

## 新型コロナウイルスの各抗原検査キットの検体抽出液中からの NGS を用いたゲノム解析について

川越市保健所 衛生検査課

○中野孝宏 井野由莉恵

### 1 目的

新型コロナウイルス感染症は、積極的疫学調査の一環として全ゲノム情報によるゲノムサーベイランスを実施しているところであり、インフルエンザ/COVID-19 病原体定点の他、医療機関等に検体の提供の協力を依頼している。検査に用いる検体は主に鼻咽頭ぬぐい液や唾液であるが、医療機関等によっては新型コロナウイルス抗原検出キット（以下、「抗原検査キット」）の検体抽出液の残液しか提供できない場合がある。そこでいくつかの種類の抗原検査キットの検体抽出液からの PCR 及びゲノム解析について比較検討したので報告する。

### 2 実施内容

4 種類の抗原検査キット（クイックナビ、アルソニック、イムノエース、クイックチェイサー）を用いて、ウイルス輸送培地を対照として検討した。検体には Clade 及び PANGO 系統の異なる、Ct 値≒20 の検体を 10 検体用いた。ウイルス輸送培地には Ct≒27 になるように検体を添加し、各抗原検査キットの検体抽出液にもウイルス量が同程度の濃度になるように各検体を添加した。

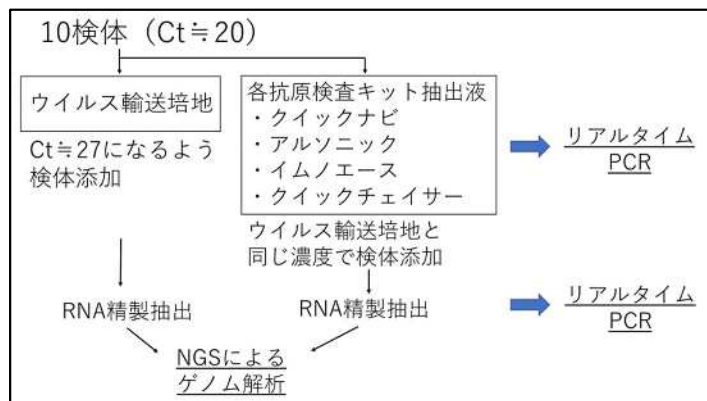


図1 <実験方法>

た。Takara SARS-CoV-2 ダイレクト PCR 検出キットを用いたリアルタイム PCR による遺伝子増幅の有無を確認するとともに、QIAamp Viral RNA Mini kit (QIAGEN 社) を用いて RNA を精製抽出し、同様の操作でリアルタイム PCR を実施した。その後、国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センターの新型コロナウイルスゲノム解読プロトコルに従い、次世代シーケンス (NGS) によってゲノムを解読し、Nextclade を用いて解析した結果の成績を比較した。

### 3 実施結果

各リアルタイム PCR、ゲノム解析過程の PCR 後の DNA 濃度およびゲノム解析の成績を表 1 に示す。

クイックナビの検体抽出液からリアルタイム PCR を実施したところ、すべての検体において遺伝子増幅が全く認められなかった。抽出 RNA からのリアルタイム PCR では遺伝子増幅が認められたが、ゲノム解析用 PCR 後の DNA 濃度は平均 0.9ng/μL と低く、シーケンス解析では解読リード深度 (read depth) は平均 38 倍、ゲノム被覆率 (coverage) は平均 59.1% と不良であった。

アルソニックの検体抽出液からのリアルタイム PCR では Ct 値が平均 33.3、抽出 RNA からのリアルタイム PCR では Ct 値 33.7 と増幅が認められたものの、ゲノム解析用 PCR 後の DNA 濃度は平均 1.0ng/μL と低かった。また、解読リード深度は平均 19 倍、ゲノム被覆率は平均 39.3% と不良であった。

イムノエースの検体抽出液でのリアルタイム PCR で Ct 値 27.7、抽出 RNA からのリアルタイム PCR で Ct 値 33.4 と増幅が認められた。ゲノム解析用 PCR 後の DNA 濃度は平均 10.7 ng/μL とやや低かったものの、解読リード深度は平均 818 倍、ゲノム被覆率は平均 97.9%と、信頼性の高い結果が得られた。

