

北九州市内で製造されたそうざいの細菌汚染状況と保存温度の影響

北九州市保健環境研究所 ○上野 可南子、藤田 景清、濱田 建一郎、
角沙 千奈¹、藤崎 道子²、石打 郁代³

(¹現・北九州市介護保険課、²現・北九州市立総合農事センター、

³現・北九州市保健所)

1 はじめに

スーパー等で気軽に購入できるそうざいは、消費者にとって身近な食品であり、共働き世帯の増加や高齢化等の社会環境の変化に伴い、その需要は年々高まっている。本市では食中毒防止のため、市内で食品を製造しているスーパーや食品製造所などから定期的にそうざいを収去し、「北九州市食品衛生成分規格指導基準」(以下、「指導基準」という。)(表1)を満たしているか検査するとともに、衛生指導を行っている。

この収去検査結果について過去5年分を集計したところ、スーパーなど小売店の調理場等(飲食店営業許可施設)で作られたそうざい(以下、「スーパー等のそうざい」という。)と、食品製造所(そうざい製造業許可施設)で作られたそうざい(以下、「製造所のそうざい」という。)とでは、検査結果に明確な違いが確認された。

また、検査結果の集計から、製造時においては細菌汚染を最低限に抑制するための衛生管理と販売までに細菌を増殖させない温度管理の徹底、そして購入後においても家庭で細菌を増殖させない温度管理が重要であることが示唆された。そこで、温度管理について検証するため、スーパー等のそうざいを常温または冷蔵保存した場合の細菌数の経時変化について実験を行ったところ、若干の知見が得られたので併せて報告する。

2 検査概要

(1) 過去5年間の収去検査結果

検 体：2018～2022年度に収去されたそうざい126検体

検査項目：細菌数、大腸菌群、黄色ブドウ球菌

検査方法：「食品衛生検査指針 微生物編 改訂第2版 2018」に準じて実施。

(2) 常温または冷蔵保存した場合の細菌数の経時変化実験

検 体：2022年度に収去されたスーパー等のそうざい6検体(表2)

※細菌数が指導基準適合の検体を使用

検査項目：細菌数

検査方法：冷凍保存した検体を解凍した時点(初発(0時間)とし、以下の条件で保存後、

(1)と同様に検査を実施。

常温条件：25℃で1、3、6、12時間及び24時間保存

冷蔵条件：4℃で24時間保存

実験期間：2022年9月6日～9月9日

表1 北九州市食品衛生成分規格指導基準
(一部抜粋)

項 目	そうざい	
	加熱調理食品	未加熱調理食品
細菌数	$1.0 \times 10^5/\text{g}$ 以下	
大腸菌群	陰性	
黄色ブドウ球菌	陰性	

表2 実験検体一覧

No.	食品名	区分	細菌数(/g)※
1	イカと野菜のXO醤ソース	加熱	<300
2	ごぼうとコンニャクのきんぴら	加熱	<300
3	ほうれん草の白和え	未加熱	4.1×10^2
4	ヤンニョムチキン	加熱	6.6×10^2
5	マカロニサラダ	未加熱	4.7×10^4
6	ほうれん草と玉子炒め	加熱	1.7×10^4

※細菌数は初発の値

表3 そうざいの収去検査結果(2018～2022年度)

対象食品	検体数	細菌数/g/					細菌数 不適数(%)	大腸菌群 陽性数(%)	黄色ブドウ球菌 陽性数(%)
		<300	10 ²	10 ³	10 ⁴	>10 ⁵			
市内製造のそうざい	126	91	6	15	5	9	9(7.1)	11(8.7)	4(3.2)
スーパー等のそうざい	66	35	6	12	4	9	9(13.6)	10(15.2)	4(6.1)
加熱済	41	33	3	1	1	3	3(7.3)	2(4.9)	3(7.3)
未加熱	25	2	3	11	3	6	6(24.0)	8(32.0) [*]	1(4.0) [*]
製造所のそうざい	60	56	0	3	1	0	0(0)	1(1.7)	0(0)
加熱済	54	52	0	1	1	0	0(0)	0(0)	0(0)
未加熱	6	4	0	2	0	0	0(0)	1(16.7) [*]	0(0) [*]

※食品衛生成分規格指導基準

3 結果と考察

(1) 過去5年間の収去検査結果

検査結果を集計したところ(表3)、細菌数の指導基準不適($1.0 \times 10^5/\text{g}$ 超過)率は7.1%で、東京都が1993～2002年度に実施した検査結果8.9%¹⁾とほぼ同程度であった。しかし、スーパー等のそうざいに限ると、細菌数の指導基準不適率は13.6%とやや高く、さらに大腸菌群陽性や黄色ブドウ球菌陽性の検体もあった。一方、製造所のそうざいは全て指導基準に適合しており、細菌数は検体の9割以上で検出限界(300/g)以下であった。

この検査結果の違いは、製造所のそうざいは広域流通品が多く、消費期限が長い調理工程において加圧加熱殺菌など、高レベルな微生物制御が行われているが、スーパー等のそうざいは当日中に消費することを前提に調理されており、サラダや和え物など調理の最終工程に加熱(殺菌)がない未加熱食品が多いことが要因と考えられる。生野菜を含むサラダや和え物などのそうざいは、原料である野菜の細菌汚染率が高く細菌汚染が起こりやすい食品とされ²⁾、その汚染防止が課題となっている。

また、スーパー等は製造所と比較して調理場が狭いため交差汚染のリスクがあるが、そうざい製造業の許可をもつ製造所は業種ごとの施設基準により製造ラインが工程ごとに区画されている。さらに、製造所はISO22000、FSSC22000等の認証取得施設もあり、両者の衛生管理レベルの違いも要因と考えられる。

特に、スーパー等の未加熱そうざいの92%が細菌数 $10^2 \sim 10^5/\text{g}$ 以上であったことから、製造時においては、細菌汚染を最低限に抑制するための衛生管理と、販売までに細菌を増殖させない温度管理の徹底、購入後においては、家庭で細菌を増殖させない温度管理が重要であることが示唆された。

(2) 常温または冷蔵保存した場合の細菌数の経時変化実験

(2)-1 常温保存実験

そうざい6検体(表2)を常温(25℃)で24時間保存した場合の細菌数の経時変化を図1に示す。初発(0時間)においては、全6検体が指導基準値未満(うち2検体は検出限界(300/g)以下)であったが、24時間経過後は5検体が指導基準値を超え、うち4検体は $2.2 \times 10^8/\text{g}$ を超えた。

