりつけ医…一般市民(濃厚接触者、健康観察者ではない発熱症状がある者)

食中毒を引き起こす病原体 サポウイルスの検査体制の確立

微生物部門 ○菊地 明日香、濱田 一志、小畑 勝也

1 はじめに

サポウイルスはこれまで小児の散発的な感染性胃腸炎の主たる原因として考えられてきたが、近年国内で増えてきた食中毒をはじめとした集団感染事例にも起因している可能性が指摘されている。

食中毒の疑いがある事件が発生した場合、速やかに原因物質を特定する必要があるが、サポウイルスに関しては、当所の検査法(マルチプレックスPCR)が低感度であったことから行政依頼検査を積極的に受付けてこなかった。

一方、今年7月に国立感染症研究所がサポウイルスの病原体検出マニュアル(第1版)(以下、「感染研マニュアル」という。)を策定し、リアルタイムPCRによる高感度検査法(以下、「感染研法」という。)が示された。これを受け、当所でも感染研法による検査が実施できるよう検査体制の構築を図るとともに、検査法の改良の検討を行ったので報告する。

2 リアルタイムPCR検査法の概要

マルチプレックスPCRは、PCR反応にて原因ウイルスに由来するターゲットDNAの増幅の有無を電気泳動により分離したバンドサイズにて判定する方法である(図1左)。感染性胃腸炎の原因となるアイチウイルスやアストロウイルスについても同時に検出可能であるが、感度はリアルタイムPCRに劣り、結果判定に時間を要する点が、食中毒事例における行政依頼検査においてボトルネックとなっていた。

リアルタイムPCRは、ターゲットDNAの増幅を蛍光強度の増加量として間接的に且つリアルタイムに検出する方法であり、非常に高感度で検出特異性が高い点を特徴とする(図1右)。PCRで増幅できるのはDNAであり、サポウイルスのようなRNAウイルスを対象とした場合は逆転写反応によりRNAを相補的なDNAに転写してからPCRによる増幅を行う必要がある。この逆転写反応及びPCR反応を各々別の反応系(2ステップ)で行うか、一つの反応系(1ステップ)として行うかで使用する試薬が異なり、感染研法では2ステップによる反応系を採用している。

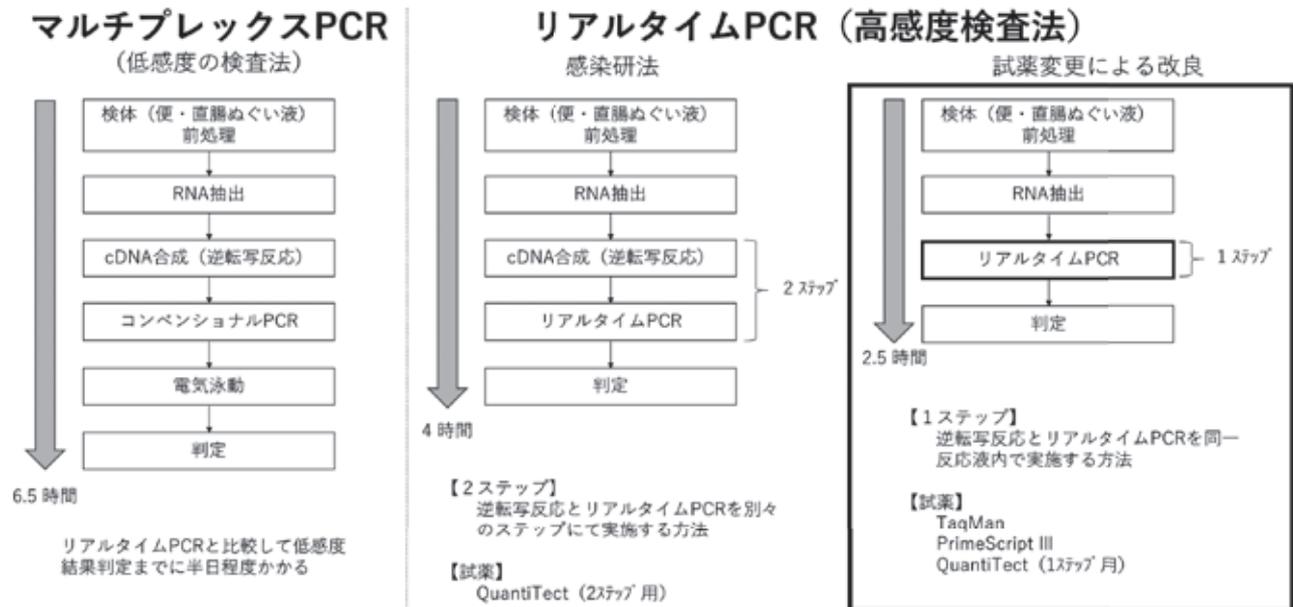


図1 マルチプレックス及びリアルタイムPCR検査法の概要

3 リアルタイムPCRによる検査法の検討

感染研マニュアルでは、サポウイルスに使用する試薬及びリアルタイムPCR装置について、「同等の反応性が検証できる場合は、各施設で変更してよい」と検査機関に選択の幅を持たせている。そこで、本研究では、作業工程及び結果判定に要する時間短縮を目的として、1ステップ試薬の導入を検討し、当所が所有する3種類の試薬にて同等性比較及び検査条件を決定した。