クイックチェイサーの検体抽出液においても、リアルタイム PCR で Ct 値 36.4、抽出 RNA からのリアルタイム PCR で Ct 値 29.5 と増幅が認められ、ゲノム解析用 PCR 後の DNA 濃度は平均 17.9 ng/μL、解読リード深度は平均 1419 倍、ゲノム被覆率は平均 99.3%であり、比較した抗原検査キットの中で最も信頼性の高い結果が得られた。

表 1 <リアルタイム PCR、ゲノム解析用 PCR 後の DNA 濃度及び NGS 解析結果>

平均値 (n=10)	ウイルス 輸送培地	クイック ナビ	アルソ ニック	イムノ エース	クイック チェイサー
検体抽出液 リアルタイム PCR (Ct 値)	26.7	N. D.	33.3	27.7	36.4
抽出 RNA リアルタイム PCR (Ct 値)	30.9	30.4	33.7	33.4	29.5
DNA 濃度 (ng/μL) (ゲノム解析用 PCR 後)	34.9	0.9	1.0	10.7	17.9
解読リード深度 (倍) (read depth)	2252	38	19	818	1419
ゲノム被覆率 (%) (coverage)	99.6	59.1	39.3	97.9	99.3

#### 4 考察及びまとめ

今回 4 種類の抗原検査キットを用いて検討を実施したが、抗原検査キットの種類によって、遺伝子増幅の量やゲノム解析の信頼性が大きく異なることがわかった。クイックナビやアルソニックはリード深度とゲノム被覆率は低かったが、イムノエースとクイックチェイサーではリード深度とゲノム被覆率が高く、ゲノム解析の検体として用いることができると考えられる。

クイックナビでは、検体抽出液中からのリアルタイム PCR で遺伝子増幅が認められず、抽出 RNA からでは遺伝子増幅が認められたのは、RNA 抽出過程の精製においてリアルタイム PCR の阻害因子が取り除かれたためと考えられるが、ゲノム解析過程の PCR において DNA の増幅があまり認められなかったため、他の阻害因子も抽出液に含まれることが考えられる。検体抽出液に含まれる成分には、緩衝剤、界面活性剤、保存剤等があり、これらの組成がゲノムの解析成績に影響を与える要因であると考えられるが、その詳しい組成については不明であった。

抗原検査キットの検体抽出液は PCR 検査での使用を想定したものではないため、ゲノム解析に適したものとは考えにくい。クイックチェイサーなどの一部の抗原検査キットからは信頼性の高いゲノム解析成績を得ることができるため、これらを用いることで疫学調査を行う上での検体の確保につなげることができる。また、抗原検査キットには新型コロナウイルス以外の病原体を対象としたものも多くあり、これらの検体抽出液を用いた検査にも利用が期待できる。

## *Anisakis simplex* s. s. と *Anisakis pegreffii* の ハイブリッド種が疑われたアニサキス食中毒検査事例について

川越市保健所 衛生検査課

○井野由莉恵 名取俊明 奥野純子 島田純一

### 1. はじめに

平成 24 年の食品衛生法施行規則の一部改正でアニサキスが食中毒の病因物質の種別として食中毒事件票に新たに追加されて以降、アニサキスによる食中毒件数は増加傾向にあり、令和 5 年の病因物質別食中毒発生件数は第 1 位（432 件/全 1,021 件中）※となっている。

当所に食中毒疑いで搬入されたアニサキス虫体で、*Anisakis simplex* sensu stricto（以下 As）と *Anisakis pegreffii*（以下 Ap）のハイブリッド種が疑われたアニサキス事例を経験したので、事例報告する。