最も増加率が高かったのは、検出限界以下だったNo.1で、 $2.2 \times 10^8/\text{g}$ まで増加した。最も速く指導基準値を超えたのはNo.6で、初発の $1.7 \times 10^4/\text{g}$ から、1時間で約2倍、3時間で4倍近くに増え、6時間後にはすでに $1.0 \times 10^5/\text{g}$ を超過していた。さらに24時間後には約26万倍の $4.5 \times 10^9/\text{g}$ まで増殖した。

一方で、No.4はほとんど菌数に変化はなかった。この検体による細菌増殖の違いは、食品のpHや水分活性、酸化還元電位、栄養成分等による細菌の増殖しやすさと、共存細菌の違いによるものと考えられる³⁾。

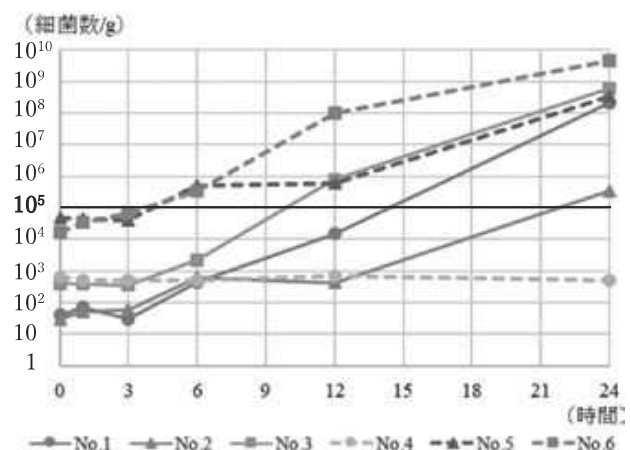


図1 常温(25℃)での細菌数の経時変化

(2)－2 冷蔵保存実験

そうざい6検体(表2)を冷蔵(4℃)保存した場合(図2)は、24時間後も菌数が増えていないものがほとんどだったが、No.6は指導基準値を超える 1.5×10^5 /gまで増殖し、冷蔵保存でも細菌の増殖を完全に防ぐことは難しいことが確認された。

このNo.6(ほうれん草と玉子炒め)の細菌の単離・同定を試みたところ、*Pseudomonas fluorescence*、*Pantoea agglomerans*、*Staphylococcus pasteurii*、*Streptococcus sanguinis*、*Acinetobacter haemolyticus*、*Alloiococcus otitis*の6菌種が同定された。このうち、*P. fluorescence*は低温でも増殖可能な腐敗菌として知られている⁴⁾ため、冷蔵条件で増殖した細菌は主に*P. fluorescence*だったと推定される。

同定された*P. fluorescence*と*Pa. agglomerans*は野菜から頻繁に検出される菌種である⁵⁾ため、原料のほうれん草由来の細菌汚染が疑われるが、No.6は加熱済み食品であるため加熱殺菌が不十分であったか、交差汚染の可能性が考えられる。No.6は常温条件でも6検体の中で24時間後の細菌数が最も多く、さらに、同じくほうれん草を原料としたNo.3(ほうれん草の白和え)も常温条件で2番目に細菌数が多かったことから、石井らの報告²⁾のとおり、特に野菜を原料としたそうざいは製造時の衛生管理の徹底に加え、家庭での保存にも注意が必要であると推定される。

また、今回、食中毒菌は検出されなかったが、低温増殖可能な食中毒菌としてリステリア・モノサイトゲネスが知られており、2021年には福岡市で食品媒介が疑われるリステリア・モノサイトゲネス集団感染事例が発生し、2種類のそうざいからリステリア・モノサイトゲネスが検出されている⁶⁾。以上のことから、冷蔵していても食中毒菌や腐敗菌が増殖する可能性があるため、冷蔵保存の過信は危険であるといえる。

4 まとめ

食品製造時における微生物制御は極めて重要であるが、調理工程によっては難しいものもあり、実際にスーパー等の未加熱そうざいの92%の検体から $10^2 \sim 10^5$ /g以上の細菌が検出された。さらに、購入時は検出限界以下であっても、常温で24時間放置すれば指導基準値を超える可能性が高いことが実験で確認された。細菌数が多ければ必ず食中毒を起こすわけではないが、スーパー等のそうざいの15.2%から大腸菌群、6.1%から黄色ブドウ球菌が検出された取去検査結果からも、食中毒のリスクが高まることは確かである。

以上のことから、家庭において食中毒予防3原則の1つである「細菌を増やさない」ことが非常に重要であることが再確認された。家庭によっては、そうざいを冷蔵保存し数日に分けて喫食する場合もあるが、今回の実験では冷蔵していても細菌の増殖を完全に防ぐことは難しいことが確認されたため、冷蔵庫に入れても安心せずに、当日中に食べることが望ましいことが示された。

また、製造時、特にスーパー等の未加熱そうざいにおいては、細菌汚染を最低限に抑制するため、調理場の交差汚染の防止、販売までの温度管理などの衛生管理の徹底が必要である。監視指導時の確認点として、調理器具の使い分け、調理工程による区画分け、作業動線の確保、跳ね水汚染の防止、製造・包装後の速やかな冷蔵、冷蔵ショーケースの定期的な温度チェックなどが挙げられ、的確で効果的指導により、施設の衛生管理の向上に繋がることを期待したい。

5 啓発活動

今回得られた知見については、まず製造時の監視指導に役立てるため、保健所の食品衛生監視員向けに報告会を実施するとともに、一般市民向けに、当研究所の広報紙である「北九州市保環研だより」(2023年4月発行)への掲載や、本市の公式SNSである「好きっちゃ北九州」(Twitter、Facebook、LINE)に投稿し(2023年7月12日)、夏本番前にタイムリーな食中毒予防の啓発に努めた(図3、4)。

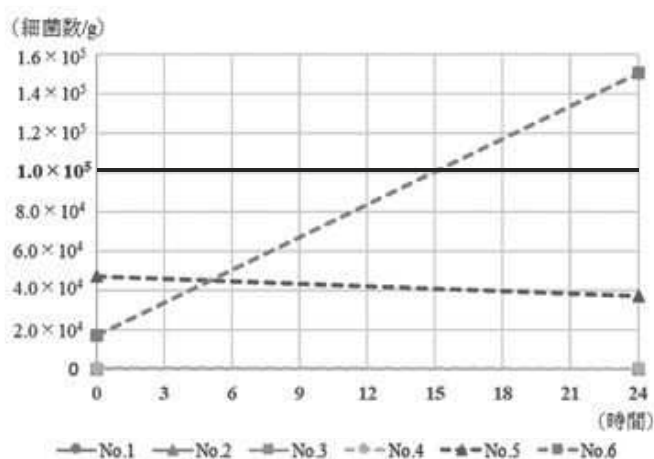


図2 冷蔵(4℃)での細菌数の経時変化



図3 北九州市環境研だより第4号
(抜粋)

