東京都微生物検査情報

MONTHLY MICROBIOLOGICAL TESTS REPORT, TOKYO





東京都健康安全研究センター

http://idsc.tokyo-eiken.go.jp/

第41巻	題 名	頁	
第1号	東京都における性器クラミジア感染症の発生状況および	2	
	クラミジア・トラコマティス血清型の分布状況(2016-2018年)		
第2号	結核菌の遺伝子型別法の現状	5	
第3号	新型コロナウイルス(SARS-CoV-2)検査法	8	
第4号	東京都の侵襲性肺炎球菌感染症症例から分離された肺炎球菌の 血清型について(2013~2019年)	1 3	
第5号	病原体レファレンス事業に基づく病原体等の収集と解析結果 (平成31年度/令和元年度)	1 6	
第6号	食品からのメチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)分離状況	2 1	
第7号 の血清	東京都内の医療機関で分離された溶血性レンサ球菌感染症由来株 計型別及びStreptococcus pyogenesの薬剤感受性状況(2019年)	2 4	
第8号	2019年の全国及び東京都における食中毒発生状況	2 8	
第9号	次世代シーケンサーを用いた新型コロナウイルス(SARS-CoV-2) ゲノム解析の有用性	3 0	
第10-1号	東京都で分離されたサルモネラ (チフス菌・パラチフスA菌を含む) の血清型及び薬剤感受性について (2018~2019年)	3 3	
第10-2号	都内における流行性筋痛症事例からのヒトパレコウイルス3型の検出 (2019年)	3 8	
第11号	都内の動物病院を受診した犬・猫から分離されたESBL産生大腸菌について(2017~2018年度)	4 0	
第12-1号	新型コロナウイルス(SARS-CoV-2)における抗体検査について	4 2	
第12-2号	新型コロナウイルスの変異株(N501Y変異ウイルス)の検査について	4 5	

-第1号-

東京都における性器クラミジア感染症の発生状況およびクラミジア・トラコマティス血清型の分布状況(2016-2018 年)

東京都健康安全研究センター 微生物部 病原細菌研究科 水戸部 森歌

1. 性器クラミジア感染症

性器クラミジア感染症はクラミジア・トラコマティス (*Chlamydia trachomatis*: CT) の感染によって引き起こされる性感染症である。世界的に罹患者数が多く、わが国では感染症法で五類感染症(定点把握疾患)に指定されている。

性交渉時の接触感染がCTの主たる感染経路である。男性では尿道炎の起因病原体であるが通常は無症状であり、女性では子宮頸管炎として発症するが臨床症状がないことが多い。上行性に感染が進行すると、卵管炎、骨盤内炎症を引き起こし、まれに不妊の原因にもなる¹⁾。治療は抗菌薬が奏功し、ほとんどがアジスロマイシン1gの単回投与で完了する。しかし淋菌等のほかの性感染症に比べ自覚症状に乏しく無自覚に感染を繰り返すと言われている。

CTは円柱上皮細胞が存在する目や性器粘膜にも感染し、一部はリンパ節へ移行する。この生物学的指向性は外膜蛋白質の抗原性により分類され、CTは少なくとも19種類($A\sim$ L型)の血清型に分類されている。 $A\sim$ C型は主に目に感染を起こすトラコーマクラミジア型、 $D\sim$ K型は主に生殖器に感染を起こす性器クラミジア型、L型は主にリンパ節腫脹を起こす鼠径リンパ肉芽腫型である(表1) 2 。

CTの血清型別分布は地域やコミュニティーの違いにより偏りがあると報告されている3。わが国で報告されるCT血清型の多くは性器クラミジア型に属する。トラコーマクラミジア型は一部アジアの衛生環境が芳しくない地域で流行しており、また鼠径リンパ肉芽腫型は欧米諸国の一部地域で男性同性愛者間でのアウトブレイクが報告されている4。CTは細胞内寄生性細菌であり、培養に時間がかかるため、通常の検査では病原体分離は行われず、臨床材料からの遺伝子検出による検査が主として行われている。本稿では、東京都に

おける性器クラミジア感染症の発生状況および当センターで2016年から2018年までの3年間に実施したCT検査について報告する。

2. 東京都における性器クラミジア感染症の発生 状況と病原体検査

1) 発生状況

図1に都における性感染症定点把握対象疾患の 定点あたり年間報告数の推移を示した。性器クラ ミジア感染症の報告数は他の性感染症と比較して 2倍以上多く、年により変動はなく、横ばいで推 移している。

2) CTの検査方法

都では「感染症発生動向調査事業」として都内性感染症病原体定点医療機関からの収集検体を、また「性感染症無料匿名検査事業」として都内保健所および南新宿検査・相談室から検体(尿または陰部擦過物)を、TMA (Transcription Mediated Amplification) 法を用いた核酸検出法により検査を実施している。血清型別試験は、CT陽性の検体より抽出したDNAを用いて、外膜蛋白質をコードする領域(omp 1)をPCRにより増幅し、増幅産物の塩基配列を決定しGenBankに登録されたレファレンス配列と比較することで行った5。

3. 東京都におけるCT血清型の分布状況

2016年から2018年の3年間の検査件数は
12,121件であり、そのうちCT陽性は653件
(5.4%)であった。陽性検体のうち376件
(57.6%)についてCT血清型を決定した(図
2)。CT血清型はD/Da、E、F型で64.1%を占めた。これまで先進国において検出頻度の高い血清型としてD/Da、E、F型が報告されているが、今回の結果は諸外国の報告とほぼ一致している®。またトラコーマ型ではB/Ba型が1.3%で検出されたが、A、C型および鼠径リンパ肉芽腫型は検出されなかった。

他国でのCT型報告をもとに海外での流行株を モニタリングするとともに、都内の血清型分布傾 向を把握することは、インバウンド等による影響 や感染集団の変化の早期探知や感染拡大の防止に 繋がるものと考えられる。

<引用文献>

- 1) 性感染症診断・治療ガイドライン 2016 日本 性感染症学会誌
- 2) Stephens RS, et.al. J Bacteriol. 1987; 169:3879-85.
- 3) Bart Versteeg, et al. BMC Infectious Diseases. 2014;14(464):1471-2334.
- 4) de Vrieze NH, et al. Expert Rev Anti

Infect. 2014;12(6):697-704.

- 5) 島田信子ら,東京健安研セ年報,2011;62:91-96
- 6) Jurstrand M, et al. J Clin Microbiol. 2001;39(11):3915-9.

表 1. クラミジア・トラコマティスの臨床型と血清型

臨床型	血清型
トラコーマ型	A,B,Ba,C
性器クラミジア感染症型	D,Da,E,F,G,H,I,Ia,J,Ja,K
鼠径リンパ肉芽腫型	L1,L2,L2a,L3

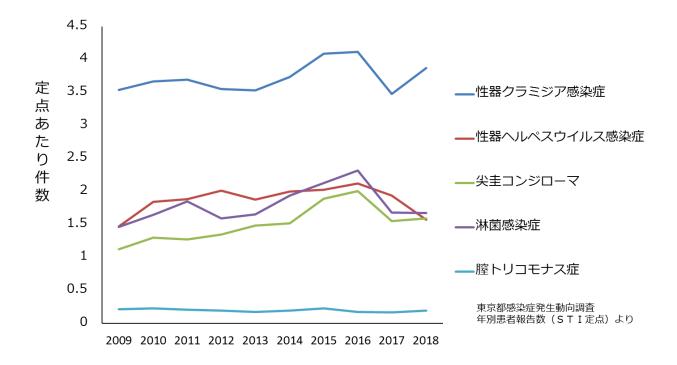


図 1. 性感染症定点把握対象疾患の定点あたり年間報告数推移(東京都)

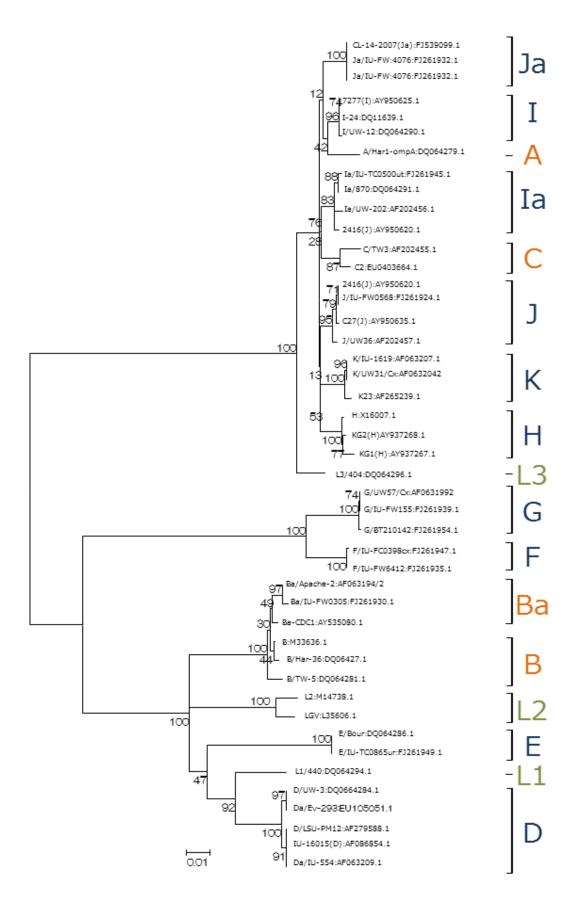


図 2. クラミジア・トラコマティス omp1 の標準系統樹 (血清型別解析)

-第2号-

結核菌の遺伝子型別法の現状 東京都健康安全研究センター 微生物部 病原細菌研究科 長谷川 乃映瑠

1. はじめに

2018年の東京都における結核罹患率(人口10万対)は14.2で、1999年以降減少傾向にあるが(図1)、全国の12.3と比較すると依然として高い状況にある。結核は薬剤耐性菌の蔓延や外国人患者の増加等の新たな課題もあり、感染の予防や発生状況の把握が必要とされる公衆衛生上重要な感染症である。

結核菌(Mycobacterium tuberculosis)は、他の菌に比べ血清型やファージ型分類に乏しく、菌株間の比較をするには、遺伝子解析による型別が有効とされる。遺伝子型別法は、菌をDNA塩基配列によって区別する試験で、集団感染例か否かの鑑別や再燃・再感染の鑑別、流行株のモニタリングや疫学調査ではわからなかった感染経路の発見などの目的で用いられる。これまでにさまざまな型別法が報告され、迅速性やコスト、分解能、簡便性などを勘案しながら発展してきた。実際に広く普及している型別法として、IS6110制限酵素断片長多型(Restriction Fragment Length Polymorphism; RFLP)やスポリゴタイピング、反復配列多型(Variable Numbers of Tandem Repeats; VNTR)などが挙げられる。

本稿では、日本で広く用いられているVNTRと世界的に様々な分野で活用されている次世代シークエンサー (Next Generation Sequencer; NGS) を用いた全ゲノム配列による一塩基多型 (Single Nucleotide Polymorphism; SNP) 解析について紹介する。

2. VNTR型別法

結核菌の遺伝子では、ある配列を繰り返している領域(VNTR領域)が80か所以上報告されている。これらの領域は変化しやすく、配列の繰返しの数が結核菌株によって異なる(図2A)。VNTR型別法は、菌株の領域ごとの繰返しの数を分析し、菌株間で比較することで同じ由来なのか、異なる

由来なのかを判別する手法である。方法は、目的の領域のDNAをPCR法で増幅し、アガロースゲルやキャピラリーシークエンサーを用いて電気泳動し、PCR産物の分子量から繰返しの数を判定する(図2B)。VNTRに必要なDNA量はRFLPに比べ少量でよく、培養初期の菌量の少ない時期でも検査が実施でき、迅速に結果が得られるという利点がある。また、VNTRの結果は各領域の繰返しの数の羅列として得られるため、比較が容易であり、多数の菌株を網羅的に解析することが可能である。

繰返しの数の変化頻度は、VNTR領域や結核菌の系統によって異なり、複数のVNTR領域を組み合わせて解析する。24領域を分析する24Beijing-VNTRは日本で70~80%を占める北京型結核菌において十分な分解能を持つ方法とされ、24領域全てで結果が一致あるいは1領域違いであれば共通の感染源が疑われる。

現在、東京都では、結核菌の積極的疫学調査事業として、24Beijing-VNTRによる型別法を実施している。一方、VNTRの結果が一致するにもかかわらず、疫学調査では患者間の関連が確認できない株も存在している。このような株については、24Beijing-VNTRでも分解能が不十分であると考えられている。近年、このような株における高い分解能をもつSNP解析の活用が注目されている。

3. SNP解析

結核菌のゲノムは約4,400,000塩基対であり、NGSを用いて全ゲノム配列を得ることができる。全ゲノム配列を結核菌標準菌株(H37Rv)と比較することで、一塩基レベルでの変異(SNP)の有無が判定可能である(図3A)。SNPはゲノム上の様々な部位に生じるが、特にコアゲノムという全ての株に共通して存在する領域中のSNPから、比較対象株同士が近縁であるかを知ることができる(図3B)。配列の繰返しの数を比較するVNTRと違い、SNP解析は一塩基レベルでの比較であるため、高い分解能を持つ。疫学的リンクを示唆するクラスターの閾値は明確には定められていないが、5 SNPsや12 SNPsが用いられることが多い。

また、全ゲノム配列からは型別以外の情報も得ることができる。例えば、薬剤耐性に関連した遺伝子変異の検出は、培養による薬剤感受性試験よ

りも迅速に薬剤耐性の有無を知ることができ、治療における効率化が期待される。現在、薬剤耐性 関連変異の情報蓄積と臨床での活用のための技術 開発が進められている。

全ゲノム配列を用いた解析の具体的な流れとしては、NGSより得られたリードデータ(DNA配列の断片)をソフトで解析し、アライメント(リードを繋げて一つの長い配列にする)した後、SNPの抽出や系統判定、薬剤耐性関連の変異検出などの結果を得る方法が一般的である。解析ソフトは多数開発されているが、各ソフトの解析結果の比較に関する評価がなされていないことが現状の課題である。SNP解析はVNTRに比べ、コストがかかり、結果が複雑で比較が容易でないため、未だ普及が進んでいないが、菌株の詳しい情報を得ることができるという利点がある。

今後は、VNTRに加えてSNP解析を適宜取り入れていくことで、感染経路の推定や結核対策に役立てていくことが期待される。

<参考文献>

- ・東京都における結核の概況 (2018年〈平成30年 >) , 東京都感染症情報センター http://idsc.tokyo-
- eiken.go.jp/diseases/tb/year_tb/y 2018/
- ・ 結核菌VNTRハンドブック, 地研協議会 保健情報疫学部会 マニュアル作成ワーキンググループ編
- Meehan CJ, et al. Whole Genome Sequencing of Mycobacterium Tuberculosis: Current Standards and Open Issues. Nat Rev Microbiol 17 (9), 533-545 (2019).