### 2. 実施内容と検査結果

#### (1) 形態観察

穿歯 (+)、胃腸接合部が斜め、腸盲嚢 (-)、尾端鈍円、尾突起 (+) 等の特徴が観察され、アニサキス I 型幼虫の所見を示した。

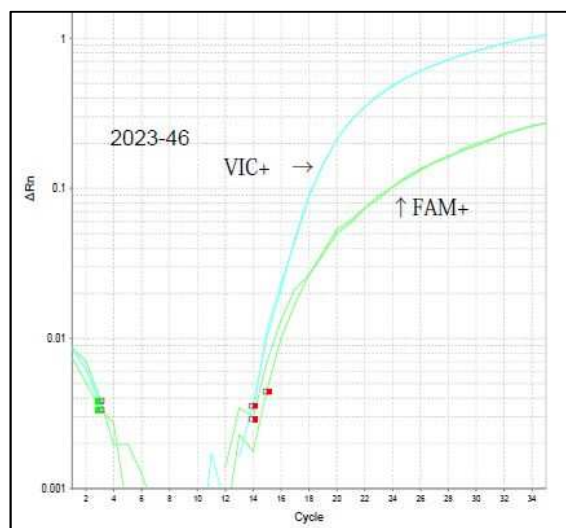
#### (2) 種同定リアルタイム PCR

出典\*\*に従い、当該虫体について、I 型幼虫の種同定リアルタイム PCR を実施したところ、T1B 系で不検出、T1SPB 系で VIC 検出、FAM がやや遅れて検出された。（表 1、図 1）このことから As/Ap のハイブリッド種の可能性が疑われた。

(表 1)リアルタイム PCR 判定

(図 1)リアルタイム PCR 波形 (T1SPB 系)

種	T1SPB系	T1B系
<i>A. simplex</i> s.s.	+VIC	-
<i>A. pegreffii</i>	+FAM	-
<i>A. berlandi</i>	+VIC	+VIC
ハイブリッド種 ( <i>A. simplex</i> s.s と <i>A. pegreffii</i> )	+VIC +FAM	-
<i>A. ziphidarum</i>	-	-
<i>A. typica</i>	-	-
<i>A. nascettii</i>	-	-
検体(2023-46)	+VIC +FAM	-



#### (3) シークエンス解析による種同定

当該虫体について、ITS 領域のシーケンス解析による種同定を行った。As と Ap は非常に近縁な種であり、ITS 領域における塩基配列では ITS1 の 5' 末端から 280 番目の塩基 (T または C) および 296 番目の塩基 (T または C) の違いにより区別することができ、両方の配列を有するものが As/Ap のハイブリッド種となる。

今回 ITS 領域 (NC5-NC2) におけるシーケンスでは 280 番目の塩基は Y (C/T)、296 番目の塩基は (T) となり (図 2)、典型的なハイブリッド種とは一部異なることが確認された。

また、ハイブリッド種の場合、ITS 領域の解析では As と Ap の種同定が困難なため、追加で mtDNAcox2 遺伝子 (cox2F-211-cox2R-210) のシーケンスを実施し、系統樹解析を実施したところ、As に一致したため、当該虫体は最終的に As と判定した。(図 3)