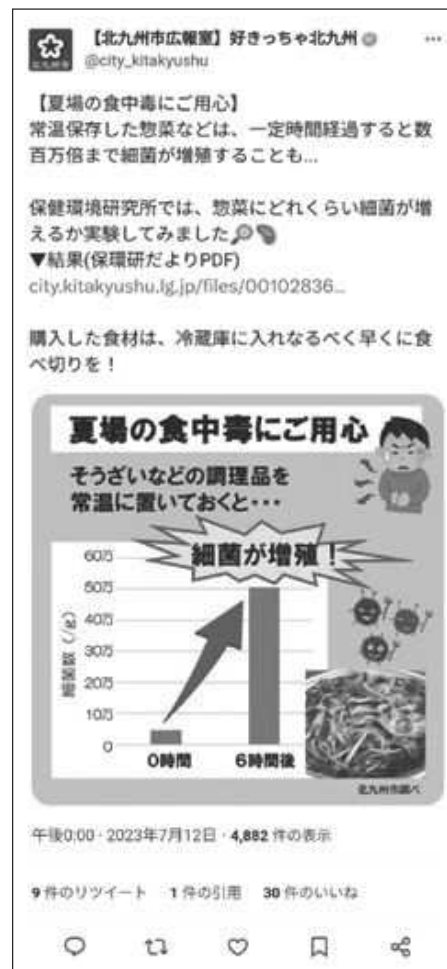


図4 好きっちゃ北九州 (Twitter)

〔参考文献〕

- 1) 神眞知子、森本敬子、高橋由美、服部絹代、松下秀、吉田靖子：各種市販食品の細菌検査成績(1993年度～2002年度)、東京健康研セ年報、55 (2004)
- 2) 石井常次、長谷 篤、西川禎一、来住輝彦、大崎勇一郎、早川和成、天堀和衛、田中義治：あえものを中心とした細菌汚染防止に関する一考察、生活衛生、35 (2)、69-79 (1991)
- 3) 伊藤武、坂井千三：主な食中毒起因細菌の食品中における増殖について、食品衛生学雑誌、30、123-137 (1989)
- 4) 齋藤美香、永井裕美、河合優子、松本裕之：冷蔵食品から検出されたPseudomonas属細菌について、群馬県食品安全検査センター業務報告、9、39-40 (2022)
- 5) 泉秀実：カット野菜の微生物学的品質と微生物制御、日本食品科学工学会誌、52 (5)、197-206 (2005)
- 6) 古賀舞香、中野朝美、田上紗弥加、光安志織、松永典久、佐野由紀子：複数の型が検出されたListeria monocytogenes集団感染事例—福岡市、IASR、43 (8)、195-196 (2022)

薬剤耐性菌におけるNGS解析の現状と課題

北九州市保健環境研究所 ○上野 可南子、中村 悦子、博多屋 ちなみ、濱田 建一郎

1 はじめに

近年、新型コロナウイルスのゲノム解析を実施するため、本市を含む多くの地方衛生研究所において次世代シーケンサー(NGS)が導入された。NGSを用いた全ゲノム解析(WGS)には、遺伝子情報の「解読」と解読したデータの「解析」の2つの作業が必要である(図1)。新型コロナウイルスについては、どちらの作業も標準化された手法が既に完成し、広く周知・活用されているが、それ以外の多くの病原体においては、現時点では、手法の標準化には至っていない状況である(表1)。

今後、WGSが不可欠とされている病原体の一つとして、「薬剤耐性菌」が注目されている。今回、薬剤耐性菌について、国立感染症研究所が「解読」した遺伝子配列データを利用し、複数の解析ツールを用いて「解析」を試みたところ、当研究所においても活用の可能性が示された。また、WGSの活用に向けては3つの課題が明確になったので、解析結果と併せて報告する。

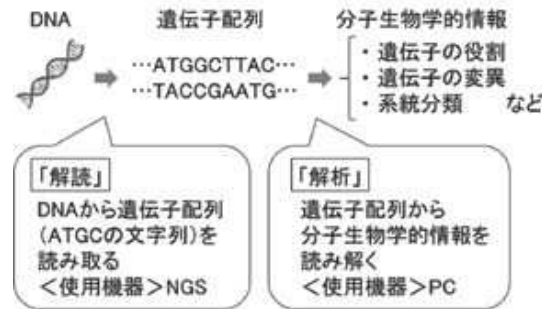


図1 「解読」と「解析」

表1 標準化された手法の有無

	標準化された「解読」手法	標準化された「解析」手法
新型コロナウイルス	あり(※1)	あり(※2)
その他多くの病原体	なし	なし

(※1) 国立感染症研究所が公開している「新型コロナウイルスゲノム解読プロトコル(Qiagen社QiaSEQ FX編)」

(※2) 国立感染症研究所が開発・管理しているWeb解析システム「COG-JP」

2 解析方法

解析には、当研究所に搬入された薬剤耐性菌のうち、カルバペネム耐性腸内細菌目細菌であった大腸菌1株について、国立感染症研究所が解読した遺伝子配列データを用いた。

細菌の遺伝子情報には、染色体由来のものとプラスミド由来のものがあるため、図2のとおりS1 nuclease処理後に電気泳動にて染色体とプラスミドを分子量の大きさで分離した。それぞれの切り出しDNAバンドのゲノム解読が行われたものを、解析項目に応じて、表2に示した各種解析ツールを使用し解析を実施した。