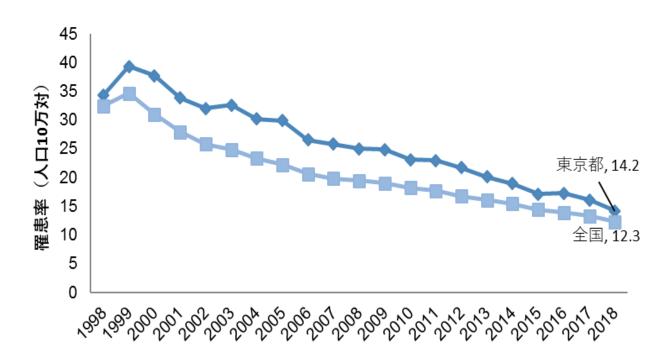


図1. 東京都および全国における結核罹患率(人口10万対)の推移

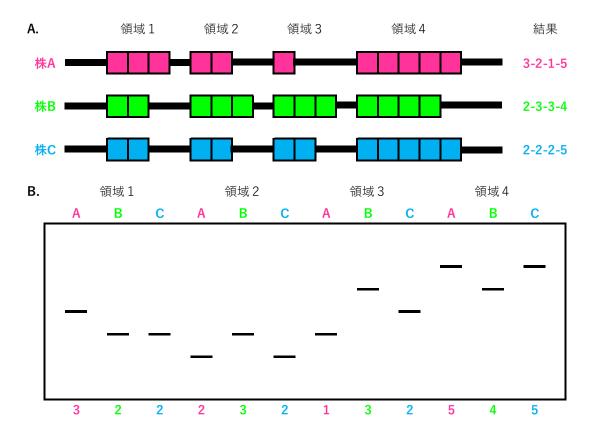


図2. VNTR 型別法の例 A: 菌株による配列の繰返し数の違い、B: PCR 産物の分子量からの繰返し数の判定

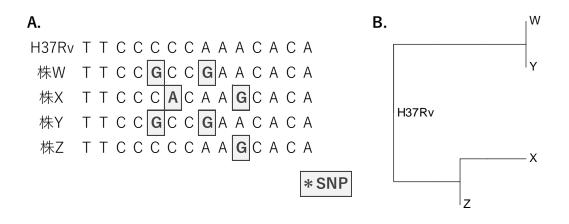


図3. コアゲノムにおける一塩基レベルでの変異(SNP)(A)と解析結果(B)の例

-第3号-

新型コロナウイルス(SARS-CoV-2)検査法 東京都健康安全研究センター 微生物部 貞升 健志

新型コロナウイルス(SARS-CoV-2)は29,800 塩基からなるRNAウイルスであり、コロナウイルス科オルソコロナウイルス亜科ベータコロナウイルス属に属する。同じくベータコロナウイルス属に属するウイルスには、鼻風邪の原因となるコロナウイルスの他、重症急性呼吸器症候群(SARS)ウイルスや、中東呼吸器症候群(MERS)ウイルスが含まれている。遺伝子学的にSARSコロナウイルス(SARS-CoV)に近縁なウイルスであるが、コウモリやセンザンコウ由来のコロナウイルスに近い起源であることが示唆されている。

主な感染経路・症状は、感染者の飛沫中の SARS-CoV-2 が鼻、口、目等を通して体内に入り 込み $1\sim14$ 日の潜伏期間の後、発熱、咳、味覚・嗅覚異常や軽度から重症の呼吸器疾患を起こす。 なお、他者に感染させる可能性のある期間は発症前 $1\sim2$ 日からと言われている。

一般にウイルス検査法には、ウイルス分離法、 抗原検査法、抗体検査法や遺伝子検査法がある。 SARS-CoV-2を分離するには生きた細胞を用いる が(SARS-CoV-2 は VeroE6 細胞等で培養が可能 1) (図 1)、少なくとも 1~2 週間を要し必ずしも 全ての感染者から分離されるわけではない。また、 抗原検査法(イムノクロマト法等)は医療機関で 実施されているインフルエンザ検査のように、鼻 腔拭い液中のウイルス抗原そのものを簡易に検出 する方法である。迅速性の面で優れている反面、 遺伝子検査の感度よりも著しく劣るため、現場で の使用法について検討していく必要がある。抗体 検査法は感染した証拠として SARS-CoV-2 に対 する抗体(IgG や IgM)を検出する方法である。 感染率の調査等の疫学解析に欠かせない方法であ るが、現在の感染を必ずしも示すものではない。 そのため、現状では保険適用を受けた遺伝子検査 法が新型コロナウイルス検査法として広く利用さ れている。

新型コロナウイルスの遺伝子検査として利用さ れている検査法の多くは、PCR (Polymerase Chain Reaction) 法の原理に基づいている(図2)。 PCR 法とは遺伝子を合成する耐熱性ポリメラー ゼ(逆転写酵素の能力を持つ DNA 合成酵素)、遺 伝子断片 (プライマー) や温度の上げ下げを利用 して、試験管内で特定の遺伝子を増やす方法であ る。遺伝子(DNA)は塩基(A、T、C、G)の繋 がりでできており、その繋がりは互いに相補的な 二本鎖の構造を成している。まず、温度が90℃以 上になると二本鎖構造が壊れ、DNA がそれぞれ 一本鎖になる。温度を60℃前後に下げると、再び 二本鎖に戻る性質があるが、あらかじめ増幅した い領域(60~数百塩基)を挟み込むように設計さ れたプライマー(約 20 塩基)を2種類(A、B) を入れておくことで、それぞれのプライマーA、B と合致する相補的な塩基配列と付着し二本鎖を構 成する。温度を上昇させていくと、高温で活性化 する耐熱性ポリメラーゼの作用により、プライマ ーA、Bを起点として DNA が合成されていく。1 回の温度の上げ下げにより、当初の遺伝子が2倍 に増えるが、この過程を40~45回繰り返すことで、 プライマーに挟まれた領域の遺伝子のみが理論上 $2^{40}\sim 2^{45}$ 倍 (1 ~ 35 兆倍) に増幅されることとなる。

PCR 法の原理を用いた RT-リアルタイム PCR 法(図3)は、新型コロナウイルスの一般的な検 査方法である。先に述べたように、SARS-CoV-2 はRNA ウイルスであるため、まず逆転写酵素(RT) 作用により RNA を DNA に変換する必要がある。 次に、増幅される遺伝子が SARS-CoV-2 であるこ とを確認するために、プライマーとともに、蛍光 を発する特異的な遺伝子断片(プローブ)を使用 し(プライマーA、Bを挟む位置に存在)、増幅し ながら目的の遺伝子の増幅を確認していく。ター ゲット遺伝子 (SARS-CoV-2 RNA) が存在すれば 蛍光が発せられ、その蛍光を専用機器で捕捉する。 SARS-CoV-2 RNA が数多く存在すれば、温度の 上げ下げ回数が少ない時点から蛍光が捕捉され検 査陽性となり、SARS-CoV-2 RNA が存在しなけ れば、増幅がなされず蛍光は発しないため、陰性 の検査結果が示される。

実際の検査では、感染を疑う患者から採取され

た鼻咽頭拭い液、咽頭拭い液または喀痰が検査用の検体として用いられている。また、SARS-CoV-2 RNA は患者の糞便や唾液からの検出の報告があるが、血液や尿からの検出頻度は低いことが知られている。

まず、鼻咽頭拭い液等から SARS-CoV-2 RNA を含むであろう核酸 RNA 分画を抽出後、主な方法として、国立感染症研究所(感染研)の病原体検出マニュアル ②に準じたプライマーとプローブを用いた方法で検査を実施する ③。感染研の RT-リアルタイム PCR は SARS-CoV-2 のnucleocapsid (N)遺伝子をターゲットとした Nセットと N2 セットの 2 種類で検査を実施する。一方あるいは両方のセットで、45 回の温度の上げ下げ回数内に蛍光を捕捉(増幅曲線の立ちあがりが見られた)した場合に陽性とみなす。その他、RT-リアルタイム PCR 以外にも LAMP 法等の各種メーカー等が開発した遺伝子検査法(全自動検査機器や抽出工程の不要な検査試薬等)が厚労省により認証され、国内での販売がなされている 4)。

SARS-CoV-2の遺伝子検査における注意点は大きく2点ある。1点目は、PCR法(RT-リアルタイム PCR法)を含め、遺伝子検査法は全て遺伝子を増やす方法であるため、増幅済の遺伝子産物(DNA)が試薬や他の検体に入り込むことや、ウイルス量の多い検体が検体の処理中に陰性の検体に少しでも入り込むことで(コンタミネーション:汚染)、偽の陽性判定が出ることがある。そのため、検査においては、試薬調製、遺伝子抽出や遺伝子増幅する場所を物理的に隔離するなどし、増幅産物や陽性検体からのコンタミネーション対策を万全にしなければならない。

2点目に、SARS-CoV-2は接触感染や飛沫感染によりヒトに感染するウイルスであるため、臨床検体の扱いは、的確な個人防護具(PPE)をした上で、バイオハザードレベル2以上(BSL2+)の安全キャビネット内で行わなければならない。医療機関内でのSARS-CoV-2感染も多く発生しており、検体を扱う過程での検査職員へのウイルス暴露には十分に注意を払わなければならない。

最後に、SARS-CoV-2 検査数を大幅に増やすことは新型コロナウイルス対策における喫緊の課題である。民間検査機関等の利用は最も現実的な選

択であり、既に運用も開始されている。一般に臨床材料の検査を行うにあたっては、都道府県での登録衛生検査所としての登録が必要であるが、新型コロナウイルス検査についての登録用件は大幅に緩和されており、感染症指定医療機関のみならず、感染対策ができている診療所や小規模な医療機関での検査も可能となっている。

一方で、新型コロナウイルス検査には根本的な 課題が潜んでいることを忘れてはならない。毎日 多くの検査を継続して実施するには、汎用されて いる遺伝子検査用の検体処理試薬、検査試薬、検 査器材 (検体採取に関わる消耗品) や PPE の十分 な確保が必要な点である。残念ながら多くの製品 は海外社製であり、また海外では日本以上に感染 者が多い地域も多いことから、我が国への輸入が ままならない事態も危惧される。第二に、遺伝子 検査には前述したように多くの注意点が存在する。 そのため、多検体を安全に失敗なく検査を実施で きるシステム(自動化)やそれらを制御する人材 の確保・育成が重要となる。新型コロナウイルス 感染症は指定感染症であり、検査結果が入院等の 隔離措置に直接つながることから、迅速に検査を 実施することのみならず、正確な結果報告が重要 であり、検査陽性者への対応までの一連の連携が スムーズに行われることが前提であるのは言うま でもない。

SARS-CoV-2 が発見されてから早4か月程度が過ぎたが、全面解決までの道のりはまだ半ばである。しかしながら、検査対応を含めて今までの健康危機管理に比べて物凄いスピードで変化している。緊急事態宣言が解除となっても、SARS-CoV-2 は地上から全て消えてなくなる訳ではない。そのため、個人レベルでの予防を引き続き行い、手洗い、マスクの着用や3密(密閉空間、密集場所、密接場面)は避ける努力を継続する必要がある。手洗い以外にも、SARS-CoV-2 はエンベロープを有するウイルスであり、熱に弱く、手指の消毒には消毒用エタノール、手指以外の用途には次亜塩素酸ナトリウムが有効である。

歴史上極めて稀な本事例を教訓として学びつつ、 今後発生するかもしれない再流行(第二波)に向 けたさらなる戦いへの万全な準備も継続して開始 しなければならない。

<引用文献>

- Nagashima M, et al. Jpn J Infect Dis. 2020 Apr 30. doi: 10.7883/yoken. JJID. 2020. 137.
- 2) 病原体検出マニュアル 2019-nCoV Ver. 2.9.1, 国立感染症研究所, 結核菌 VNTR ハンドブック, 地研協議会 保健情報疫学部会マニュアル作成ワーキンググループ編 https://www.niid.go.jp/niid/ja/laboratory-test/reference/9559-2020-04-14-10-09-54.html
- 3) 当センターにおける新型コロナウイルスの検査体制について、東京都健康安全研究センター、http://www.tokyo-eiken.go.jp/lb_virus/kensa-ncov/W
- 3) 臨床検体を用いた評価結果が取得された 2019-nCoV 遺伝子検査方法について,国立感 染症研究所,

https://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/2019-nCoV-17-20200318.pdf

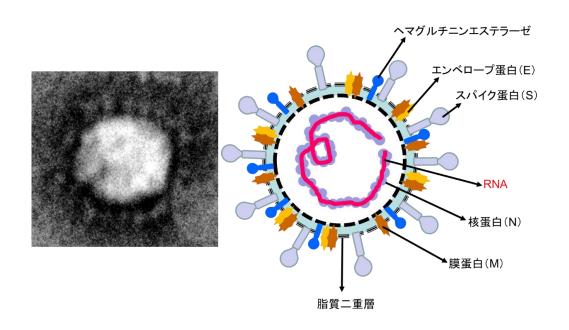


図 1 VeroE6 細胞で分離した SARS-CoV-2 の電子顕微鏡画像と模式図 ウイルス粒子を取り囲むようにしてコロナウイルスに特徴的な王冠様突起をなすスパイク蛋白が見える(写真)。PCR 法ではウイルス内の RNA がターゲットとなる(検査のために他のタンパクを除き、RNA のみを抽出する必要がある)(右図)。

(1)高温でDNAを一本鎖にする(90°C以上)