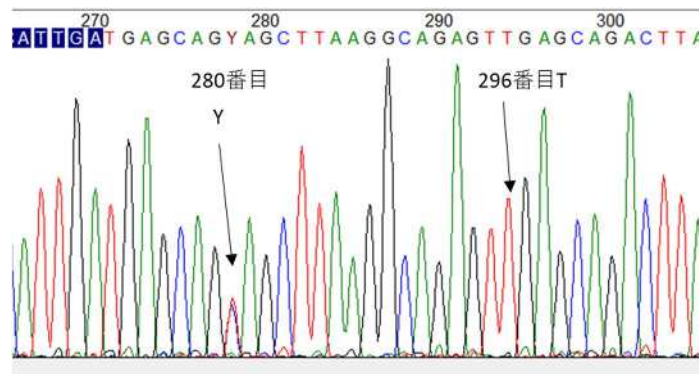


図 2 当該虫体の ITS1 領域のシーケンス波形

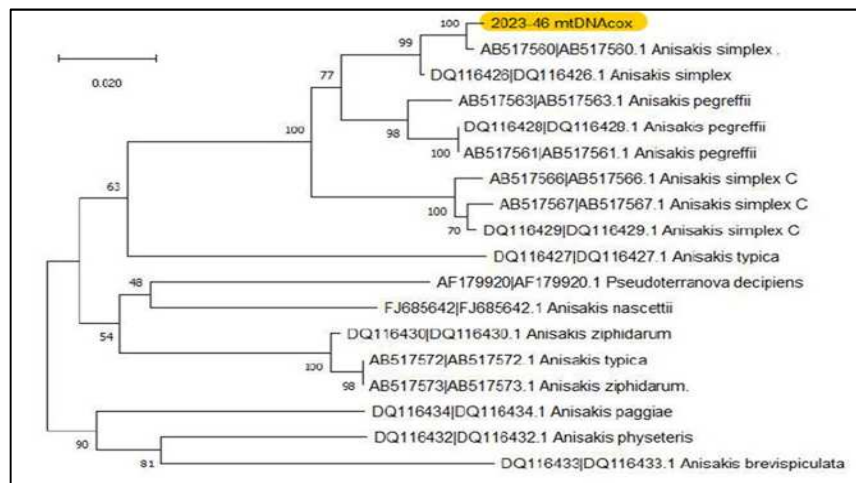


図 3 mtDNAcox2 遺伝子の系統樹解析結果

### 3. 考察とまとめ

本事例は、リアルタイム PCR (T1SPB 系) で VIC、FAM 両方に反応を示したことから、As/Ap のハイブリッド種を疑ったものである。T1SPB 系では probe において ITS1 領域 5′ 末端から 280 番目/296 番目の塩基を、VIC では T/T、FAM では C/C に設計することにより、As、Ap、ハイブリッド種を検出するものであるが、当該虫体においては、280 番目塩基のみ C と T の混合塩基であることから、FAM が遅れて検出されたものと推測された。

ハイブリッド型アニサキスについては、マルチコピー領域である ITS 領域に変異が生じて誕生する説や、同胞種間 (As と Ap) での交配から誕生する説などが提唱されているが、現時点でその発生機序については解明されていない。今回の事例についても、As の ITS 領域が塩基変異したもの、または、mtDNA 遺伝子が母性遺伝であることから、As の雌体と、祖先に Ap をもつ As または Ap の雄体から誕生した個体であるかもしれない。

#### 【参考文献】

- ※ 厚生労働省食中毒統計病原因物質別食中毒発生状況 平成 24 年～令和 5 年
- ※※ アニサキス検査マニュアル地衛全国協議会 マニュアル作成グループ編

## 川口市保健所における過去5年間（2019年4月～2024年3月）のカルバペネム耐性腸内細菌目細菌（CRE）病原体サーベイランス実施状況

川口市保健所 衛生検査課 ○粕谷晴美 萩原悠介 塩澤真由美  
平澤真樹子 荒島麻実 青木敦子

### 1 はじめに

カルバペネム耐性腸内細菌目細菌（CRE）感染症は、平成29年に厚生労働省通知「カルバペネム耐性腸内細菌科細菌（CRE）感染症等に係る試験検査の実施について」により、病原体サーベイランスとして耐性遺伝子等の検査を実施することとなったことから、川口市保健所衛生検査課では平成31年度（2019年度）からCRE病原体サーベイランスの検査を開始した。

今回は、2019年度から2023年度の5年分の検査結果をまとめたのでその概要を報告する。

### 2 対象及び方法

#### （1）対象菌株

2019年4月から2024年3月にCRE感染症として届出のあった97症例（例）、105株を対象とした。同一症例で複数菌株の搬入があり、症例数より菌株数の方が多かった。

#### （2）菌種同定

菌種の同定は、IDテスト・EB-20（島津ダイアグノスティクス）で行った。

#### （3）耐性遺伝子の検出

PCR法により以下の3タイプ18種の遺伝子検出を行った。

カルバペネマーゼ遺伝子6種：IMP型、NDM型、KPC型、OXA-48型、VIM型、GES型

ESBL遺伝子6種：CTX-M-1、2、8/25、9 group、TEM型、SHV型

AmpC β-ラクタマーゼ遺伝子6種：MOX型、CIT型、DHA型、ACC型、EBC型、FOX型

#### （4）β-ラクタマーゼ産生性試験

阻害剤を用いたディスク法により、メタロβ-ラクタマーゼ（MBL）、AmblerクラスAカルバペネマーゼ、AmpC β-ラクタマーゼ（AmpC）、基質拡張型β-ラクタマーゼ（ESBL）の産生性試験を行った。