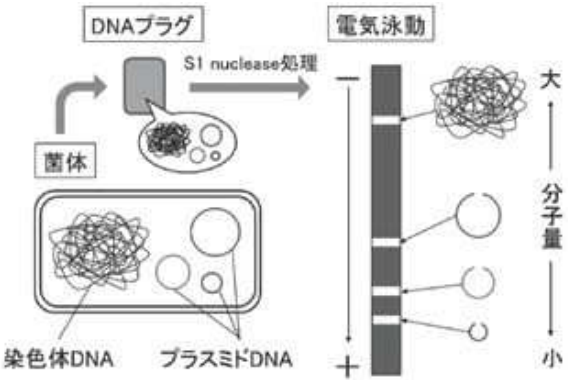


図2 染色体とプラスミドの分離方法

表2 解析項目とWeb解析ツール

解析項目	Web解析ツール
菌種同定、塩基長の確認	DFAST (FastANI)
血清型の決定	SerotypeFinder 2.0
MLST法によるST型の決定	PubMLST
cgMLST法によるcgST型の決定	cgMLSTFinder 1.2
fimH型の決定	FimTyper 1.0
プラスミドのInc typeの決定	PlasmidFinder 2.1
薬剤耐性遺伝子の検出	ResFinder 4.4.2

3 解析結果

(1) 菌種同定

菌種同定では、既知の細菌の遺伝子配列と比較してどの菌種と似ているか、相同性検索を行う。今回、2種類の相同性検索を行った結果、1つ目は「*Shigella boydii*」、2つ目は「*Escherichia coli*」が最も高い相同性(95%以上)を示した。*Shigella*と*E. coli*の遺伝子の相同性は平均85%以上であるため、遺伝子配列の比較だけでは判定が難しいとされている¹⁾。そこで、菌を培養し生化学性状(ガス産生性や運動性など)の試験を実施したところ、*E. coli*の性状を示したため、対象菌株の菌種は「*E. coli*」であると判定した(表3)。

(2) 菌株の型別決定

通常、菌株の型別決定では市販の血清キットを用いたり、従来のシーケンサーにより特定の配列のみを解読・解析する方法が取られているが、今回はNGSで解読された全ゲノム配列を活用し、各種解析ツールを用いて様々な型別決定を行った。解析の結果、血清型はO99:H6、MLST法によるST型は68、cgMLST法によるcgST型は23425、*fimH*型はH49に型別された(表3)。この中で、cgMLST法による解析は対象とする遺伝子領域が広いいため、NGSを用いた全ゲノム配列が必要となるが、その他の型別と比べてより高い識別能であるため、院内感染など狭い範囲での菌株比較が可能となる。

表3 解析結果

菌種	血清型	ST	cgST	fimH型	染色体		プラスミド			
					サイズ (bp)	薬剤耐性 遺伝子	No.	サイズ (bp)	Inc type	薬剤耐性遺伝子
<i>E. coli</i>	O99:H6	68	23425	H49	5,321,708	なし	P1	30,552	IncX4	なし
							P2	63,835	No hit	なし
							P3	136,217	IncFII	<i>bla</i> _{NDM-1} 、 <i>bla</i> _{OXA-1} 、 <i>bla</i> _{CTX-M-15} 、 <i>aadA2</i> 、 <i>aph(6)-Id</i> 、 <i>aph(3'')-Ib</i> 、 <i>aac(3)-IIa</i> 、 <i>aph(3')-Ia</i> 、 <i>mph(A)</i> 、 <i>catB3</i> 、 <i>sul1</i> 、 <i>sul2</i> 、 <i>tet(B)</i> 、 <i>dfrA12</i>

(3) プラスミドの型別決定

プラスミドの複製に関与する遺伝子配列に基づく Inc type による型別を行ったところ、3つのプラスミドのうち1つはIncX4、もう1つはIncFIIであった(表3)。IncFIIを含むIncFグループは、*E. coli*に広く分布しているプラスミドであるが、プラスミドは菌種を越えて伝達されることが知られており、近年、プラスミドを介した薬剤耐性遺伝子の拡散が問題視されているため、薬剤耐性菌におけるプラスミド解析は重要である。

(4) 薬剤耐性遺伝子の検出

解析の結果、IncFIIプラスミド上に、*bla*_{NDM-1}、*bla*_{OXA-1}、*bla*_{CTX-M-15}の3つのβ-ラクタマーゼ遺伝子が検出され、このうちの1つ、*bla*_{NDM-1}がカルバペネム耐性遺伝子であった。さらに、表3のとおり、その他にも多数の薬剤耐性遺伝子を保有していることがわかった。

なお、解析結果のデータ上では、染色体にも薬剤耐性遺伝子が存在していたが、妥当性評価のため散布図を作成した結果(図3)、図2に示した電気泳動による分離の際のプラスミド配列の紛れ込みと判断した。

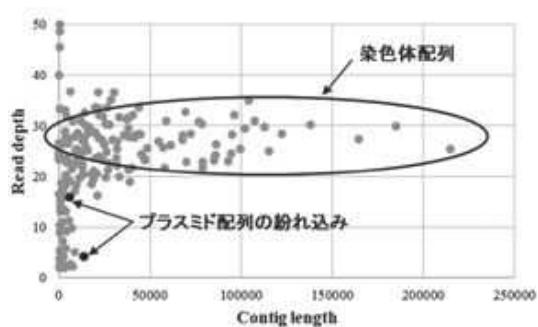


図3 染色体配列とプラスミド配列のプロット

4 今後の課題

NGSにより得られた配列データを解析することで、菌種同定、菌株の型別決定、プラスミドの型別決定、薬剤耐性遺伝子の検出など、従来は各種検査をする必要があった多くの情報を一度に得ることができるようになり、より高い識別能の型別決定を行うことができた。一方で、実用化に向けては以下の3つの課題が明確になった。

(1) 従来法と比べて高コスト

WGSにかかる試薬代や機器の保守契約料、解析ソフトウェアなどの必要経費は高額である。しかし、菌株比較に不可欠な従来法(PFGE)の機器はすでに販売終了しており、修理サポートも2023年で終了したため、今後、院内感染発生時の解析は、必然的にWGSへと移行していくことになる。

(2) 情報解析が複雑

解析を行うには、まずNGSで得られた遺伝子配列が使えるデータかどうか、量と質を精査したうえで、目的に合わせて種々の解析ツールやコマンドの選択・設定を行う必要があり、情報解析が複雑である。さらに、今回の菌種同定や、染色体配列へのプラスミド配列の紛れ込みのように、得られた解析結果が全て正しいとは限らないため、妥当性を評価する必要がある。そのためには、情報解析の知識に加えて、NGSの原理の理解や、細菌の知識も必須であり、技術の習得には時間を要する。

(3) 標準化された解析手法・解釈基準がない

薬剤耐性菌におけるWGSの研究は活発に行われているものの、解析手法や解析結果の解釈基準については、まだ検討が必要な段階である。使用する解析ツールや設定によって解析結果が多少異なってくるため、研究所間での比較のためにも、統一・標準化された手法が望まれる。