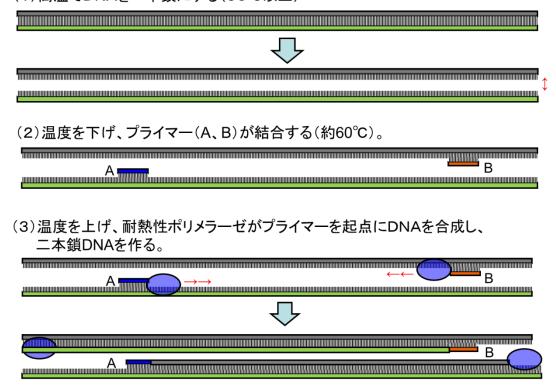
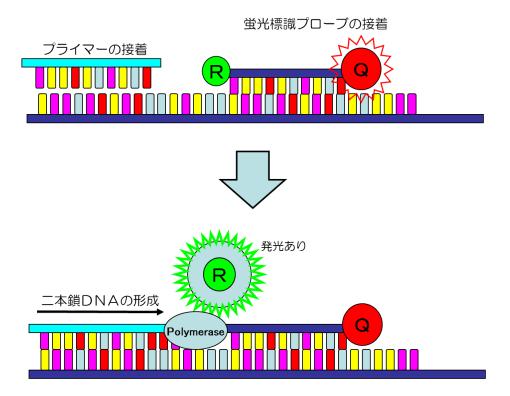


図 2 PCR (Polymerase Chain Reaction) 法の原理



耐熱性ポリメラーゼによる二本鎖DNAの形成とリポーター蛍光色素(R)の解離による発光シグナルを機器で補足する。

図3 リアルタイム PCR 法の原理

-第4号-

東京都の侵襲性肺炎球菌感染症症例から分離された肺炎球菌の血清型について(2013~2019年)

東京都健康安全研究センター 微生物部 病原細菌研究科 内谷 友美

侵襲性肺炎球菌感染症(以下 IPD: invasive pneumococcal disease) は「侵襲性感染症として、髄液又は血液などの無菌部位から肺炎球菌 (Streptococcus pneumoniae) が検出された感染症」と定義され、2013年4月1日より感染症法で5類全数把握疾患に指定されている。

肺炎球菌は主な病原性因子である莢膜の抗原性 の違いにより、97種類の血清型に分類され1)、わ が国では2010年2月から小児を対象に7価肺炎 球菌結合型ワクチン (PCV7: 血清型 4、6B、9V、 14、18C、19F、23F を含む) が導入された(図 1)。PCV7 は 2010 年 11 月から自治体ごとに公 費助成が順次開始され、2013年4月から5歳未 満の小児を対象に定期接種化された。さらに2013 年 11 月からは、13 価肺炎球菌結合型ワクチン (PCV13: PCV7 に血清型 1、3、5、6A、7F、19A を追加)への切替えが実施された。一方、65歳以 上の高齢者に対しては、2014年10月から年齢を 限定して 23 価ポリサッカライド肺炎球菌ワクチ ン (PPSV23: PCV13 から 6A を除き、2、8、 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F, 20, 22F, 33F を追加)の定期接種が開始されている。

東京都の IPD 届出数は 2013 年以降増加傾向にあったが、2017 年頃から年間 400 件前後と横ばい傾向であり(図 2)、全症例数のうち 20 歳以上の成人が 81.3%を占めている。東京都では 2013年10月より IPD 症例から分離された肺炎球菌を収集し、血清型別検査を実施している。2013年から 2019年までに当センターに搬入された菌株は601症例(届出数の 27.3%)を由来とする 648株であった。症例の内訳は小児(0-14歳)が 310例、成人(21-98歳)が 291例であり、小児の年齢の中央値は 1歳、成人の中央値は 71歳であった。また、性別は男性 60%、女性 40%であった。

肺炎球菌の血清型別は型別用血清(Statens Serum Institut 社製)を用いた莢膜膨化法で実施した。その結果、全期間を通して検出頻度の高い血清型は、小児においては 24F、24B、15A、12F、15C の順であり、これらはすべて非 PCV13 ワクチン型であり、特に 24F は全期間を通して上位であった。また 24B においては、2016 年以前は少数であったが、2017 年以降急増し、2018 年および 2019 年は最多であった。一方、成人においては 12F、3、19A、7F、10A の順に多く検出された。これらはすべて PPSV23 ワクチン型であり、全期間を通じて、成人における頻出血清型の変化は少なかった(表 1-2、図 3)。

ワクチン含有血清型の割合(ワクチンカバー率)の推移を図4に示した(血清型別不能株及び症例数10未満のデータは除外)。小児におけるPCV13のカバー率は、2013年の50%以降減少傾向で、2017年以降は3~7%と横ばいとなり、2019年は3.4%であった。一方、成人おけるPPSV23のカバー率は、2015年以降緩やかな減少傾向にあり、2018年には61.9%となったが、2019年は70.7%と増加に転じた。また、成人におけるPCV13のカバー率も減少傾向にあるが、PCV13のカバー率は30%前後が維持されている。

IPD患者から分離される菌株の血清型解析では、ワクチン導入を機にワクチン型から非ワクチン型へ変化する、いわゆる血清型置換が起こっていることが報告されている²⁾。累積予防接種率調査(2016年度)によると、小児における PCV13の初回接種率は 97%以上とされている³⁾。今回、小児 IPD 由来株の PCV13カバー率に顕著な減少が認められ、都内分離株においても血清型置換が起きていることが示唆された。一方、成人においては、PPSV23カバー率は 2016年以降 70%前後が維持されている。高齢者の PPSV23接種率は多い年代でも 40%程度であることから⁴⁾、65歳以上の成人に対する定期接種率のさらなる向上が必要と思われる。

都内で分離された IPD 由来菌株において非ワクチン血清型の増加傾向が認められている。今後も継続的に、IPD 由来菌株の血清型の動向を調査

していく必要がある。

<引用文献>

- 1) Geno K.A. et al.:Clinical Microbiology Reviews, 28(3), 871-899, 2015
- 2) 菅秀ら: IASR, 39, 112-113, 2018
- 3) 国立感染症研究所 平成28年度累積接種率調

查結果

https://www.niid.go.jp/niid/images/vaccine/cum-vaccine-coverage/cum-

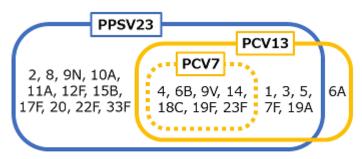
4) 黒崎亮:IASR, 39, 121-123, 2018

表1 小児における頻出血清型の症例数と年別割合(%)

	24F	24B	15A	12F	15C	他血清型	合計
2013年	4 (33)	-	2 (17)	-	-	6 (50)	12 (100)
2014年	8 (24)	2 (6)	5 (15)	1 (3)	2 (6)	15 (45)	33 (100)
2015年	9 (17)	2 (4)	9 (17)	6 (11)	-	27 (51)	53 (100)
2016年	10 (19)	2 (4)	3 (6)	11 (21)	7 (13)	19 (37)	52 (100)
2017年	11 (24)	5 (11)	2 (4)	4 (9)	4 (9)	19 (42)	45 (100)
2018年	6 (11)	11 (20)	6 (11)	4 (7)	3 (5)	25 (45)	55 (100)
2019年	8 (13)	10 (17)	3 (5)	1 (2)	2 (3)	36 (60)	60 (100)
総計	56 (18)	32 (10)	30 (10)	27 (9)	18 (6)	147 (47)	310 (100)

表2 成人における頻出血清型の症例数と年別割合(%)

	12F	3	19A	7F	10A	他血清型	合計
2014年	1 (50)	-	-	-	-	1 (50)	2 (100)
2015年	2 (20)	4 (40)	2 (20)	-	-	2 (20)	10 (100)
2016年	9 (14)	11 (17)	2 (3)	8 (13)	3 (5)	31 (48)	64 (100)
2017年	11 (15)	8 (11)	7 (10)	5 (7)	5 (7)	37 (51)	73 (100)
2018年	10 (12)	12 (14)	8 (10)	3 (4)	5 (6)	46 (55)	84 (100)
2019年	7 (12)	3 (5)	6 (10)	5 (9)	4 (7)	33 (57)	58 (100)
総計	40 (14)	38 (13)	25 (9)	21 (7)	17 (6)	150 (52)	291 (100)



PCV7 : 7価肺炎球菌結合型ワクチン PCV13 : 13価肺炎球菌結合型ワクチン PPSV23 : 23価ポリサッカライド肺炎球菌ワクチン

図1 肺炎ワクチンに含まれる血清型



図2 東京都における IPD 届出数の推移

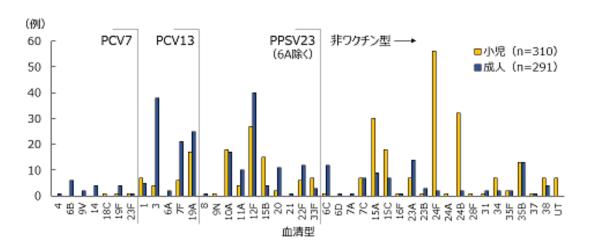


図3 IPD 由来肺炎球菌の血清型(2013年~2019年)

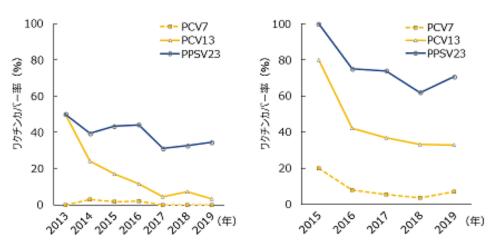


図4-1 小児における肺炎球菌ワクチン カバー率の推移(n=303)

図4-2 成人における肺炎球菌ワクチン カバー率の推移(n=289) (血清型別不能株及び症例数 10 未満のデータは除外)

-第5号-

病原体レファレンス事業に基づく病原体等の収集 と解析結果(平成31年度/令和元年度)

東京都健康安全研究センター 微生物部

食品微生物研究科 小西典子、赤瀬 悟

病原細菌研究科 奥野ルミウイルス研究科 鈴木 愛

病原体レファレンス事業は、都内で発生する感染症の病原体等を積極的に収集し、病原体の性状や遺伝子を比較・解析することにより流行型の血清型や薬剤耐性、遺伝子変異等を把握し監視していくことを目的としている。

本事業では、医療機関や保健所等の協力により 主として感染症法では収集体制が確保されていな い病原体の収集と、積極的疫学調査で実施した麻 しん検査における陰性検体の類症鑑別診断等を実 施している。

1. 協力医療機関から収集した病原体の解析

医療機関等の協力により、カンピロバクター、 大腸菌、エルシニア、レンサ球菌、黄色ブドウ球 菌、髄膜炎菌等を収集している。平成 31/令和元 年度に都立病院及び都保健医療公社病院から送付 された病原体(菌株)は、表1のとおりである。 また、各病原体の種類・解析結果は以下のとおり である。

1) カンピロバクター

カンピロバクター属菌は 141 株が送付され、内 訳は *Campylobacter je juni* 124 株 (87.9%)、*C. coli* 17 株 (12.1%) であった。由来別にみると、 糞便由来が 138 株 (97.9%) で多くを占めていた が、他には血液由来 2 株 (*C. je juni*)、大腸粘膜 由来 1 株 (*C. je juni*) であった。

C. je juni の血清型は、型別不能の77株を除き14種類に型別された(型別率37.9%)。検出頻度の高い血清型は、C群:9株(7.3%)、R群:8株(6.5%)、B群:5株(4.0%)、D群:5株(4.0%)、Y群:5株(4.0%)であった(表2)。

2) 大腸菌

下痢症患者由来の大腸菌は334株が送付された。

これら大腸菌を対象にベロ毒素産生性、エンテロトキシン産生性および侵入性遺伝子の保有について検査を実施した。その結果、毒素原性大腸菌(ETEC)30株(9.0%)、組織侵入性大腸菌(EIEC)1株(0.3%)が検出された。また、ETECは血清型および毒素型により9種類に分類された(表3)。最も多く検出された0血清群は06(7株)で、次いで025および0159(各6株),0169(5株)であった。ETECが検出された患者のうち、025が検出された1名を除き海外渡航歴が認められた。推定感染地はインド、インドネシア、フィリピン、タイ等であった。

3) サルモネラ

サルモネラは 30 株が送付され、血清型別試験の結果 22 種類の血清型に分類された。最も多い血清型は 09 群 Enteritidis で 4 株、次いで 04 群 Chester が 3 株、04 群 Agona、Sandiego、Schwarzengrund が各 2 株等であった (表 4)。

海外での感染が推定されたのは 04 群 Agona (カンボジア,タイ)、07 群 Choleraesuis (タイ)、07 群 Mbandaka (マレーシア)、07 群 Livingstone (タイ)、08 群 Bovismorbificans (モンゴル)、09 群 Enteritidis (タイ)、09 群 Panama (タイ) であった。

搬入された株についてアンピシリン (ABPC)、セフォタキシム (CTX)、ゲンタマイシン (GM)、カナマイシン (KM)、ストレプトマイシン (SM)、テトラサイクリン (TC)、クロラムフェニコール (CP)、ST 合剤 (ST)、ナリジクス酸 (NA)、シプロフロキサシン (CPFX)、ノルフロキサシン (NFLX)、オフロキサシン (OFLX)、ホスホマイシン (FOM) を用いた薬剤感受性試験を実施した。その結果、いずれか1剤以上に耐性を示した株は10株 (33.3%)であった (表5)。

4) エルシニア

エルシニア属菌は 6 株が送付され,全て *Yersinia enterocolitica* で あった。 *Y. enterocolitica* の血清型は 08 群が 4 株、03 群が 2 株であった。いずれも渡航歴はなく、国内での感染が疑われた。

5) レンサ球菌

レンサ球菌は 34 株搬入され、その内訳は A 群が 9 株、B 群が 12 株、C 群が 1 株、G 群が 3 株 (表6)、肺炎球菌が 9 株であった。

A 群レンサ球菌はすべて Streptococcus pyogenes であり、そのT血清型は1型、4型、12型が各1株、6型、B3264型、28型が各2株であった。

B 群レンサ球菌 (S. agalactiae) 12 株の血清型は、Ia 型が 1 株、Ⅲ型が 9 株、V型が 2 株であった。また G 群レンサ球菌 3 株は、全て S. dysgalactiae subsp. equisimilisであった。

肺炎球菌 9 株の血清型は、6B 型が 3 株、1 型、4型、9V型、19A 型及び 19F 型が各 1 株であり、1株は肺炎球菌ではなかった。

6) 黄色ブドウ球菌

黄色ブドウ球菌については2株搬入され、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)であった。その2株は、コアグラーゼ型はI型で、表皮剝脱毒素B産生株であった。