比較検討に使用した1ステップPCR反応試薬、プライマー濃度、リアルタイムPCR装置を表1に示す。プライマー

濃度は感染研法に記載のある1.2uM/反応及び各試薬で標準的な設定濃度である0.6uM/反応の2つを採用し（プローブ濃度は200nMに固定）、これら3要素の最適な組み合わせを検討した。

検討にあたっては、感染研より配布されたリアルタイムPCR用陽性コントロールにて $10^7 \sim 10^2$  copies/反応の範囲で検量線を作成し、傾き及び相関係数を比較した。

#### 4 結果と考察

ベースラインが低く安定し、傾き及び相関係数（LC480 II ではError値、ABI7500Fast では $R^2$ に相当）が最適であったのは、試薬がTaqMan、プライマー濃度が1.2uM/反応でABI7500Fast装置の組み合わせ条件であった（表2）。

ターゲットのDNA断片が1サイクルで2倍に増幅する理想的なPCR反応の場合、傾きは-3.32となる。また、感染研法では相関係数0.990以上が望ましいとしており、今回決定した条件はこれに合致している。

TaqMan試薬によるPCR反応時間は1.5時間、前処理やRNA抽出の時間を1時間程度と考慮しても、感染研法では4時間かかるのに対して2.5時間程度での検出が可能となった。

#### 5 今後の展開

ウイルス性の食中毒の主要原因として挙げられるノロウイルスについては、既に1.5～2時間程度で迅速な結果が得られる検査体制が整えられている。

しかし、ノロウイルスとサポウイルスは異なる反応系であるため同時進行での検査が難しく、ノロウイルス検査にて陰性であることを確認した後に、サポウイルス検査を実施するという流れが現実的である。

また、特に食中毒疑いの因果関係を明白にする上では、遺伝子型の決定が有益な情報となるが、リアルタイムPCRではサポウイルスの遺伝子型までは決定できない。このため、当所において感染研法のコンベンショナルPCRに準じた条件についても検討し、サポウイルスを検出した臨床検体を用いて遺伝子型の決定にも成功している（図2）。

今後は、より早く検査結果を保健所等へ還元できるよう、本研究で決定した条件等を検査標準作業書に反映させ、検査体制を整えていく予定である。

表1 試薬・プライマー濃度・装置の組合せ

1ステップ PCR反応試薬	プライマー濃度 (※プローブ濃度固定)	リアルタイム PCR装置
TaqMan PrimeScript III QuantiTect	1.2 uM 0.6uM	LC480 II ABI7500Fast

表2 組合せ結果

LC480 II		1.2uM/反応	0.6uM/反応
TaqMan	傾き	-3.503	-3.625
	Error	0.0446	0.044
PrimeScript III	傾き	-3.666	-3.858
	Error	0.102	0.176
QuantiTect	傾き	-4.719	-5.096
	Error	0.045	0.0558

ABI7500Fast		1.2uM/反応	0.6uM/反応
TaqMan	傾き	-3.436	-3.792
	$R^2$	0.992	0.988
PrimeScript III	傾き	-3.696	-3.966
	$R^2$	0.984	0.972
QuantiTect	※ベースライン不安定のため評価対象から除外		

評価基準：ベースライン安定性、相関係数 $\geq 0.990$ 、傾き-3.1～-3.8

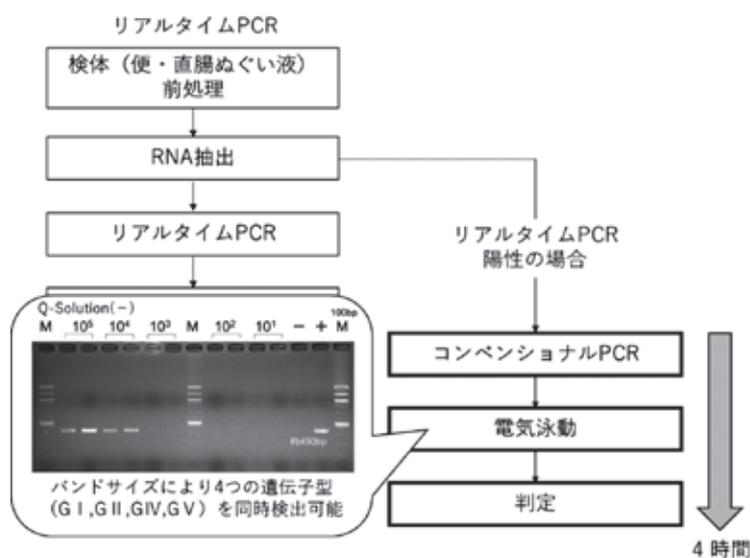


図2 コンベンショナルPCRによる遺伝子型の決定



3 すべての人に  
健康と福祉を



6 安全な水とトイレ  
を世界中に



13 気候変動に  
具体的な対策を



14 海の豊かさを  
守ろう



15 陸の豊かさも  
守ろう



## 北九州市保健環境研究所報

第49号(令和3年度)

〒804-0082

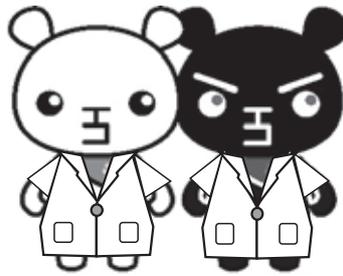
北九州市戸畑区新池一丁目2番1号

北九州市保健環境研究所

電話 (093) 882-0333 FAX (093) 871-2535

e-Mail ho-kenkyuu@city.kitakyushu.lg.jp

2211114A



©ていたん&ブラックていたん,北九州市