#### （5）カルバペネマーゼ（CP）産生性試験

mCIM法及びCarba NPテストにより確認した。

### 3 結果及び考察

#### （1）患者臨床検体の種類（株数：105株）

由来となった臨床検体の種類別株数を図1に示した。血液が最も多く38株（36%）で、次いで尿24株（23%）、喀痰及び胆汁が各12株（11%）の順で多く、これらで全体の約8割を占めていた。

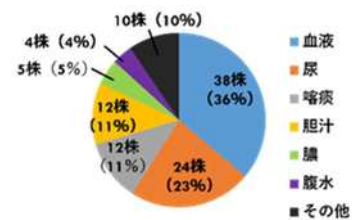


図1 臨床検体の種類

#### （2）CREサーベイランス実施結果（症例数：97例）

β-ラクタマーゼ産生性及び検出された耐性遺伝子を菌種別に表1に示し、菌種別のβ-ラクタマーゼ産生性の状況を図2に示した。AmpCの産生例が多かったのは*K. aerogenes* (51/52)、*E. cloacae* complex (23/25)、*C. freundii* complex (6/6)、*C. sakazakii* (3/3)であった。ESBL遺伝子を高率に保有していたのは、*E. coli* : CTX-M-

1(4/5)、*K. pneumoniae*: TEM型、SHV型(3/3)であった。また、*E. coli*ではCTX-M-1とともに検出された他の遺伝子によるβ-ラクタマーゼ産生性を併せ持つ症例があった。ESBL産生菌は1980年代当初はTEM型、SHV型を有する*K. pneumoniae*が主で2000年以降CTX-M型を有する*E. coli*が主となったとの報告があり、本結果も同様の傾向を示していた。CP産生性は6例で確認され、全例がCP耐性遺伝子を保有していた。その内訳は*E. cloacae* complex (2/25)、*E. coli*(1/5)、*K. pneumoniae*(1/3)、*K. oxytoca*(2/2)であった。

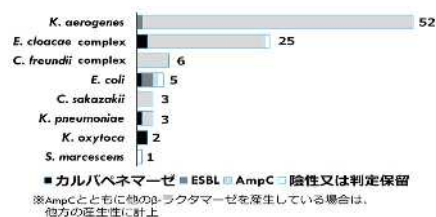


図2 β-ラクタマーゼ産生性

表1 β-ラクタマーゼ産生性及び薬剤耐性遺伝子

菌種	β-ラクタマーゼ産生性				薬剤耐性遺伝子		備考
	カルバペネマーゼ	ESBL	AmpC	陰性又は判定保留	遺伝子型 (CP、ESBL、AmpC)	検出数	
<i>K. aerogenes</i>	0	1※ <sup>1</sup>	51※ <sup>1</sup>	0	CTX-M-9 group 不検出	1 51	※1: 1例はESBLとAmpC同時産生
<i>E. cloacae</i> complex	2※ <sup>2</sup>	0	23※ <sup>2</sup>	1	EBC型 IMP型、EBC型 TEM型 不検出	14 2 1 8	※2: 1例はカルバペネマーゼとAmpC同時産生
<i>C. freundii</i> complex	0	0	6	0	DHA型 不検出	1 5	
<i>E. coli</i>	1	2※ <sup>3</sup>	3※ <sup>3</sup>	1	CTX-M-1 group CTX-M-1 group、NDM型 CTX-M-1 group、DHA型 CTX-M-1 group、CIT型 DHA型	1 1 1 1 1	※3: 2例はESBLとAmpC同時産生
<i>C. sakazakii</i>	0	0	3	0	EBC型 不検出	2 1	
<i>K. pneumoniae</i>	1	0	2	0	IMP型、SHV型 TEM型、SHV型、DHA型 SHV型、DHA型	1 1 1	
<i>K. oxytoca</i>	2	0	0	0	IMP型	2	
<i>S. marcescens</i>	0	0	0	1	不検出	1	