7) 髄膜炎菌

髄膜炎菌は、1株搬入され PCR 法による血清型 別を実施した結果、型別不能であった。

8) その他

多剤耐性アシネトバクター、バンコマイシン耐性腸球菌、カルバペネム耐性腸内細菌科細菌疑い株等の薬剤耐性遺伝子検査依頼が 26 株あった。また、その他同定検査依頼が 16 株搬入された。

2. 麻しん・風しんウイルス検査(積極的疫学調査) 陰性例における類症鑑別検査とその他の依頼 検査

積極的疫学調査では、麻しん・風しんが疑われる全症例に対して両ウイルス検査を行っている。本事業では麻しん・風しんウイルス陰性例を対象に発しん症起因ウイルスの類症鑑別検査(ヒトパルボウイルス B19、2歳以下についてはヒトヘルペスウイルス検査を追加)を実施した。627件の陰性検体について類症鑑別検査を行った結果、ヒトパルボウイルス B19が34検体、ヒトヘルペスウイルス6型が24検体、同ウイルス7型が4検体から検出された。

またその他の依頼検査として、流行性筋痛症の 検体が25件搬入され、うち13件からヒトパレコ ウイルス3型が検出された(咽頭ぬぐい液と糞便 試料のからの同時検出例を含む)。パレコウイルス が検出されたのはいずれも男性で、年齢層は10代 が1件、30代が4件、40代が6件であった。

表 1. 対象病原体(平成 31 年 4 月~令和 2 年 3 月)

 病原体	菌株数
カンピロバクター	141
大腸菌(下痢症患者由来株) 1)	334
サルモネラ	30
エルシニア	7
リステリア	3
レンサ球菌 ²⁾	34
インフルエンザ菌 ²⁾	8
黄色ブドウ球菌 ³⁾	2
髄膜炎菌 ²⁾	1
その他	42
計	602

¹⁾ 腸管出血性大腸菌を除く

表 2. C. jejuni の血清型 (Penner 法)

血清型	菌株数	(%)
C群	9	(7.3)
R群	8	(6.5)
B群	5	(4.0)
D群	5	(4.0)
Y群	5	(4.0)
その他	15	(12.1)
UT	77	(62.1)
合計	124	(100)

UT:型別不能

²⁾ 劇症型及び侵襲性感染症由来株を除く

³⁾ 感染症由来株を除く

表 3. 毒素原性大腸菌の血清型

血清型	産生毒素	菌株数	渡航歴
O6: H16/NM	LT, ST	3	フィリピン(2), トルコ
O6: H16	ST	4	カンボジア, タイ, インド, アフリカ他2か国
O25: H42/NM	ST	4	インド(2), カンボジア, パキスタン
O25: NM	LT	2	インド、国内
O27: H7	ST	3	インドネシア (2) , タイ
O91: H10	LT, ST	1	フィリピン
O159: H20/27/34	LT, ST	5	タイ(4), ウズベキスタン
O159: HUT	LT	1	タイ
O169: H41/NM	ST	5	インド(2), タイ, フィリピン, エジプト
OUT/H27/NM	LT	2	インドネシア,アフリカ
計		30	

OUT:血清型別不能

表 4. サルモネラの血清型

O群	血清型	菌株数
O9	Enteritidis	4
O4	Chester	3
O4	Agona	2
O4	Sandiego	2
O4	Schwarzengrund	2
O4	Brandenburg	1
O4	Saintpaul	1
O4	Stanley	1
O4	Typhimurium	1
O7	Bareilly	1
O7	Choleraesuis	1
O7	Infantis	1
O7	Livingstone	1
O7	Mbandaka	1
O7	Ohaio	1
O7	Thompson	1
O8	Bovismorbificans	1
O8	Newport	1
O9	Panama	1
O13	Cubana	1
O40	Johannesburg	1
O3,10	Weltevreden	1
	計	30

表 5. 薬剤耐性を示したサルモネラの血清型と薬剤耐性パターン

O群	血清型	薬剤耐性パターン	推定感染地	菌株数
O4	Agona	ABPC, ST, SM, TC	カンボジア	1
O4	Agona	ABPC, CTX, GM, KM, NA, SM, TC, OFLX	タイ	1
O4	Brandenberg	NA	国内	1
O4	Schwarzengrund	KM, ST	国内	1
O4	Schwarzengrund	KM, SM, TC	国内	1
O7	Choleraesuis	ABPC, KM, NA, ST, SM	タイ	1
O7	Mbandaka	TC	マレーシア	1
O7	Infantis	SM, TC	国内	1
O9	Panama	ABPC, CP, TC	タイ	1
O9	Enteritidis	ABPC, NA	タイ	1
	計			10

表 6. 溶血性レンサ球菌の群別及び菌種名

	Lancefield群				計
困性行	A	В	C	G	印
Strptococcus pyogenes	9				9
Strptococcus agalactiae		12			12
Strptococcus dysgalactiae subsp. equisimilis				3	3
Strptococcus sp.			1		1
計	9	12	1	3	25

-第6号-

食品からのメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA)分離状況

東京都健康安全研究センター 微生物部 食品微生物研究科 下島優香子

1. メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) とは

黄色ブドウ球菌はヒトに化膿性炎症を起こす化膿菌であり、敗血症や表皮はく奪性皮膚炎、毒素性ショック症候群やブドウ球菌食中毒等の毒素性疾患も引き起こす。黄色ブドウ球菌のうち、メチシリン耐性 黄色 ブドウ球菌 (methicillin-resistant Staphylococcus aureus; MRSA) は、メチシリンやオキサシリン等、 β ラクタム系の抗菌薬に親和性の低い細胞壁合成酵素 (penicillin-binding protein; PBP) を産生することにより、ほとんどの β ラクタム系抗菌薬に対し耐性を獲得する。MRSA は1980年代以降、国内外において広く分離され、現在遺伝子型により3種に分類されている。

MRSA は古くから院内感染の重要な原因菌とされ、 それらは院内感染型 MRSA (healthcare-acquired MRSA; HA-MRSA) と呼ばれている。その一方、市中の 感染者から分離される市中感染型 MRSA (communityacquired MRSA; CA-MRSA) も存在し、これまでの疫 学調査から両者は遺伝子型が異なる特徴を有してい る 1,2) (表 1)。また、2003 年以降、海外で豚等の家 畜から分離され、さらに遺伝子型が異なる家畜関連 型 MRSA (livestock-associated MRSA; LA-MRSA) が 報告されている²⁾。国内における家畜由来のLA-MRSA は、動物検疫所において 2016 年~2017 年に輸入豚 から、2017年に東北地方の豚から分離報告がある3,40。 また、ヒトからの LA-MRSA 分離例は、2017年に東京 で鼠径部、陰部及び臀部の重症膿皮症患者からの分 離報告 5)及び 2018 年に東京の肩の難治性関節炎患 者からの分離報告のがなされている。

2. MRSA の遺伝子型

黄色ブドウ球菌の遺伝子型別は主に Multilocus sequence typing (MLST) により行われている。 MLST は、7 つのハウスキーピング遺伝子内の塩基配列パターンにより決定され、現在 ST1~ST6255 に分類される。 近縁の ST は Clonal complex (cc) を形成する。 HA-MRSA は ST5、CA-MRSA は ST1 及び ST8 (アメ

リカ、カナダ等)、ST30 (日本、ロシア、上海、オセアニア、エジプト等)、LA-MRSA は ST398 (欧米)、ST9 (アジア) が主流である 1,2 (表 1)。

MRSA の産生する PBP はメチシリン耐性遺伝子; mecAでコードされる PBP2a が主流であるが、mecCやその他の機序によるものもある。 mec 遺伝子は可動性遺伝因子 (Staphylococcal cassette chromosome; SCC)に存在し、mec遺伝子を有する SCC である SCC mecは I ~V型に分類される。 HA-MRSA は I、II 及びIII型、CA-MRSA はIV及びV型、LA-MRSA はIVa 及びV型が主である 1.2) (表 1)。

3. 食品からの MRSA 分離状況

MRSA はヒト、環境のみならず、食肉や魚介類等食品からも分離が報告されている。そこで 2017 年に東京都内に流通する食品からの MRSA 分離状況及び遺伝子型を調査した⁷⁾ (表 2)。

MRSA は、牛肉 44 検体中 1 検体 (2.3%)、豚肉 80 検体中 9 検体 (11.3%)、鶏肉は 57 検体中 6 検体 (10.5%)、その他食肉及び食肉加工品等 33 検体中 1 検体 (3.0%)、魚介類及び魚介類加工品 56 検体中 4 検体 (7.1%)、計 21 検体 (7.8%) から分離された。豚肉においては国産品 (5.0%) と輸入品 (17.5%) でやや差が認められたが、それ以外では国産品と輸入品の分離率に大きな差は認められなかった。魚介類等で MRSA が分離されたのは、欧州産剥き甘えび、アジア産無頭殻付きブラックタイガー、国産キンメダイの切り身及び国産ホタテ貝であり、魚介類、海水環境もしくは加工環境が MRSA に汚染されている可能性が考えられた。

21 検体から分離された MRSA22 株の MLST 及び SCC_{mec} 型を表 3 に示した。輸入食品のうち、欧米産 豚肉から、ST398、 SCC_{mec} V の MRSA が計 7 株検出された。この遺伝子型は欧米で LA-MRSA として報告される型である。国内での報告例はまだ少ないが、今後、国内に伝播する可能性が危惧される。一方、国産の鶏肉、豚肉及び猪肉から計 7 株、CC8(ST8 及び ST4663)、 SCC_{mec} I V が分離された。なお、HA-MRSA に主流の ST5、 SCC_{mec} I $\sim III$ は、認められなかった。

4. 食品由来 MRSA 株の薬剤耐性

食品由来のMRSA22 株を対象に、MRSA 治療薬(バンコマイシン; VCM、テイコプラニン; TEIC、リネゾリド; LZD、ST 合材; SXT)、テトラサイクリン系薬剤

(テトラサイクリン; TC、ミノサイクリン; MINO)、 クロラムフェニコール; CP、アミノグリコシド系薬 剤(カナマイシン; KM、ゲンタマイシン; GM、アミ カシン; AMK)、フルオロキノロン系薬剤(オフロキ サシン; OFLX、ノルフロキサシン; NFLX)、ホスホマ イシン; FOM の薬剤感受性試験を行い、耐性パター ンを表3に示した。

MRSA 治療薬として使用される VCM、TEIC、LZD、SXT には全て感性であった。欧米の豚肉から分離された ST398、SCCmec V の 7 株はいずれも TC 耐性であった。TC 耐性は輸入品由来株で 9/12 株 (75%)、国産品由来株で 1/10 株 (10%) であり、輸入品由来株の耐性率が高かった。一方、国産食肉由来 CC8、SCCmec IV の 7 株中 6 株がアミノグリコシド系薬剤である KM 及び GM に耐性であった。KM 及び GM 耐性は国産品由来株で 7/10 株 (70%)、輸入品由来株でそれぞれ 2/12 株 (17%)、1/12 株 (8%) であり、国産品由来株の耐性率が高かった。

5. おわりに

薬剤耐性菌のヒトへの暴露は、院内感染など医療 分野のみならず、動物、環境、食品等を介する可能 性が懸念される。都内に流通する食肉及び魚介類等 から国産品、輸入品由来ごとに遺伝子型や薬剤耐性 パターンが異なる MRSA が分離されており、食品への MRSA 汚染、MRSA に汚染された食品を介した拡散が危惧される。

<引用文献>

- 1) 山本達男ら、モダンメディア、54,95-103,2008.
- 1) 食品安全委員会,薬剤耐性菌に関するワーキンググループ,家畜に使用するテトラサイクリン系抗生物質に係る薬剤耐性菌に関する食品健康影響評価. 2019.
- 2) Furuno M., et al., J. Glob. Antimicrob. Resist., 14, 182-184, 2018.
- 3) Sasaki Y., et al., J. Vet. Med. Sci., 82, 1400-1403, 2020.
- 4) Nakaminami H., et al., Jpn. J. Infect. Dis., Published online Aug 1, 2020.
- 5) Nakaminami H., et al., Emerg. Infect. Dis., 26, 795-797, 2020.
- 6) 下島優香子ら, 感染症誌, 94, 186-192, 2020.