以上の課題はあるものの、今後、WGSへと移行していくことは必至である。当研究所においても、最新情報の収集、NGSを用いた読解及び解析技術の研鑽など鋭意進める必要があると考えている。

謝辞

本解析にあたりゲノム読解データのご提供だけでなくご指導及びご助言いただきました、国立感染症研究所薬剤耐性研究センター及び病原体ゲノム解析研究センターの先生方に深謝いたします。なお、本研究はAMEDの課題番号JP23fk0108604の支援を受けました。

参考文献

- 国立感染症研究所: 赤痢菌検査・診断マニュアル(平成24年6月改訂)

エンテロウイルスD68検査法の導入と改良

保健福祉局保健環境研究所 微生物部門 ○田代 拓樹、小畑 勝也、菊地 明日香(現・環境局環境監視課)

1 はじめに

5類感染症全数把握疾患である急性弛緩性麻痺(acute flaccid paralysis: AFP)は、ウイルスなどの種々の病原体の感染により弛緩性の運動麻痺症状を呈する感染症である。主な原因ウイルスの1つにエンテロウイルスD68(以下、EV-D68)があるが、EV-D68は地方衛生研究所で検査することが求められている¹⁾。

エンテロウイルス属全般を検出する手法としてCODE-HOP法があるが、CODE-HOP法を使用してEV-D68の検査をした場合、血清型の同定が困難な検体が確認されている²⁾。そのため、EV-D68の検査では高感度検出法の使用が推奨されているが、当所においては検査体制が整備されていなかった。EV-D68高感度検出法は厚生労働科学研究班が作成した「急性弛緩性麻痺を認める疾患のサーベイランス・診断・検査・治療に関する手引き」(以下、手引き)³⁾などに記載がある。手引きには2Step-PCRの手法が記載されているが、本研究はこれを改良し、1Step-PCRの手法を開発したうえで本市におけるEV-D68の検査体制を確立したので報告する。

材料と方法

1. ウイルスRNA抽出

各検査法の陽性コントロールとして、伝染性紅斑の症例により病原体サーベイランスで搬入され、CODE-HOP法によりEV-D68と判明した検体を使用した。RNA抽出には、QIAamp Viral RNA Mini Kit(QIAGEN)を使用した。RNA抽出操作はプロトコルに従い行った。

2. EV-D68遺伝子検出法

1) 1Step-PCR法

1Step-PCR法はQIAGEN OneStep RT-PCR Kit(QIAGEN)試薬を用いて行った。また、プライマーは蕪木ら²⁾のプライマーを参考にした(表1)。すなわちRT-PCR Buffer(QIAGEN) 10μl、dNTP Mix(QIAGEN) 2μl、RT-PCR Enzyme Mix(QIAGEN) 2μl、RNase Inhibitor(Takara) 0.2μl、50μM: EVD68-F1 0.5μl、50μM: EVD68-R 0.5μl、RNase-free滅菌精製水29.8μlを混合した反応液にテンプレートとしてRNA 5μlを加え全量50μlとした。sn-PCRの反応液は、Forwardプライマーに50μM: EVD68-F1 0.5μl、RNase-free滅菌精製水33.8μl、テンプレートとして1st-PCR産物 1μlを用い、他は1st-PCRと同様とした。PCR条件は、1st-PCR、sn-PCRともに、50℃ 30min、95℃ 15minの反応後に94℃ 30sec、62℃ 1min、72℃ 1minの反応を40サイクル行い、72℃ 10min反応させた後、冷却温度を4℃とした。機器はGeneAtlas G02(astec)を使用した。反応終了後、1.5%アガロースゲ

ル電気泳動により1st-PCR 779bp、sn-PCR 424bpのバンドを認めたものを陽性とした。

表1 1Step-PCR法用プライマー

Primer	Sequence
EVD68-F1	5'-AATGCAGTTGAAACGGGHHGCAA-3'
EVD68-F2	5'-CAATGTTTGTTRCCCACTGGTGC-3'
EVD68-R	5'-CTVTCTCTATTGCCAATTATRG-3'

2) 2Step-PCR法

手引きに記載されている、EV-D68高感度検出PCRの「b.酵素にEx-Taq Hot start version(Takara)を使用した場合」に準拠し行い、1.5%アガロースゲル電気泳動により1st-PCR 779bp、sn-PCR 424bpのバンドを認めたものを陽性とした。

3) CODE-HOP法

ヘルパンギーナ病原体検査マニュアル(国立感染症研究所)⁴⁾記載の「2-2.CODEHOP PCRによるエンテロウイルス同定(US Patent 7,714,122B2, May11,2010)」に準拠し行い、1.5%アガロースゲル電気泳動により1st-PCR 約760bp、sn-PCR 約370bpのバンドを認めたものを陽性とした。

3. 各検査法の検出感度の検討

陽性コントロールより抽出したRNAを10倍段階希釈した溶液(原液、 10^{-1} ~ 10^{-9})を作成し、1Step-PCR法、2Step-PCR法、CODE-HOP法の各検査法の検出感度を比較した。

4. 行政依頼検査

急性弛緩性麻痺の症例として行政依頼検査で搬入された2例において、本研究で確立した1Step-PCR法を用いて検査を行った。

5. 塩基配列の決定

陽性コントロール及び行政依頼検査で搬入された検体について、今回開発した1Step-PCR法で得られた増幅産物をQIAquick PCR Purification Kit(QIAGEN)にて精製し、Applied Biosystems SeqStudioジェネティックアナライザを用いたdye terminator cycle sequencing法で塩基配列を決定した。得られた塩基配列はMEGA11を用いて、Neighbor-Joining法による系統樹解析を行った。系統樹解析に用いた株および遺伝子型の分類は既報を参考にした⁵⁾。

結果と考察

1. 各検査法の検出感度

EV-D68 RNA希釈溶液(原液、 10^{-1} ~ 10^{-9})を用いて、1Step-PCR法、2Step-PCR法、CODE-HOP法の各検査法による検出感度の比較を行った。1Step-PCR

た結果、今回検出した株はClade B3に分類され、近年東京よりも米国で検出された株に近縁であった(図2)。

Phylogenetic tree of SARS-CoV-2 sequences from China, showing three main clades: Clade B3, Clade B2, and Clade B1. The tree is rooted at the bottom with AF081348:EV-D68/USA/1902. Clade B3 includes sequences like CP572036:EV-D68/USA/2022 and LC744414:EV-D68/Taipei/2022. Clade B2 includes KP133818:EV-D68/USA/2014 and KJ082502:EV-D68/USA/2014. Clade B1 includes KP145768:EV-D68/USA/2014 and KJ081239:EV-D68/USA/2014. A scale bar of 0.001 is shown at the bottom left.