(3) CP産生腸内細菌目細菌(CPE)検出症例

CP産生性が確認されCP耐性遺伝子が検出された6例のCPEについて、年度別の検出状況を表2に示した。2019年度の1例目はNDM型遺伝子を保有していた。NDM型は海外型とされているが、本例は渡航歴のない症例であった。2021年度以降の5例はいずれもIMP型遺伝子が検出された。本邦で検出されるCPE遺伝子型の約8割はIMP型であり、本市も同様の傾向がみられた。また、届出時の検査では全症例がメロペネム(MEPM)及びセフメタゾール(CMZ)ともに耐性であった。この結果は、MEPM耐性のCRE症例でCP遺伝子を高率に保有していたという国立感染症研究所の報告と一致していた。

表2 CPE症例

年度	薬剤耐性遺伝子	届出基準		
		MEPM	IPM	CMZ
2019	NDM型、CTX-M-1group	R	R	R
	IMP型	R	I	R
2021	IMP型	R	I	R
	IMP型、EBC型	R	不明	R
2023	IMP型、EBC型	R	R	R
	IMP型、SHV型	R	R	R

4 まとめ

2019年度にCRE病原体サーベイランスを開始して以降、新型コロナウイルス感染症の影響により届出数は減少傾向にあったが、CPEは隔年ではあるがコンスタントに検出されている。

カルバペネマーゼ遺伝子はプラスミド上に存在することが多く、異なる菌種間の水平伝播が容易である。さらに、同一プラスミド上に他の薬剤耐性遺伝子が存在することも多いことから、多剤耐性菌となるリスクが高い。これらのことから、病院内アウトブレイク事例の多くがCPEによって発生しており、感染対策上非常に重要である。

今後もCPEの迅速な検出など、CREサーベイランス体制の継続強化を図るとともに、アウトブレイク発生時の対応として分子疫学解析手法の検討を進めていきたい。

## 令和6年度に発生した黄色ブドウ球菌を原因物質とする 食中毒事例における検査対応について

埼玉県衛生研究所 食品微生物担当

○吉田理沙 久保川竣介 古山裕樹 山崎悠華 千葉雄介 土井りえ 成澤一美

### 1 経緯

黄色ブドウ球菌はグラム陽性通性嫌気性球菌であり、嘔吐毒素(staphylococcal enterotoxin: SE)を産生する。本菌による食中毒は代表的な毒素型食中毒であり、食品中で菌の増殖に伴って産生されるSEを、食品と共に摂取することで嘔吐や下痢を引き起こす。SEは古典型(SEA～SEE)と新型に大別され、食中毒のほとんどは古典型SEによるものである。令和6年度に埼玉県内では2例の黄色ブドウ球菌による食中毒が発生し、そのうち1例は新型エンテロトキシンP(SEP)を原因とする非常に珍しいものであった。本発表では、これら2事例の概要及び検査結果について報告する。

### 2 実施内容

#### (1) 事例の概要

- ① 事例1: 令和6年5月28日、深谷市内の事業所から「複数の従業員らが嘔吐、下痢等の症状を呈している。」旨の通報が管轄保健所にあった。調査の結果、施設Aが5月26日に製造したおにぎりを喫食した、当該事業所職員の49名中14名(28.6%)が嘔吐、下痢、腹痛等の症状を呈したことが判明した。有症者の共通食は施設Aで製造されたおにぎりのみであり、おにぎりの具は、1名を除いて鮭おにぎりに限定されていた。発症者の潜伏期間は1時間半から18時間であり、潜伏期間別の患者発生数が一峰性(最多2時間)であったことから、共通する食事による単一ばく露が疑われた。
- ② 事例2: 令和6年8月20日、坂戸市内の医療機関から「社会福祉施設の児童が嘔吐の症状を呈している」旨の通報が管轄保健所にあった。調査の結果、施設Bが8月20日に調理したそばろ井(弁当)を喫食した、当該施設の児童19名中4名(21.1%)が嘔吐の症状を呈したことが判明した。有症者4名に8月20日以外の接点はなく、原因として考えられる共通食はそばろ井に限定されていた。発症者の潜伏期間は4時間半と一致しており、共通する食事による単一ばく露が疑われた。