表	1.	MRSA	の主な性状の比較

	院内感染型	市中感染型	家畜関連型
	HA-MRSA	CA-MRSA	LA-MRSA
由来	医療施設	不明	家畜
薬剤感受性	多剤耐性	多くの抗菌薬に感性	多剤耐性
MLST型	ST5	ST8, ST30	ST398, ST9
$\mathrm{SCC}\mathit{mec}$ 型	I, II, III型	IV, V型	IVa, V型

表 2. 東京都内に流通する食品の MRSA 分離状況(2017年)

		人工工工工工工工工工工工工工工工工工工工工工工工工工工工工工工工工工工工工							
種類		国産	Ī	輸入	計				
	供試数	陽性数 (%)	供試数	陽性数 (%)	供試数	陽性数 (%)			
牛肉	20	0 (0)	24	1 (4.2)	44	1 (2.3)			
豚肉	40	2 (5.0)	40	7 (17.5)	80	9 (11.3)			
鶏肉	43	5 (11.6)	14	1 (7.1)	57	6 (10.5)			
その他の食肉等	25	1 (4.0)	8	0 (0)	33	1 (3.0)			
魚介類等	30	2 (6.7)	26	2 (7.7)	56	4 (7.1)			
計	158	10 (6.3)	112	11 (9.8)	270	21 (7.8)			

表 3. MRSA 分離株の遺伝子型と薬剤耐性(2017年)

	原産国	種類	ST	CC	SCC mec	薬剤耐性
国産	日本	豚肉	ST97	CC97	V	TC, CP, GM, EM, CAM, NFLX, OFLX
	日本	豚肉	ST8	CC8	IV	KM, GM, EM, CAM
	日本	鶏肉	ST4663	CC8	IV	CP, KM, GM, CEZ
	日本	鶏肉	ST4663	CC8	IV	CP, KM, GM, CEZ
	日本	鶏肉	ST4663	CC8	IV	KM, GM, AMK, EM, CAM
	日本	鶏肉	ST4663	CC8	IV	KM, GM, AMK, EM, CAM
	日本	鶏肉	ST4663	CC8	IV	CP, KM, GM, AMK
	日本	猪肉	ST8	CC8	IV	EM, CAM, NFLX, OFLX
	日本	ホタテ貝	ST2764	CC1	IV	EM, CAM, NFLX, OFLX
	日本	キンメダイ	ST3191	CC59	IV	KM, EM,CAM
輸入	オセアニア	牛肉	ST59	CC59	IV	CP, KM, GM, EM. CAM
	欧州	豚肉	ST398	CC398	V	TC, EM, CAM
	欧州	豚肉	ST398	CC398	V	TC, EM, CAM
	欧州	豚肉	ST398	CC398	V	TC, MINO, EM, CAM
	欧州	豚肉	ST398	CC398	V	TC, MINO, CP, NFLX, OFLX
	欧州	豚肉	ST398	CC398	V	TC, MINO, NFLX, OFLX
	欧州	豚肉	ST398	CC398	V	TC, EM, CAM, NFLX, OFLX
	北米	豚肉	ST398	CC398	V	TC
	北米	豚肉	ST5	CC5	IV	TC, NFLX, OFLX
	南米	鶏肉	ST1176	CC5	IV	KM, EM, CAM
	欧州	エビ	ST2990	CC1	IV	
	アジア	エビ	ST88	CC88	IV	TC

-第7号-

東京都内の医療機関で分離された溶血性レンサ 球菌感染症由来株の血清型別及び Streptococcus pyogenes の薬剤感受性状況 (2019年)

東京都健康安全研究センター 微生物部 病原細菌研究科 奥野ルミ

東京都における「劇症型溶血性レンサ球菌感染症」 (以下、劇症型)の届出数は、2015年以降増加傾向 にあり、全国においても同様な傾向が見られる(図 1)。都では、劇症型患者から分離されたβ溶血性レ ンサ球菌については、協力が得られた医療機関から 積極的疫学調査として菌株を確保し、血清型別等の 疫学解析を実施している。また、定点把握対象疾患 である「A群溶血性レンサ球菌咽頭炎」(以下、咽頭 炎)については、感染症発生動向調査事業として病 原体定点医療機関の患者検体から分離した Streptococcus pyogenes を調査している。

1. 劇症型溶血性レンサ球菌感染症由来株の群別及び菌種

2019 年に当センターに搬入された劇症型患者由来株 120 株について、Lancefield 分類による群別を実施した。その結果、最も多かったのは A 群 51 株 (42.5%)で、次いで G 群 49 株 (40.8%)、B 群 17 株 (14.2%)、C 群 2 株 (1.7%)、F 群 1 株 (0.8%) の順であった。

菌種の内訳を見ると、A 群のうち 48 株が S. pyogenes、3 株 が S. dysgalactiae subsp. equisimilis、C 群の 1 株及び G 群ではいずれも S. dysgalactiae subsp. equisimilis (SDSE) であり、菌種別では SDSE が最も多く見られた。また、B 群ではすべて S. agalactiae、C 群の 1 株は S. constellatus であり、F 群は S. anginosas であった (表1)。

2. S. pyogenes の T 血清型別

収集した S. pyogenes の T 血清型別結果を表 2 に示した。劇症型由来株では 1 型:10 株 (20.9%) が最も多く、次いで B3264 型:9 株 (18.8%) であり、11型、12型、22型、28型はそれぞれ 4 株 (8.3%) 等であり、型別不能は 11 株 (22.9%) であった。

一方、感染症発生動向調査事業で、2019年に咽頭 炎患者から分離された S. pyogenes 132株の T 血清 型は、多く見られた順に 1型:34株(25.8%)、28型: 29株(22.0%)、12型:20株(15.2%)、B3264型:17 株(12.9%)、型別不能は 4株(3%)であり、型別結果に やや違いが認められた。

3. S. pyogenes の薬剤感受性状況

劇症型由来 48 株及び咽頭炎由来 131 株、計 179 株の S. pyogenes について薬剤感受性試験を実施した(表 3、4)。方法は、ドライプレート(オーダープレート TNE4)を用いて、IA40MIC(栄研化学)により培養及び測定を行った。供試薬剤は表 $3\cdot 4$ に示した 10 薬剤である。

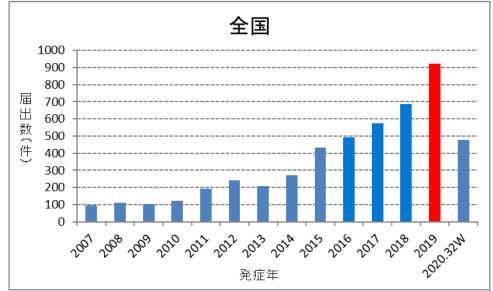
その結果、βラクタム系薬剤4剤(ABPC、CFDN、CEX、CDTR)及びCPについては、供試株すべてが感受性を示した。TC耐性は劇症型由来株で22.9%、咽頭炎由来株で3.8%であり、マクロライド系薬剤であるEM及びCAMの耐性は劇症型由来株で37.5%、咽頭炎由来株で16.8%であった。劇症型患者の治療薬としてペニシリン系薬剤とともに第一選択薬とされるCLDMの耐性は、劇症型由来株で20.9%、咽頭炎由来株で9.9%であった。耐性が見られた4薬剤に対する耐性株の割合は、咽頭炎由来株と比較して劇症型由来株の方が高かった。また、劇症型、咽頭炎由来いずれのCLDM耐性株も、EM及びCAMに耐性を示した。

今後も、劇症型及び咽頭炎由来株について、型別や薬剤感受性試験等により流行を把握・監視していくとともに、さらに詳細な異同を検討して行く必要がある。

<参考文献>

- 東京都微生物検査情報,37, 総集編,22-26,2016
- ·東京都微生物検査情報, 38, 総集編, 26-28, 2017
- 東京都微生物検査情報,39,総集編,26-28,2018
- ·東京都微生物検査情報(月報),40,8月号,2019





(東京都感染症週報より作成)

図 1. 劇症型溶血性レンサ球菌感染症発生届出数の年次推移

表 1. 劇症型溶血性レンサ球菌感染症患者由来株の群別及び菌種名 (2019年:東京都)

## <i>b</i>		Lancefie	= 1 (04)			
蓝種名 	A	В	C	F	G	計(%)
S. pyogenes	48					48 (40.0)
S. agalactiae		17				17 (14.2)
S. dysgalactiae ssp. equismilis	3		1		49	53 (44.2)
S.anginosas				1		1 (0.8)
S. constellatus			1			1 (0.8)
合計	51	17	2	1	49	120 (100)
(%)	(42.5)	(14.2)	(1.7)	(0.8)	(40.8)	(100)

表 2. 劇症型及び咽頭炎由来 A 群レンサ球菌 (S. pyogenes) T血清型別 (2019年:東京都)

由来		T血清型											合計	
	1	2	3	4	6	11	12	14/49	22	25	28	B3264	型別不能	
劇症型	10			1		4	4	1	4		4	9	11	48
(%)	(20.9)			(2.1)		(8.3)	(8.3)	(2.1)	(8.3)		(8.3)	(18.8)	(22.9)	(100)
咽頭炎	34	1	3	10	10		20			4	29	17	4	132
(%)	(25.8)	(0.8)	(2.3)	(7.6)	(7.6)		(15.2)			(3.0)	(22.0)	(12.9)	(3.0)	(100)

表 3. 2019 年に都内の医療機関で分離された劇症型溶血性 レンサ球菌患者由来 S.pyogenes の薬剤感受性

MIC (μg/ml)	ABPC	CFDN	CEX	CDTR	TC	CP	EM	CAM	LCM	MIC (μg/ml)	CLDM
>64							8 (16.7)		9 (18.8)		
64											
32					10 (20.8)		1 (2.1)	9* (18.8)			
16					1 (2.1)		4 (8.3)	3 (6.2)			
8							5 (10.4)	3 (6.2)		>4	8 (16.7)
4						7 (14.6)		3 (6.2)		4	
2						39 (81.2)			1 (2.1)	2	
1						2 (4.2)				1	2 (4.2)
0.5			25 (52.1)							<=0.5	38 (79.1)
0.25			21 (43.7)		20 (41.7)				17 (35.4)		
0.12			1 (2.1)		15 (31.2)		2 (4.2)		19 (39.5)		
0.06			1 (2.1)		2 (4.2)		28 (58.3)	27 (56.3)	2 (4.2)		
0.03	27 (56.2)							3 (6.3)			
0.015	20 (41.7)	2 (4.2)		4 (8.3)							
0.008	1 (2.1)	39 (81.2)		37 (77.1)							
<=0.004		7 (14.6)		7 (14.6)							
合計 (%)	48 (100)	48 (100)	48 (100)	48 (100)	48 (100)	48 (100)	48 (100)	48 (100)	48 (100)	合計(%)	48 (100)

¹⁾耐性:実線以上、感性:点線以下

*CAM 32 = >16

²⁾使用薬剤 ABPC: Ampicillin、CFDN: Cefdinir、CEX: Cefalexin、CDTR: Cefditoren、TC: Tetracycline、CP: Chloramphenicol、EM: Erythromycin、CAM: Clarithromycin、LCM: Lincomycin、CLDM: Clindamycin

表 4. 2019 年に都内の小児科定点病院で分離された S.pyogenes の薬剤感受性

MIC (μg/ml)	ABPC	CFDN	CEX	CDTR	TC	CP	EM	CAM	LCM	MIC (μg/ml)	CLDM
>64									13 (9.9)		
64					3 (2.3)		13 (9.9)				
32					2 (1.5)			13* (9.9)			
16							6 (4.6)	5 (3.8)			
8							3 (2.3)	3 (2.3)		>4	13 (9.9)
4						17 (13.0)		1 (0.8)		4	
2						113 (86.3)				2	
1						1 (0.7)				1	
0.5			61 (46.6)		3 (2.3)				2 (1.5)	<=0.5	118 (90.1)
0.25			65 (49.6)		71 (54.2)				63 (48.1)		
0.12			3 (2.3)		52 (39.7)		21 (16.0)	7 (5.3)	53 (40.5)		
0.06			2 (1.5)				88 (67.2)	96 (73.3)			
0.03	68 (51.9)							6 (4.6)			
0.015	58 (44.3)	1 (0.8)		1 (0.8)							
0.008	5 (3.8)	120 (91.6)		121 (92.3)							
<=0.004		10 (7.6)		9 (6.9)							
合計(%)	131 (100)	131 (100)	131 (100)	131 (100)	131 (100)	131 (100)	131 (100)	131 (100)	131 (100)	合計(%)	131 (100)

¹⁾耐性:実線以上、感性:点線以下

*CAM 32 = >16

²⁾使用薬剤 ABPC: Ampicillin、CFDN: Cefdinir、CEX: Cefalexin、CDTR: Cefditoren、TC: Tetracycline、CP: Chloramphenicol、EM: Erythromycin、CAM: Clarithromycin、LCM: Lincomycin、CLDM: Clindamycin

-第8号-

2019年の全国及び東京都における食中毒発 生状況

東京都健康安全研究センター 微生物部 食品微生物研究科 前田雅子

2019 年に全国及び東京都内で発生した食中毒事件の概要と特徴について、厚生労働省医薬・生活衛生局食品監視安全課並びに東京都福祉保健局健康安全部の資料に基づいて紹介する。

1. 全国における食中毒発生状況

食中毒事件数は1,061件、患者数は13,018名(死亡者4名)であり(表)、2018年の事件数1,330件、患者数17,282人と比べ、前年比事件数0.80、患者数0.75でどちらも減少した。そのうち病因物質不明は17件(1.6%)、患者数276名(2.1%)であった。

細菌性食中毒の事件数は385件(36.3%)であり、前年比0.82で減少した。病因物質別にみると、第1位は2003年以降連続してカンピロバクター286件(27.0%)であり、以下、黄色ブドウ球菌23件(2.2%)、ウエルシュ菌22件(2.1%)、サルモネラ21件(2.0%)、腸管出血性大腸菌20件(1.9%)、その他の病原大腸菌7件(0.7%)、セレウス菌6件(0.6%)、の順であった。2018年に集団発生が報告された腸炎ビブリオ、赤痢菌を原因とする食中毒の発生はなかった。また、腸炎ビブリオによる食中毒が厚生労働省の食中毒統計に掲載されるようになった1962年(63年までは病原性好塩菌として掲載され、64年から腸炎ビブリオとされる)以降、はじめて国内報告例がなかった。

細菌性食中毒の患者数は 4,739 名 (36.4%) で、前年比 0.71 で減少した。病因物質別では、ウエルシュ菌 1,166 名 (9.0%)、カンピロバクター1,937 名 (14.9%)、サルモネラ 476 名 (3.7%)、その他の病原大腸菌 373 名 (2.9%) の順であった。

1事件あたり患者数 500 名以上の食中毒は報告されなかったが(昨年1件)、静岡県で自家製ローストビーフを原因とするウエルシュ菌の食中毒が発生し、437名の患者が報告された。

ウイルス性食中毒では、ノロウイルスによる食中 毒事件数は 212 件 (20.0%) で、患者数が 6,889 名 (52.9%) であった。2019 年の食中毒患者数では最 多であったものの、前年比で事件数 0.83、患者数 0.81 と減少した。1事件あたり患者数 500 名以上の 食中毒は報告されなかったが(昨年1件)、兵庫県で昼食弁当を原因として483名の患者が報告された。

寄生虫性食中毒では、2013年より食中毒病因物質の種別に追加されたアニサキスによる食中毒事件数が328件(30.9%)、患者数336名(2.6%)で前年より減少したものの、食中毒全体の第1位(前年比0.70)であった。2018年4月及び5月に全国的に散発事例が報告されたカツオを原因とするアニサキス食中毒は大幅に減少した。また、クドアによる食中毒は17件(1.6%)であった。

化学物質による食中毒は9件(0.8%)、植物性自然毒は53件(5.0%)、動物性自然毒は28件(2.6%)であった。

食中毒による死亡者は4名で、その原因内訳は自然毒3名、ノロウイルス1名であった。原因食品は植物性自然毒のイヌサフラン2名と、動物性自然毒のフグ1名によるものであったが、ノロウイルスの原因食品は不明であった。

2. 東京都における食中毒発生状況

都内の食中毒事件数は119件、患者数は865名で、 死亡例は報告されなかった(表)。2018年の事件数 185件、患者数1,917名と比べ、前年比事件数0.64、 患者数0.45で、全国と同様、どちらも減少した。