図2 EVD-68遺伝子の分子系統樹

以上の結果から、EV-D68検査において今回開発した1Step-PCR法を導入することで、従来の方法より検出感度の高い検査が可能となった。

参考文献

- 1)令和3年9月30日 厚生労働省事務連絡「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第12条第1項及び第14条第2項に基づく届出の基準等について」の一部改正に伴う検査検体の送付について
- 2)蕪木康郎, 上野裕之, 嘉悦明彦, 泊賢太郎, 菊地孝司, 小堀すみえ, 宮崎元伸. 臨床検体からエンテロウイルスD68型を特異的に検出・同定するためのプライマー開発とRT-Seminested PCR条件の決定. 感染症学雑誌, 2017, 91 376-386
- 3)厚生労働科学研究費補助金 新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業「エンテロウイルス等感染症を含む急性弛緩性麻痺・急性脳炎・脳症の原因究明に資する臨床疫学研究」研究班: 急性弛緩性麻痺を認める疾患のサーベイランス・診断・検査・治療に関する手引き 第2版(2022年2月)
- 4)清水博之, 西村順裕, 吉田弘, 板持雅恵, 山下照夫, 石橋哲也. ヘルパンギーナ病原体検査マニュアル. 国立感染症研究所
- 5)石津桃子, 眞築城徳之, 岡野祥, 柿田徹也, 久手堅剛, 平良遥乃, 高良武俊, 照屋盛実, 喜屋武向, 張慶哲, 竹本のぞみ, 上原健司. IASR, 2023, 44, 60-61
- 6)多屋馨子.エンテロウイルスD68の疫学～急性弛緩性麻痺を中心に～, ウイルス, 2018, 68, 161-164



3. 分子系統樹解析

– 42 –

市内におけるネコ及びイヌのSFTSウイルス保有状況調査

○田口 裕也¹、泉田 園子¹、田代 拓樹¹、小畑 勝也¹、永井 美映²、川合 晶子²
 (¹保健環境研究所、²動物愛護センター)

1 はじめに

SFTS（重症熱性血小板減少症候群）は、ブニヤウイルス科フレボウイルス属に分類されるSFTSウイルスによるマダニ媒介性全身性感染症であり、国内におけるヒトの致死率が27%と非常に高い。

2013年1月に日本で初めてSFTS患者が報告され、2017年には、ネコやイヌにおいてもSFTSの発症が確認された。また、これまでヒトは、ウイルスを有するマダニに咬まれてSFTSウイルスに感染し、SFTSを発症するものと考えられていたが、SFTSに類似する症状を呈したネコに噛まれたり、イヌとの接触によりSFTSを発症した患者が確認された。さらに、国内では、2022年9月までに、ネコ560症例、イヌ36症例がSFTSと確定診断され、特にネコでは、2019年以降、毎年100を超える発症例が確認されている。

このことから、コンベンショナルPCR（以下、cvPCR）を用いて、市内におけるネコ及びイヌのSFTSウイルス保有状況の調査を行った。また、より迅速に結果を出すことを目的として、リアルタイムPCR（以下、qPCR）の導入を検討したため、併せて報告する。

2. cvPCR法によるネコ等のSFTSウイルス保有状況調査

【材料と方法】

1 試料

2023年4月～10月までに動物愛護センターに収容されているネコ6匹、イヌ3匹から採血した血液を試料とした。

2 ウイルスRNA抽出

3,000rpm 15分間遠心分離を行った試料の上清（血漿）140μLから、QIAamp Viral RNA Mini Kit（QIAGEN）を用いてウイルスRNAを抽出した。

3 プライマーの設計と調製

既報(Park et al,2021^{*1})を参考に、S分節特異的な2種類のプライマー（表1）を10μMに調製したものをPCRプライマーとして設計した。

表1 PCRに用いた各プライマー情報

プライマー		PCR産物のサイズ
set1	SFTSV-S2-200s	201bp
	SFTSV-S2-360a	
set2	SFTSV-S7F	125bp
	SFTSV-S7R	

4 PCR法

PCR試薬として、QIAGEN One step RT-PCR kit(QIAGEN)を用いて、表2のと通りの条件下でPCRを行った。得られたPCR産物5μLを用いて2%アガロースゲル上で電気泳動を行い、増幅産物が想定したバンドサイズであるか確認した。なお、陽性コントロールは、福岡県保健環境研究所より分与されたものを使用した。

表2 PCR法によるSFTSウイルス遺伝子検出法

S2-200s/S2-360a			S7F/S7R		
反応液組成 (μL)	添加量 (μL)	反応条件	反応液組成 (μL)	添加量 (μL)	反応条件
5×buffer	5		5×buffer	5	
dNTP Mixture	1	50℃ 30分	dNTP Mixture	1	50℃ 30分
Primer 200s (10μM)	1.5	95℃ 15分	Primer 200s (10μM)	0.5	95℃ 15分
Primer 360a (10μM)	1.5	94℃ 30秒	Primer 360a (10μM)	0.5	94℃ 30秒
Enzyme mixture	1	60℃ 30秒	Enzyme mixture	1	60℃ 30秒
DW	14	72℃ 1分	DW	16	72℃ 30秒
Template RNA	1	72℃ 7分	Template RNA	1	72℃ 5分
Total	25	12℃ overnight	Total	25	12℃ overnight

【結 果】

すべてSFTS陰性だった(図1)

1 プライマー・プローブの設計と調製

プライマー及びプローブは、既報 (Yoshikawa et al.,2014^{*2}) を参考に設計した。また、試薬の添加をより簡便にするために、事前に20×プライマー・プローブ混合液を調製した(表3)。

2 qPCR法

qPCR試薬として、One Step PrimeScript™ III RT-qPCR Mix (TaKaRa社、以下、試薬A) または TaqMan™ Fast Virus 1-Step Master Mix (ABI社、以下、試薬B)を用いた。また、7500 Fast Real Time PCR system (ABI)を用いて、表4のとおりqPCR反応を行った。