#### (2) 検査方法

便検体について、食中毒細菌8項目及びノロウイルスの検査を実施した。また、症状や共通食等から強く疑われた黄色ブドウ球菌やセレウス菌について、追加で増菌処理を施し、検出率の向上を図った。食品残品及びふきとり検体は、黄色ブドウ球菌の検査を行い、食品残品については定量試験も実施した。検出された黄色ブドウ球菌は、エンテロトキシン型別試験及びコアグラージェ型別試験により分類したのち、Multilocus Sequence Typing (MLST)による分子疫学解析も実施した。

### 3 実施結果

#### (1) 事例 1

患者便 13 検体中 3 検体、従事者便 5 検体中 1 検体、食品残品 2 検体中 2 検体及びふきとり 10 検体中 1 検体（従事者手指）から黄色ブドウ球菌が検出された。なお、食品残品の鮭おにぎりは具の鮭と米の 2 検体に分けて検査を実施した。検出された黄色ブドウ球菌は、いずれもエンテロトキシン A（SEA）産生菌であった。また、1 検体を除いてコアグララーゼ型はⅢ型、MLST 解析で sequence type（ST）8 と判明し、事例内の分離株間で ST の一致が確認された。残りの 1 検体は患者便由来であり、コアグララーゼ型はⅣ型、MLST 解析では ST 30 と判明した。食品残品のおにぎりの黄色ブドウ球菌数は、具の鮭部分が  $3.2 \times 10^8$  CFU/g、米が  $6.2 \times 10^5$  CFU/g であり、鮭の菌数が高かった。

#### (2) 事例 2

患者便 4 検体中 2 検体、従事者便 3 検体中 1 検体、食品残品 4 検体中 4 検体及びふきとり 6 検体中 3 検体（従事者手指、冷蔵庫取っ手、冷凍庫取っ手）から黄色ブドウ球菌が検出された。黄色ブドウ球菌はいずれも、新型 SE であるエンテロトキシン P（SEP）遺伝子保有菌で、コアグララーゼ型はⅢ型であった。MLST 解析では全ての株が ST 7 と判明し、事例内の分離株間で ST の一致が確認された。また、食品残品のそばろ井の黄色ブドウ球菌数は  $1.4 \times 10^8$  CFU/g で、そばろ部分が  $7.0 \times 10^8$  CFU/g、米部分が  $9.9 \times 10^7$  CFU/g と部位による菌数の差はなかった。

### 4 評価

各事例において、患者便、調理従事者便、食品残品及びふきとり検体から共通に黄色ブドウ球菌が検出されたこと及び疫学情報から、埼玉県は、事例 1 では施設 A が製造したおにぎりを、事例 2 では施設 B が製造したそばろ井を原因食品と断定し、施設 A 及び B に対する営業停止処分を行った。

両事例において、患者の症状や共通食などから早期に黄色ブドウ球菌食中毒を疑い、増菌処理を併用して検体の検査にあたったことで、便や食品残品等からの速やかな菌検出につなげることができた。特に事例 2 で検出された SEP 遺伝子保有黄色ブドウ球菌は、これまでに食中毒の原因となった報告がない病原体であった。通常黄色ブドウ球菌の検査では古典型の SE 遺伝子を検査するが、当所では危機管理対応として新型 SE 遺伝子を検出するための試薬も用意していたため、これを用いて迅速に病原遺伝子を特定することができた。

また、コアグララーゼ型別試験や MLST 解析により、複数の便や食品残品等から得られた黄色ブドウ球菌株が遺伝的に同一のものであることが強く示唆された。一方事例 1 では、検出された黄色ブドウ球菌は全て SEA を保有していたものの、コアグララーゼ型や ST が異なる検体があり、検出された菌株間の同一性の確認に、これらの検査が有用であることが確認できた。

両事例より、疫学情報から推測される原因物質を想定し、検査に当たることが迅速かつ効果的な検査につながることを再認識した。また、通常の検査業務では実施していない新型エンテロトキシン型別試験やコアグララーゼ型別試験、分子疫学解析なども、状況に応じて実施することが食中毒の原因究明に重要であると考えられた。