細菌性食中毒の事件数は 48 件 (40.3%) で、病因物質別ではカンピロバクターが 36 件 (30.3%) と最多で、次いで腸管出血性大腸菌 5 件 (4.2%)、ウエルシュ菌 3 件 (2.5%)、サルモネラ 2 件 (1.7%)、黄色ブドウ球菌とセレウス菌が各 1 件(0.8%)であった。

細菌性食中毒の患者数は 449 名 (51.9%) が報告され、前年比 0.60 で減少した。病因物質別患者数では、ウエルシュ菌 196 名 (22.7%)、カンピロバクター187 名 (21.6%)、腸管出血性大腸菌 24 名 (2.8%)、セレウス菌 20 名 (2.3%)、サルモネラ 18 名 (2.1%)、黄色ブドウ球菌 4 名 (0.5%) の順であった。1 事件あたり患者数 100 名以上の食中毒は報告されなかったが(昨年1件)、教育訓練施設の寮で提供された仕出し弁当によるウエルシュ菌を原因とした食中毒が発生し、患者 93 名が報告された。

ウイルス性食中毒では、ノロウイルスによる食中 毒事件数が14件(11.8%)で前年の半数となり、患 者数266名(30.8%)も食中毒患者数では最多であっ たが、前年比0.29で大幅に減少した。1事件あたり 患者数100名以上の食中毒はなかった(昨年3件)。

寄生虫性食中毒では、アニサキスによる食中毒事 件数が51件(42.9%)、患者数53名(6.1%)で、事 ス(PA菌)が検出された。なお、現段階においてPA 件数では全国と同様最多発生件数であった。

病因物質不明の食中毒は3件(2.5%)、患者数81 名 (9.4%) であり、すべて飲食店で提供された食事 が原因であった。うち1件は、学生寮内の飲食店が 提供した食事により患者 59 名が下痢を呈した事件

で、患者からプロビデンシア・アルカリファシエン 菌の病原性については十分に解明されていない。

表. 2019年の食中毒発生状況(全国、東京都)

	产口炉		全国			東京都	
	病因物質	事件数(%)	患者数(%)	死者数	事件数(%)	患者数(%)	死者数
	サルモネラ	21 (2.0)	476 (3.7)	_	2 (1.7)	18 (2.1)	
	黄色ブドウ球菌	23 (2.2)	393 (3.0)	_	1 (0.8)	4 (0.5)	_
	ボツリヌス菌	_	_	_	_	_	_
	腸炎ビブリオ	_	_	_	_	_	_
	腸管出血性大腸菌	20 (1.9)	165 (1.3)	_	5 (4.2)	24 (2.8)	_
細菌	その他の病原大腸菌	7 (0.7)	373 (2.9)	_	_	_	_
	ウエルシュ菌	22 (2.1)	1,166 (9.0)	_	3 (2.5)	196 (22.7)	_
	セレウス菌	6 (0.6)	229 (1.8)	_	1 (0.8)	20 (2.3)	_
	エルシニア・エンテロコリチカ	_	_	_	_	_	_
	カンピロバクター	286 (27.0)	1,937 (14.9)	_	36 (30.3)	187 (21.6)	_
	赤痢菌	_	_	_	_	_	_
	総数	385 (36.3)	4,739 (36.4)	_	48 (40.3)	449 (51.9)	_
	ノロウイルス	212 (20.0)	6,889 (52.9)	1	14 (11.8)	266 (30.8)	_
ウイルス	その他のウイルス	6 (0.6)	142 (1.1)	_	_	_	_
	総数	218 (20.6)	7,031 (54.0)	1	14 (11.8)	266 (30.8)	_
	アニサキス (シュードテラノーバを含む)	328 (30.9)	336 (2.6)	_	51 (42.9)	53 (6.1)	_
	クドア・セプテンプンクタータ	17 (1.6)	188 (1.4)	_	_	_	_
寄生虫	サルコシスティス	_	_	_	_	_	_
	その他の寄生虫	2 (0.2)	10 (0.1)	_	_	_	_
	総数	347 (32.7)	534 (4.1)	_	51 (42.9)	53 (6.1)	_
化学物質	化学物質	9 (0.8)	229 (1.8)	_	1 (0.8)	7 (0.8)	_
	植物性自然毒	53 (5.0)	134 (1.0)	2	_	_	_
自然毒	動物性自然毒	28 (2.6)	38 (0.3)	1	<u> </u>	<u> </u>	<u> </u>
	総数	81 (7.6)	172 (1.3)	3	0 (0.0)	0 (0.0)	_
その他	*1	4 (0.4)	37 (0.3)	_	2 (1.7)	9 (1.0)	
原因物質	不明	17 (1.6)	276 (2.1)	_	3 (2.5)	81 (9.4)	_
総数		1,061 (100.0)	13,018 (100.0)	4	119 (100.0)	865 (100.0)	

^{*1} その他(4件)は、カンピロバクター及びサルモネラ(東京、他県)2件、カンピロバクター及び0103 (東京)、ノロウイルス及びサポウイルス(他県)との混合感染

-第9号-

次世代シーケンサーを用いた新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) ゲノム解析の有用性 東京都健康安全研究センター 微生物部 貞升 健志

一般にウイルスを解析する場合、そのウイルス遺 伝子の塩基配列を決定した後、比較したいウイルス 株の塩基配列(参照配列:他の国や地域で検出され たウイルス) を遺伝子データバンク (DDBJ、NCBI、 GISAID)等から得る。それらすべてを遺伝子解析ソ フトウエアで処理し、図1、2に示すような図を作 成していく。図1は分子系統樹解析、図2は分子系 統ネットワーク解析(ハプロタイプネットワーク解 析)と言われるものである。ある一族の祖先代々の 系図と似ており、比較対象との遺伝的位置関係を見 ることにより相互関係を調べる手法である。比較し たい対象と近似性が高い場合には互いに近くに位置 し、そうでなければ遠くに位置する。図1、2は新 型コロナウイルス (SARS-CoV-2) の系統解析である が、赤●で示すウイルス株(武漢株)と緑●は比較 的近縁であるが、赤●と青●は近くない位置関係に ある。その位置関係の差は比較対象との遺伝子変異 を示し、青●は赤●や緑●と比較して遺伝子が変異 していると判断される。

一般に、インフルエンザウイルスのようなRNAウイルスはRNAを複製する酵素が複製ミスを起こしやすいため、変異しやすい。特にインフルエンザウイルスのヘムアグルチニン(HA)遺伝子は可変領域であり、遺伝子解析を行うためには、数100~1,000塩基のHA領域の塩基配列解析で可能である。また、塩基配列解析のためには、解析領域の物理的な量が必要となる。例えば、インフルエンザ患者の咽頭拭い液等中のウイルスを解析する場合には、PCR 法もしくは nested-PCR 法によりウイルスの特異的領域を増幅するか、もしくはウイルス分離を行う必要がある。

SARS-CoV-2 は全長 29,900 塩基からなる RNA ウイルスである。塩基配列の誤りを校正するエキソヌクレアーゼという修復酵素を有するため、他のウイルスより変異が少なく、変異速度は 1 年間に 24.1 か所と言われている(1 か月で 1~2 塩基の変異)。インフルエンザウイルスの HA 領域に相当するような

特徴的な可変領域は存在しないため、ウイルス株間の比較にはウイルス全体の塩基配列(全長配列)が用いられている。29,900塩基もの全長解析を行う場合には、SARS-CoV-2そのものを培養で増やすか、遺伝子を増やすことが必要となる。

一般に、SARS-CoV-2 ゲノム解析は、感染者の臨床 検体から抽出した RNA を材料に、PCR 法で増幅した 遺伝子産物を次世代シーケンサー (NGS) で解析する 手法が用いられている。臨床材料から抽出された核 酸 RNA を 98 対のプライマーを用いて PCR 反応を行 い、その増幅産物をNGSにより解析している。この 際の PCR においてはウイルス量の多い検体でないと PCR で全長を増幅することが困難である。2020年 11 月に厚労省から発出された要請では、Ct 値が 30 よ り小さいものを国立感染症研究所(感染研)で解析 することとしている。Ct 値とは、リアルタイム PCR 検査で陽性となった数値の概算であり、Ct 値 30 は 30回の増幅(温度の上げ下げ)で陽性となった検体 を言い、Ct 値が 30 よりも小さいということは、30 回で陽性の検体よりもウイルス量が多い検体である ことを意味している。また、NGS 用に PCR で増幅し た結果、使用したプライマーの塩基配列も NGS によ り読まれてしまうため、最終的に 98×2=196 本の プライマー配列を取り除く作業工程が必要となる。

一方、SARS-CoV-2 の培養を行うためには、バイオハザードレベル3 (BSL3) 実験室で扱わなければならず、ウイルス量の多い検体でないと分離は不可能であり、ウイルスを培養する期間(1~2週間程度)も必要となる。

このような方法で決定された SARS-CoV-2 のゲノム情報は、GISAID (https://www.gisaid.org/)等で世界各地から登録されており、閲覧も可能である。登録内容には、遺伝子配列データの他に、収集日、収集場所、検体種、検査手法等も記載されている。一般に SARS-CoV-2 のプロトタイプは武漢株(Wuhan-Hu-1) であり、それを基準として比較されている。

日本における SARS-CoV-2 のゲノム解析情報は、感染研より、「新型コロナウイルス SARS-CoV-2 のゲノム分子疫学調査」として、4 月 27 日 (第 1 回) $^{1)}$ 、8 月 5 日 (第 2 回) $^{2)}$ 、12 月 11 日 (第 3 回) $^{3)}$ にハプロタイプネットワーク解析として公開されている。内容としては、2019 年末の中国・武漢を発端とするウイルス株を起点として、日本各地で初期のクラスターが複数発生したが消失に転じ、2 月にはクルー

ズ船関連の集団発生も認められたがそのタイプも消失し、3 月下旬に欧州系統の同時多発と思われるクラスターが発生し、全国に拡大したとしている。

世界での分子疫学解析は、NEXTstrain (https://nextstrain.org/sars-cov-2/) を参照して頂きたい。NEXTstrainではSARS-CoV-2を19A(L)、19B(S)、20A(G)、20B(GR)、20C(GH)等のサブクレードに分類し、どのように世界各地に蔓延したかを時系列の図式で示している。初期に武漢で発生したサブクレードは19A(L)と19B(S)とされ、19Aから派生した20Aはスパイク蛋白を作る614番目のアミノ酸がアスパラギン酸(D)からグリシン(G)に変わっており(D614G)、その後3月にヨーロッパで大流行し、日本を含む世界中に広がった。さらに、20Aと遺伝的に異なる20Bと20Cも出現している。東京都においても19Aは1月の検体から分離され 4 、その後、多くのウイルスを分離・解析している 5 。

また、もう一つゲノム解析の利用方法として、施設内の集団発生の解析に使用される場合がある。施設内で集団感染があった場合、感染がどこから始まり、どのように広がったのかがわからない場合がある。Takenouchiら 6 1 k NGS 解析の院内感染等における NGS の有用性を報告している。細菌を原因とする場合には PFGE (pulsed-field gel electrophoresis) や VNTR(Variable number of tandem repeat)等が用いられているが、SARS-CoV-2 では NGS によるゲノム解析が疫学調査の一助となる。

SARS-CoV-2が発見され、全世界で感染者が発生し始めて早1年が経つ。先にご紹介した GISAID では既に約22万のゲノム配列が登録されている。残念ながら現時点では、ウイルスが弱毒化した証拠はなく、このようなゲノム解析を通じて、都内の状況のみならず、海外からのサブクレードの流入についても注視していかなければならない。

<引用文献>

- 1) 国立感染症研究所,新型コロナウイルス SARS-CoV-2 の ゲ ノ ム 分 子 疫 学 調 査 , https://www.niid.go.jp/niid/ja/basic-science/467-genome/9586-genome-2020-1.html
- 2) 国立感染症研究所,新型コロナウイルス SARS-CoV-2 のゲノム分子疫学調査 2 (2020/7/16 現在), https://www.niid.go.jp/niid/ja/basic-
- 3) 新型コロナウイルス SARS-CoV-2 のゲノム分子疫 学調査(2020年10月26日現在) https://www.niid.go.jp/niid/ja/diseases/ka /corona-virus/2019-ncov/2488-idsc/iasrnews/10022-491p01.html

science/467-genome/9787-genome-2020-2.html

- 4) Nagashima M., et al, JJID. 2020. 137, DOI https://doi.org/10.7883/yoken. JJID. 2020.
- 5) 浅倉弘幸ら、東京都健康安全研究センター年報 (先行公開)、http://www.tokyo-eiken.go.jp/ files/archive/issue/kenkyunenpo/nenpou71/ 71-07_11senkou.pdf
- 6) Takenouchi T., et al, J. Hospital Infect., 107, 40-44, 2021

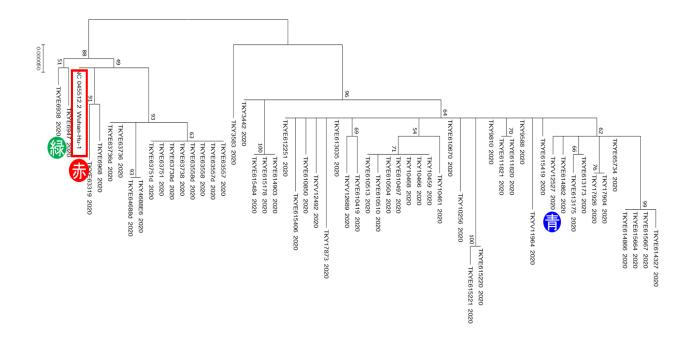


図1. 分子系統樹解析(SARS-CoV-2 ゲノム)

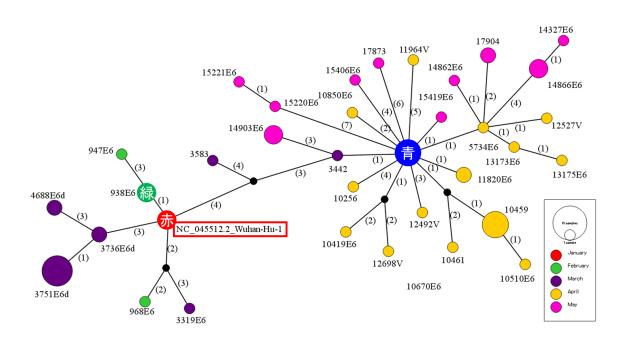


図2. 分子系統ネットワーク(ハプロタイプネットワーク)解析 (SARS-CoV-2 ゲノム)