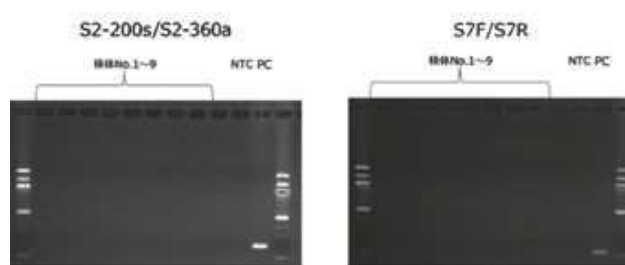


図1 ネコ等のPCR産物の電気泳動図

表3 qPCRに使用したプライマー及びプローブ情報

標的領域	プライマー及びプローブ	試薬Aのプライマー・プローブ混合液 (20倍)			試薬Bのプライマー・プローブ混合液 (20倍)		
		反応液組成	添加量 (μL)	終濃度 (nM)	反応液組成	添加量 (μL)	終濃度 (nM)
S分節	Primer F	Primer F (100μM)	4	200	Primer F (100μM)	8	400
	Primer R	Primer R (100μM)	4	200	Primer R (100μM)	8	400
	Taqman Probe	Taqman Probe (100μM)	4	200	Taqman Probe (100μM)	4	200
		水もしくはTE buffer	88		水もしくはTE buffer	80	
		Total	100		Total	100	

表4 試薬A、BによるqPCR法によるSFTSウイルス遺伝子検出法(7500Fast Real Time PCR system (ABI)の場合)

反応液組成	添加量 (μL)	試薬A	反応条件	反応液組成	添加量 (μL)	試薬B	反応条件
試薬A	10	逆転写反応 PCR反応	52℃ 5分	試薬B	5	逆転写反応 PCR反応	50℃ 5分
20x Primer Probe mix	-		95℃ 10秒	20x Primer Probe mix	1		95℃ 20秒
ROX Reference Dye II (50 x)	0.4		95℃ 5秒	2x	1.3		95℃ 3秒
水	7.6		60℃ 30秒	Template RNA	1		60℃ 30秒
Template RNA	-	×40サイクル		Total	20	×40サイクル	
Total	20						

【結果】

試薬A、Bいずれも試験系が成立し、試薬Aの方が試薬BよりCt値が約1小さかった。また、PCRの反応効率等に問題はなかった。(図2)

4. 考 察

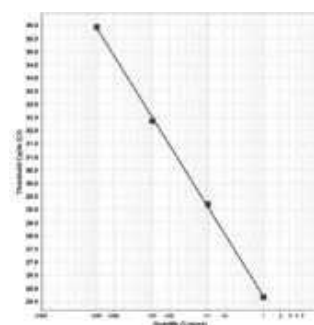
今回、ネコ等から採取された血液9検体は、cvPCRの結果から、SFTSに感染はしていなかった。ただし、抗体検査は行っていないため、過去にSFTSに感染していたかは不明である。

次に、qPCRを導入の検討のため、Taqman probeを用いて確認したところ、試薬Aの方が試薬Bより感度が良く、PCRの反応効率も問題ないことから、qPCRで検査する際は、試薬Aを用いることが良いと考えられる。さらに、反応時間や試薬調製等に係る時間を考慮すると、qPCRは検査効率が良いと考えられる。

	Ct値	反応時間	傾き	相関係数
試薬A	25.94	約46分	-3.398	0.999
試薬B	26.97	約45分		

図2 試薬A、BによるqPCR検査結果

※Ct値は、サンプル中の標的核酸の量が多いほど小さくなる。また、検量線の傾きは、-3.6~-3.1、相関係数は0.98以上が目安となる。



試薬Aの検量線

5. 総 括

今後、さらに検体を収集し、SFTSを検査することで、市内のSFTS発生状況を速やかに把握できるようになり、その際に、qPCRの活用が重要になると考えられる。また、陽性となった検体については、更なる情報入手のために遺伝子解析を行い、その関係性を把握することが重要と考えられる。

【参考文献】

1. Diagnostic system for the detection of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus RNA from suspected infected animals (Park et al.,2021)
2. Sensitive and Specific PCR Systems for Detection of Both Chinese and Japanese Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Virus Strains and Prediction of Patient Survival Based on Viral Load (Yoshikawa et al.,2014)

梅毒感染者の増加に伴う北九州市保健環境研究所の取組

保健福祉局保健環境研究所 ○小畑 勝也、田口 裕也、田代 拓樹、泉田 園子、村井 良次¹
(¹現 若松区役所保健福祉課)

1 はじめに

梅毒は梅毒トレポネーマという病原体により引き起こされる感染症で、主に性的接触により、口や性器などの粘膜や皮膚から感染する感染症である。

国内の梅毒感染者数は、図1のとおり令和元年から令和2年に一旦減少したものの、令和3年以降大きく増加しており、令和5年は第46週(11月13日～19日)の時点で昨年一年間の報告数を超過している。

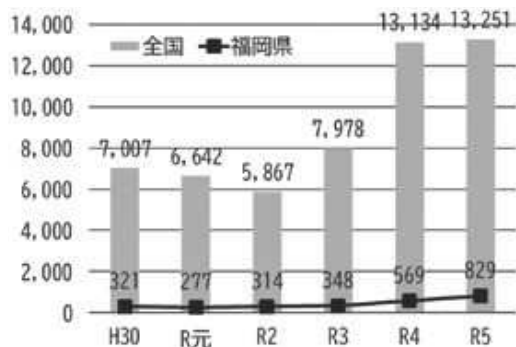


図1 感染症法に基づく梅毒報告数(R5.11.19現在)

梅毒は、早期の薬物治療による完治が可能である一方で、感染しても無症状であることが多いことから、感染の拡大を抑えるためには「梅毒感染者を早期探知し、医療機関の受診及び治療を促すこと」が重要である。

2 本市が行う性感染症検査

(1) 「即日検査」と「通常検査」

国は梅毒をはじめとする性感染症の総合的な予防のための施策を推進するため、平成12年に性感染症に関する特定感染症予防指針を策定した。

この指針では「都道府県等は、保健所における性感染症の検査の機会確保に努めるとともに、住民が受診しやすい体制を整えることが重要である」とされていることから、本市では現在、表1のとおり「即日検査」と「通常検査」の2形態による性感染症検査を実施している。

いずれの検査も市民は原則無料で受検することができるが、梅毒については平日の午前に行っている「通常検査」を受検する必要があるため、日勤帯勤務の社会人には利用しづらいものとなっている。