-第10-1号-

東京都で分離されたサルモネラ (チフス菌・パラチフス A 菌を含む) の血清型及び薬剤感受性について (2018~2019年)

東京都健康安全研究センター 微生物部 食品微生物研究科 村上 昂

2018 年から 2019 年の 2 年間に東京都健康安全研究センター並びに都・区検査機関、都内の病院、登録衛生検査所等で分離されたサルモネラを対象に、血清型別及び薬剤感受性試験の成績について、その概略を示す。また、チフス菌及びパラチフス A 菌については国立感染症研究所(感染研)に依頼したファージ型別の成績も併せて紹介する。

供試菌株は、都内の患者とその関係者及び保菌者 検索事業によって分離されたチフス菌 11 株、パラチ フス A 菌 12 株 (全て海外由来株) 及びその他のサ ルモネラ 469 株 (海外:4 株、国内:465 株) である。

血清型別は、市販の抗血清を用いてO群及びH抗原を決定した。薬剤感受性試験は、米国臨床検査標準化協会 (CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute) の抗菌薬ディスク感受性試験実施基準に基づき、市販の感受性試験用ディスク (センシディスク: BD) を用いて行った。供試薬剤は、クロラムフェニコール (CP)、テトラサイクリン (TC)、ストレプトマイシン (SM)、カナマイシン (KM)、アンピシリン (ABPC)、スルファメトキサゾール・トリメトプリム合剤 (ST)、ナリジクス酸 (NA)、ホスホマイシン (FOM)、ノルフロキサシン (NFLX)及びセフォタキシム (CTX)の10剤である。

チフス菌及びパラチフス A 菌の NA 耐性株については、Etest(ビオメリュー・ジャパン)を用いてシプロフロキサシン(CPFX)、レボフロキサシン(LVFX)及びノルフロキサシン(NFLX)の 3 種類のフルオロキノロン系薬剤に対する最小発育阻止濃度(MIC: μ g/ml)を測定した。また、CTX 耐性のサルモネラについては、基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ(以下、ESBL)産生菌または AmpC 型 β -ラクタマーゼ(以下、AmpC)産生菌と推定し、リアルタイム PCR 法により遺伝子型の決定を行った。

1. チフス菌及びパラチフス A 菌

薬剤耐性菌出現頻度及び薬剤耐性パターンを表 1 に示す。チフス菌では、11 株のうち9 株は供試した薬剤のうちいずれかに耐性を示し、特に 2018 年にパキスタンからの帰国者から分離された 1 株は CP・ $SM \cdot ABPC \cdot ST \cdot NA \cdot CTX$ の 6 剤に耐性を示した。その他、 $NA \cdot FOM \cdot NFLX$ の 3 剤耐性が 1 株 (インド)、 $NA \cdot NFLX$ の 2 剤耐性が 2 株 (インド)、 $NA \cdot NFLX$ の 2 剤耐性が 2 株 (インド)、 $NA \cdot NFLX$ の 2 剤耐性が 5 株 (インド:2、ネパール:2、ミャンマー:1) であった。供試薬剤全てに感受性の株は 2 株 (インドネシア、バングラデシュ) であった。また、チフス菌 11 株のファージ型の内訳は、UVS (Untypable Vi Strain) 4 型が 4 株、DVS(Degrated Vi positive Strain) 型、 $E1 \cdot 型$ が各 2 株、 $M1 \cdot 型$ 、 $UVS1 \cdot 型$ 、 $UVS2 \cdot 型$ が各 1 株であった。

パラチフス A 菌では、12 株のうち 11 株が耐性株であった。このうち 2 株は $NA \cdot FOM$ の 2 剤耐性株(インド)で、9 株は NA 単剤に耐性を示した(インド:6、カンボジア:2、アジア複数国:1)。パラチフス A 菌 12 株のファージ型は、1 型及び UT(Untypable)が各 4 株、2 型が 3 株、13 型が 1 株であった。

NA 耐性を示したチフス菌及びパラチフス A 菌 20 株について、フルオロキノロン系薬剤に対する MIC を測定し CPFX を基準として判定した。チフス菌は 4 株が耐性、5 株が中間を示した。パラチフス A 菌は、11 株全てが中間を示した(表 2-1, 表 2-2)。

また、前述のパキスタン帰国者由来の6剤耐性のチフス菌はESBL産生菌であることが確認され、遺伝子型はTEM型、CTX-M型(CTX-M-1 Group)であった。腸チフスの治療に用いられる抗菌薬は、以前は第一選択薬としてフルオロキノロン系薬剤が使用されていたが、耐性菌の出現に伴い、現在は第三世代セファロスポリン系薬剤あるいはアジスロマイシンが使用されている¹⁾。しかし、本菌のような第三世代セファロスポリン系抗菌薬に耐性を示すチフス菌がパキスタンを中心に世界中に伝播しているとの報告²⁾もあり、今後のチフス菌の薬剤耐性動向を注視する必要がある。

2. チフス菌・パラチフス A 菌以外のサルモネラ

供試した 469 株の血清型及び耐性菌の出現頻度を表3に示した。主なO群は、O4群218株(46.5%)、O7群89株(19.0%)、O8群87株(18.6%)、O9群25株(5.3%)で、これらで全体の89.3%を占めた。

検出頻度の高い血清型は、S. Schwarzengrund (O4群, 102株、S. Newport (O8群, 31株)、Salmonella O4:i: ー(S. Typhimuriumの単相変異菌, 29株)、S. Thompson (O7群, 26株)、S. Enteritidis (O9群, 22株)、S. Typhimurium (O4群, 21株) 及びS. Infantis (O7群, 20株)、S. Agona (O4群, 20株) であった。

サルモネラ 469 株中 197 株 (42.0%) は薬剤耐性株で、2016 年 (42.2%) ³⁾、2017 年 (40.1%) ⁴⁾ と同程度の耐性頻度であった。各薬剤に対する耐性率はTC (30.3%)、SM (27.7%)、KM (18.3%)、ABPC (9.0%)、ST (9.0%)、NA (8.3%)、CP (5.8%)、CTX (3.0%)、NFLX (0.4%)であった。また、FOM耐性菌が2018 年に2株、2019 年に1株、計3株分離された。都におけるFOM耐性サルモネラの検出は2001 年の1 株以来、17年ぶりであった。なお、FOM耐性サルモネラの血清型は全て S. Agona であった。

薬剤耐性パターンは 50 種類で、TC·SM (30 株)、TC·SM・KM (28 株)、及び KM 単剤耐性 (16 株)が主要なものであった (表 4)。O 群別の耐性頻度では、O4 群が 64.7%、O7 群 14.6%、O8 群 (20.7%)、O9 群が 48.0%であった。検出頻度の高い上述 7 血清型のうち、耐性率が 80%を超えた血清型は S. O4:i:- (93.1%)、S. Schwarzengrund (84.3%)、S. Agona (80.0%) であった。

CTX に耐性を示す株は 14株(3.0%)検出された。 これらの株の血清型は、S. Muenster (3 株)、S. Blockley (3 株)、S. Schwarzengrund (2 株)、S. Minnesota (2 株)、S. Thompson (2 株)、S. Mbandaka (1 株)、S. Anatum (1株) であった。このうち、6株が ESBL 産 生菌、4株が AmpC 産生菌、1株が、ESBL・AmpC を共に産生する菌であった。ESBL 産生菌の血清型 は、S. Blockley (3 株)、S. Schwarzengrund (1 株)、 S. Muenster (2株) であることが確認され、遺伝子型 はいずれも CTX-M型 (CTX-M-1 group) であった。 また、AmpC 産生株では S. Minnesota (2 株)、S. Thompson (1 株) の遺伝子型が CIT 型、S. Anatum (1株)の遺伝子型が DHA 型であった。さらに、 ESBL・AmpC 共産生菌の血清型は S. Thompson であ り、遺伝子型はそれぞれ TEM 型、CIT 型であった。 また、S. Mbandaka (1株)、S. Schwarzengrund (1株)、 S. Muenster (1株) は ESBL・AmpC 共に非産生菌で あった。

サルモネラには多剤耐性菌が多く、依然として耐

性菌の減少が認められないことから、菌株の疫学解析は益々重要となる。海外における薬剤耐性菌の動向とともに、引き続き、国内の薬剤耐性菌の動向を注意深く監視する必要がある。

<引用文献>

- 1) 国立感染症研究所:腸チフス・パラチフスとは, https://www.niid.go.jp/niid/ja/kansennohanashi/440typhi-intro.html
- 2) 厚生労働省検疫所: Disease outbreak news 2018 年 12 月 27 日, https://www.forth.go.jp/topics/20190109.html
- 3) 東京都微生物検査情報, 39(1): 1-4, 2018.
- 4) 東京都微生物検査情報, 39(12): 1-4, 2018.

表1. チフス菌およびパラチフス A 菌の薬剤耐性パターン(2018 年-2019 年: 東京)

	チフス菌	パラチフスA菌	計
供試株数	11	12	23
耐性株数	9	11	20
(耐性率(%))	(81.8)	(91.7)	(87.0)
耐性パターン			
$CP \cdot SM \cdot ABPC \cdot ST \cdot NA \cdot CTX$	1		1
NA · FOM · NFLX	1		1
NA·FOM		2	2
NA · NFLX	2		2
NA	5	9	14
全て感受性	2	1	3

供試薬剤: CP, TC, SM, KM, ABPC, ST, NA, FOM, NFLX, CTX

表2-1. チフス菌およびパラチフス A 菌のフルオロキノロン系薬剤に対する MIC 分布 (2018 年 -2019 年: 東京)

			٦	MIC(μg/ml))
	株数	判定*	CPFX	LVFX	NFLX
チフス菌	4	(耐性)	2.0-≥32	3.0-16	6.0-128
	5	(中間)	0.25-0.5	0.38-1.0	1.5-6.0
パラチフスA菌	11	(中間)	0.25-0.5	1.0-1.5	2.0-4.0

^{*}フルオロキノロン系薬剤に対する耐性はCPFXを基準として判定した。 (表2-2参照)

表2-2. サルモネラ属菌のフルオロキノロン系薬剤に対する判定基準*

-	MICによる判定基準(μg/ml)			
	S	1	R	
	(感受性)	(中間)	(耐性)	
CPFX	≤0.06	0.12-0.5	≥1	
LVFX	≤0.12	0.25-1	≥2	

^{*}CLSI 2020年1月現在

表3. サルモネラ(チフス菌、パラチフス菌を除く)の血清型と薬剤耐性菌出現頻度 (2018 年-2019 年: 東京)

O群	血清型	供試株数	耐性株数*	(耐性率(%))
	Agona	20	16	(80.0)
	Schwarzengrund	102	86	(84.3)
	Stanley	11	0	
04	Typhimurium	21	6	(28.6)
	O4:i:-	29	27	(93.1)
	その他	35	6	(17.1)
		218 (46.5)	141	(64.7)
	Infantis	20	4	(20.0)
	Mbandaka	11	4	(36.4)
07	Thompson	26	2	(7.7)
	その他	32	3	(9.4)
	小計	89 (19.0)	13	(14.6)
	Altona	11	0	
08	Newport	31	2	(6.5)
08	その他	45	16	(35.6)
	小計	87 (18.6)	18	(20.7)
	Enteritidis	22	12	(54.5)
09	その他	3	0	
	·//言十	25 (5.3)	12	(48.0)
その他		50 (10.7)	13	(26.0)
	合計	469 (100)	197	(42.0)

^{*}供試薬剤(10種類)のうち、1薬剤以上に耐性を示した菌株

表4. サルモネラ(チフス菌、パラチフス菌を除く)の主な薬剤耐性パターン (2018 年-2019 年: 東京)

血清型	04	07	08	09	O3,10	O13	その他	計
供試株数	218	89	87	25	23	12	15	469
耐性株数	141	13	18	12	7	0	6	197
(耐性率 (%))	(64.7)	(14.6)	(20.7)	(48.0)	(30.4)		(40.0)	(42.0)
耐性パターン								
$TC \cdot SM$	25		5					30
$TC \cdot SM \cdot KM$	25	1	1				1	28
KM	15		1					16
$TC \cdot SM \cdot KM \cdot ST$	11	3					1	15
$TC \cdot SM \cdot ABPC$	13							13
NA		1		9	2		1	13
TC	11	1						12
その他	41	7	11	3	5		3	70
すべて感受性	77	76	69	13	16	12	9	272

供試薬剤: CP, TC, SM, KM, ABPC, ST, NA, FOM, NFLX, CTX

-第10-2号-

都内における流行性筋痛症事例からのヒトパレコウイルス3型の検出(2019年)

東京都健康安全研究センター 微生物部 ウイルス研究科 鈴木 愛

ヒトパレコウイルス (HPeV) は主に小児の感染性 腸炎や呼吸器疾患から検出されるウイルスである ¹⁾。 HPeV は現在 19 の型が確認されており ²⁾、特に HPeV3 は生後 3 か月未満の新生児・早期乳児の敗血症や髄膜脳炎などの重症感染症を引き起こす原因ウイルスとして注目されている。また近年では、成人および小児において、四肢に生じる強度の筋痛、筋脱力を特徴とし時に歩行困難を呈する流行性筋痛症患者から HPeV3 が検出されたとの報告が複数あり、その関連性が指摘されている ³⁾。

2019年6~10月にかけて、都内の複数の医療機関において流行性筋痛症患者が発生し、HPeV3が検出された事例を経験した。それらの患者からの検出状況の概要を表に示す。患者検体は都内5か所の医療機関より、計16名分(27検体)が東京都健康安全研究センター(健安研)に搬入された。検体種は咽頭ぬぐい液(13件)、糞便(11件)、血清(2件)、髄液(1件)で、患者の年齢は19~48歳、男性13名女性3名であった。

HPeV の検出は、VP1 領域をターゲットとした RT-PCR 法により行った。得られた増幅産物においてダイレクトシーケンスを実施し塩基配列を決定した後、系統樹解析を行った(図)。

その結果、患者 16 名中 12 名 (15 検体) から HPeV3 が検出された。また医療機関での聴取により小児との接触が明らかな患者は 7 名で、そのうち HPeV3 が検出されたのは 6 名であった。接触の小児は感冒様症状や手足口病の罹患や、発疹等の症状を呈していた。

我が国においては、HPeV3 は 2~3年周期で夏から秋にかけての流行が認められ、2019年は全国でもウイルス検出報告数が多く 4)、都内においても流行があったことが推察される。また HPeV3 は無症状の小児もウイルスを伝播している可能性が指摘され 5)、症状の有無に関わらず、家庭内における接触が重要な感染経路の一つと考えられた。流行性筋痛症を起

こす疾患として他にインフルエンザ筋炎、ボルンホルム病、ギランバレー症候群等が挙げられるが、HPeV3による筋痛症は比較的若年の男性に発症が多いとされの、今回の結果とも一致している。しかしながら、性差が生じる理由は未だ不明であり、さらなる検討が必要である。

今回は医療機関側からの直接の依頼検査で HPeV 検索を実施した。元来、流行性筋痛症は感染症法の 把握対象疾患ではないため、通常の感染症発生動向 調査等での流行の把握は困難といえる。今後も流行 状況を鑑み、健安研で実施しているレファレンス事 業や、感染症発生動向調査や積極的疫学調査を活用 し、筋痛を症状に訴える疾患については HPeV を検 査対象に加え、ウイルス学的検索を実施する必要性 があると考えられた。

<引用文献>

- 1) 伊藤 雅ら, モダンメディア 53:329-336,2007
- picornaviridae.com
 http://www.picornaviridae.com/parechovirus/parechovirus a/parechovirus a.htm
- 3) 佐野貴子 他: IASR,40,158-159,2019.
- 4) 年別ウイルス検出状況 https://nesid4g.mhlw.go.jp/Byogentai/Pdf/data60j. pdf
- 5) Yuta A, et al., J Clin Virology 70: 105-108, 2015.
- 6) Kenta O, et al., I Med 59(14): 1721-1726, 2020.