表1 本市が実施している性感染症検査

■即日検査：採血から数十分後に受検者へ検査結果を直接口頭で伝える。

実施場所	実施日時		検査項目
北九州市保健所	第1月曜	17:00～19:00	HIVのみ
	6・12月:第1日曜	9:00～11:30	

■通常検査：採血日の一週間後に受検者へ検査結果を直接口頭で伝える。

実施場所	実施日時		検査項目
小倉北区役所	毎週火曜	9:00～11:00	HIV、 梅毒、クラミジア
八幡西区役所	毎週水曜	9:00～11:00	

(2) 通常検査における保健環境研究所の役割

通常検査は、図2のフローに従って実施しており、中でも保健環境研究所(以下、「保環研」という。)は梅毒の検査を担当している。



図2 通常検査の流れ

3 保環研が実施した梅毒に関する新たな取組

保環研が有する検査能力や病原体に関する知識を活かすことができ、かつ即実施可能である梅毒に関する取組を検討した結果、以下の2つの新たな取組の実施に至ったので報告する。

【取組1】保環研広報誌「保環研だより」での特集

【取組内容】

保環研では、令和4年7月から保環研の業務に関連した情報をわかりやすく、科学的・客観的に発信する広報誌「保環研だより」を四半期ごとに発行(市ホームページでPDFデータを公開)している。

「保環研だより」では毎号、感染症や環境問題等に関する最新の話題を特集記事にしており、第2号(2022年10月発行)において「梅毒の感染者が増えています！市の無料検査を受けてみませんか？」を取り上げた(図3)。

この特集記事では、市が従来行っている梅毒に関する市民啓発(報告数の推移、症状に関する情報、検査の案内等)に加え、「保環研の広報誌」であることを活かし、

- ・保環研が梅毒の検査を実施していること
- ・梅毒の検査方法と結果の解釈(結果の見方)

を掲載することで、本市の梅毒検査の透明化を図った。

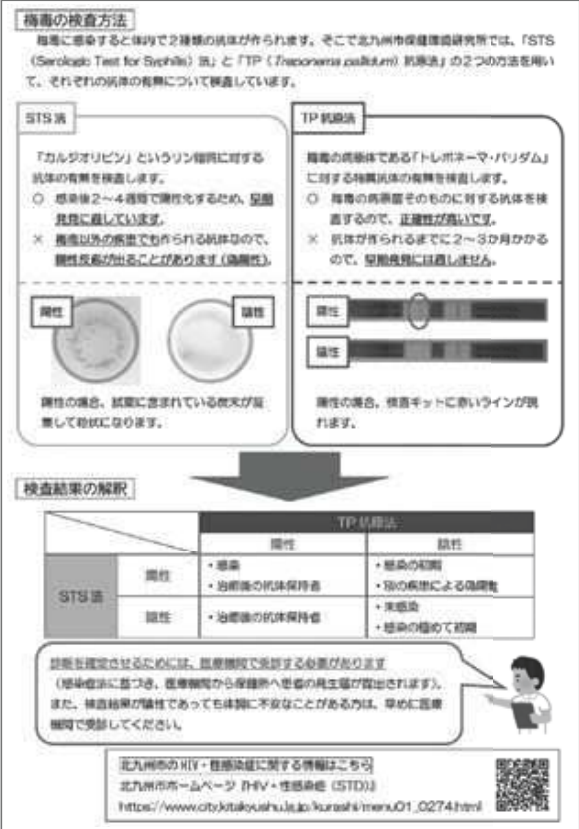


図3 保環研だより第2号特集記事(抜粋)

【課題】

「保環研だより」は創刊から2年弱のため、まだ市民の認知度が高いとは言えない。第5号(2023年7月)から市公式SNS「好きっちゃ北九州」での投稿を開始したが、今後も読者増加に向けた取組を検討・実施していく必要がある。

取組2 即日検査での梅毒検査の追加実施

【取組内容】

本市の梅毒検査では簡易検査キットを用いるため、表2のとおり短時間かつ安価で検査することができる。

表2 本市の梅毒検査で使用している簡易検査キット

検査方法	検査時間	単価(税込)※
STST法	8分	33円/検体
TP抗原法	15分	293円/検体

※購入実績額より算出。

そこで、梅毒検査の受検機会を増やすため、感染症医療政策課及び保健予防課と協議し、令和4年及び5年の12月(世界エイズデーに伴う啓発強化期間)の即日検査において、希望者を対象に梅毒の検査を追加実施(保健所に保環研職員を派遣)した。

実施に当たっては、図4のとおり保環研職員が梅毒の検査及び結果判定をすることで、検査の迅速性及び正確性を確保した。

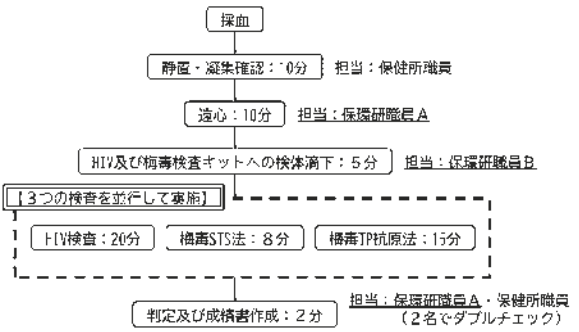


図4 令和5年度即日梅毒検査フロー

梅毒即日検査の受検率は表3のとおりで、梅毒検査のニーズが高いことが示唆された。

表3 即日梅毒検査の受検結果

実施日	来所者数	梅毒受検者数	梅毒受検率
R4.12.4(日)	26名	25名	96%
R5.12.3(日)	17名	16名	94%

※検査結果は非公表。

【課題】

通常の即日検査(HIVのみ)は、保健所の臨床検査技師2名で行っているが、梅毒を追加する場合、迅速性を担保するために3名以上で行うことが望ましい。今後、正式に事業化するには、人員の確保及び検査担当者への梅毒検査研修の実施等想定される課題の洗い出しを行い、感染症医療政策課、保健所及び保環研の三者で検討していく必要がある。

4 まとめ

今回、梅毒に関する2つの取組を実施し、「自治体の検査機関だからできること」がたくさんあることが分かった。今後も検査能力の向上や病原体に係る知見等の情報収集に努め、積極的に既存事業の見直しや新たな施策の提案をしていきたい。



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 51 号 (令和5年度)

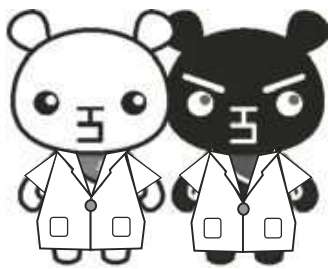
〒804-0082

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



©ていたん&ブラックていたん,北九州市