表. 流行性筋痛症と診断された患者の概要とHPeV3 検出状況

患者	搬入日	医療機関	年齢	性別	検体種	PCR結果	備考		
1			32	男	咽頭ぬぐい液	HPeV3	子供が鼻水症状		
2			47	男	咽頭ぬぐい液	HPeV3	子供が手足口病		
3	6/27		20	28 男 -	咽頭ぬぐい液	(-)			
3		А	20		糞便	(-)			
4		A	38	女	咽頭ぬぐい液	(-)	子供が発疹と鼻水症状		
4	7/17		30	Α	糞便	HPeV3	」 供が光沙 C 昇小症1人		
5	6/27		34	男	咽頭ぬぐい液	(-)	子供が咳と鼻水症状		
3	0/21		34	カ	便	HPeV3	」		
6			39	男	髄液	(-)			
	7/4	В	33	カ	血清	(-)			
7	1/4	В	45	男	咽頭ぬぐい液	HPeV3			
'			40	カ	血清	(-)			
8			46	男	糞便	HPeV3	子供が咳と熱		
0			40		咽頭ぬぐい液		」片が多く熱		
9	7/17	Α	42	男	糞便	HPeV3	子供が手足口病		
9			42	カ	咽頭ぬぐい液	(-)) 庆// 于足口/的		
10			36	男	咽頭ぬぐい液	(-)			
11	11 7/23		48	男	糞便	HPeV3			
11	1/23	С	40	カ	咽頭ぬぐい液	TIFEVS			
12	8/8	Α	38	男	糞便	HPeV3	子供が鼻水症状		
12	0/0	^	50	₹ P	咽頭ぬぐい液	(-)	」		
13	8/19	D	19	男	咽頭ぬぐい液	HPeV3			
15	0/19		19	カ	糞便	111 673			
14	14 9/19	А	43	男	糞便	HPeV3			
14	3/ 13		45	71	咽頭ぬぐい液	(-)			
15	10/24	4 E	Е	Е	44	男	糞便	HPeV3	
16	10/24		23	女	糞便	(-)			

-第11号-

都内の動物病院を受診した犬・猫から分離された ESBL 産生大腸菌について(2017~2018 年 度)

東京都健康安全研究センター 微生物部 病原細菌研究科 小林 甲斐

2016年に策定された薬剤耐性 (AMR) 対策アクションプランでは、ヒトと動物の垣根を越えて AMR動向を把握する体制の強化が必要とされている ¹⁾。また、2017年からは動物由来薬剤耐性菌モニタリング (JVARM) では、愛玩動物における全国的な AMRモニタリング調査が開始されている ²⁾。アクションプランでは、動物に関する成果指標として大腸菌の第3世代セファロスポリンおよびフルオロキノロンの耐性率が掲げられている ¹⁾。

これらの薬剤に耐性を持つ、基質拡張型 β ラクタマーゼ (ESBL) 産生大腸菌のB2-O25-ST131に属する系統の世界的な蔓延がヒトや動物において報告されており、同じ系統の菌株が国内の犬・猫からも分離されている 3)。なお、"B2"は系統発生群の 7 つの分類 (A、B1、B2、C、D、E、F)の 1 つで、"O25"は O 抗原の血清型、"ST131"は Multilocus Sequence Typing (MLST) による遺伝子型をそれぞれ示している。

都では動物由来感染症調査事業において、都内の動物病院を受診した犬・猫における動物由来感染症のモニタリング調査を実施しており、収集した大腸菌等の薬剤感受性試験をはじめとした疫学解析を行っている。

2017~2018 年度に本モニタリング調査で犬・猫由来の O 血清型が決定された大腸菌 56 株が東京都健康安全研究センター(当センター)に搬入された。ディスク拡散法による 16 薬剤の感受性試験を行うとともに、市販の鑑別ディスクを用いて ESBL 産生を確認した。あわせて、ベロ毒素 (VT) 遺伝子の PCRを行った。ESBL 産生の O25 については系統発生群別 PCR、H 血清型別、および MLST を行った。

その結果、搬入された 56 株中 6 株 (10.7%、犬由来 4 株、猫由来 2 株) が ESBL 産生大腸菌であり、CTX、NFLX、OFLX、CPFX に耐性を示した (表)。これらの薬剤のうち、CTX は第 3 世代セファロスポリン、NFLX、OFLX、CPFX はフルオロキノロン系

の薬剤である。6 株中 5 株は O25、1 株は O1 であり、O25 はすべて系統発生群B2、ST131 に分類され、H 血清型は 4 株が H4、1 株は NM であった。なお、VT 遺伝子は、6 株とも検出されなかった(表)。

今回の調査では、都内の動物病院を受診した犬・猫由来の大腸菌について、56 株中 5 株 (8.9%) が ESBL 産生大腸菌 B2-O25-ST131 であった。2015 年 に行われた国内の調査では、犬・猫由来大腸菌 131 株中 15 株 (11.5%) が本系統に属する株であったことが報告されており 3、都内においても本系統の株が同程度蔓延していることが示唆された。

今回検出された株はいずれも VT 遺伝子は保有しておらず、仮にこれらの株が飼い主へ感染しても感染症法等の検査対象とはならず看過される可能性がある。ESBL 産生大腸菌の伝播が、飼い主と伴侶動物の間で相互に起こるのか、一方向に起こるのかは現時点では不明である。しかしながら、伴侶動物が本菌のベクターやリザーバーになる可能性を考慮し、抗菌薬の適正使用を推進し、他の動物由来感染症を予防する観点からも動物と触れ合った後には手洗い・消毒等の衛生対策を励行することが重要である。

今後、当センターでは、O血清型別不能の大腸菌も調査対象に含めて本調査を継続し、都内の動物病院を受診した犬・猫における ESBL 産生大腸菌の動向についてモニタリングしていく予定である。

<引用文献>

- 1) 厚生労働省:薬剤耐性 (AMR) 対策アクション プラン
 - https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000120172.html
- 動物医薬品検査所:愛玩(伴侶)動物での薬剤 耐性菌のモニタリング,
 - https://www.maff.go.jp/nval/yakuzai/yakuzai_p3. html
- Kawamura *et al.*, Microb. Drug Resist., 23, 1059-1066, 2017

表. 犬・猫由来 ESBL 産生大腸菌 6株の血清型・系統発生群・MLST・薬剤耐性・病原遺伝子

No.	動物種	血清型	系統発生群	Sequence Type	薬剤耐性*	VT 遺伝子	
1	犬	O25:H4	B2	ST131	ABPC,CTX,NA,NFLX,OFLX,	検出せず	
1	A	023.114	DZ	31131	CPFX,KM	役出セタ	
2	犬	O25:H4	В2	ST131	ABPC,CTX,NA,NFLX,OFLX,	検出せず	
2	A	023.114	DZ	31131	CPFX,KM,GM	作火山で 9	
3	犬	O25:NM	B2 ST1	CT121	ABPC,CTX,NA,NFLX,OFLX,	検出せず	
3	A	UZ5:INIVI	В2	ST131	CPFX,KM,GM	快出せり	
4	猫	O25:H4	B2	ST131	ABPC,CTX,NA,NFLX,OFLX,	検出せず	
4	1田	U23.П4	BΖ	31131	CPFX	快出せ 9	
5	猫	O25:H4	B2	ST131	ABPC,CTX,NA,NFLX,OFLX,	検出せず	
Э	1田	U23.∏4	52	31131	CPFX	快山セ 9	
6	犬	01			ABPC,CTX,NA,NFLX,OFLX,	検出せず	
о Д		OI	-	-	CPFX,KM	1火山 已 9	

[※] 使用薬剤 ABPC: Ampicillin, CTX: Cefotaxime, IMP: Imipenem, MEPM: Meropenem, SM: Streptomycin,

KM: Kanamycin, GM: Gentamicin, AMK: Amikacin, TC: Tetracycline, CP: Chloramphenicol, FOM: Fosfomycin,

NA: Nalidixic acid, NFLX: Norfloxacin, OFLX: Ofloxacin, CPFX: Ciprofloxacin, ST: Trimethoprim sulfamethoxazole

-第12-1号-

新型コロナウイルス(SARS-CoV-2)における抗体検査について

東京都健康安全研究センター 微生物部 ウイルス研究科 藤原 卓士

2019年12月末に、中華人民共和国の武漢で発生した新型コロナウイルス感染症(COVID-19)は、多くの市民を巻き込みながら、全世界に広がっていった。現在も世界の各国がその対策および対応に追われており、先の見えない戦いが続いている。

一般に、ウイルス感染症における検査には、大きく分けて三つの方法 Dがある。一つ目は積極的にウイルスの持つ DNA ないし RNA を検出する核酸増幅検査 (PCR 検査等)である。ウイルスの DNA ないし RNA を試験管内で多量に増幅することで、検体中にごくわずかしかないウイルスを確認する手法である。二つ目に、ウイルスの侵入によって体内に生み出されたたんぱく質 (抗原)を捕捉・確認する抗原検査がある。これら二者は、人体に存在するウイルスもしくはウイルスの増殖過程で産出されたたんぱく質を見ているため、今現在、被験者の身体の中にウイルスがいる、もしくは直近にいたことを確認する方法である。

三つ目が抗体検査であるが、これは前者の二つとは大きく異なり、体内に侵入してきたウイルスに対して人体が反応し、発現した抗体を測定することで、過去にウイルスに感染したことがあるかどうかを判定する検査である(一部のウイルス感染症では、現在の感染を示すのに使用されている)。人における抗体(免疫グロブリン)には五種類(IgG、IgA、IgM、IgD、IgE)あるが、この内、感染症診断で大きな役割を担っているのは IgM と IgG である。ウイルスの感染によって抗原が体内に現れると、まず IgM が一過性の増加を示し、次に比較的長期間にわたりIgG が増加する(一次応答)。これらの抗体を検出することで被験者のウイルスへの感染の有無を確認や抗体保有の有無をみる。

現在、新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) における抗体検査を行うために様々なキットおよび機器が 市販されているが、多くの抗体検査において用いら れている測定原理として、イムノクロマト法と免疫 測定法がある。イムノクロマト法 2)は細かい隙間を 持つ物質内を水がその張力により少しずつ流れてい く毛細管現象を利用している。検体を少量の液体に 溶解させろ紙の一端に添加すると、検体がろ紙の他 端へと移動していく。流路の途中にはコロナの抗体 と結合する、着色料のついた物質が塗布されており、 検体中にコロナの抗体が存在した場合、抗体と結合 しろ紙上を動いていく。次に、流れたコロナの抗体 がろ紙の途中に並べられた抗体と結合し、目的の抗 体が集約され色調のついたバンドが形成されること で、目的の抗体が目視で確認できる。この検査の性 質上、簡便で大掛かりな装置を必要としないことに 加え、比較的時間をかけることなく大量の検体をさ ばけるので、臨床現場でのスクリーニングに向いて いるが、通常定性的で感度が低い。

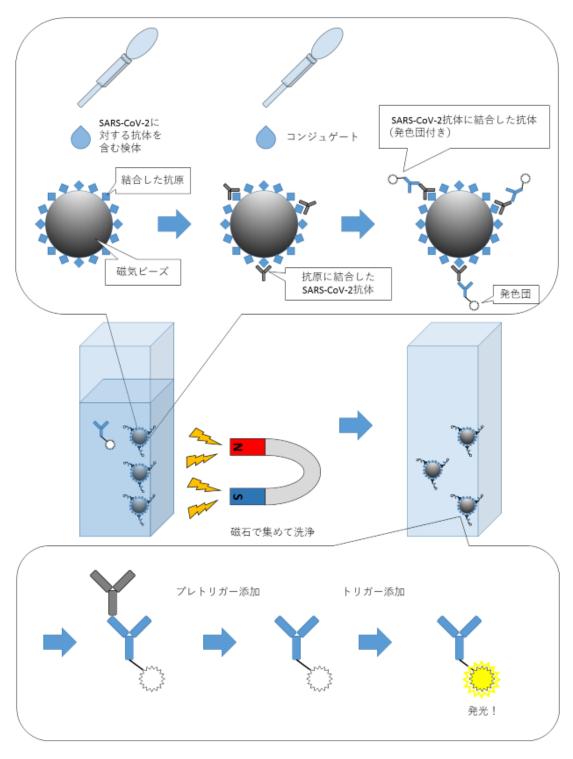
これに対し、免疫測定法は固相化した抗体(抗原) に抗原(抗体)を反応させ、化学発光物質等で標識 した抗体を抗原(抗体)に反応させた後、化学発光 物質の発光強度を測定し、検出する方法である。一 例を挙げると表面に SARS-CoV-2 のリコンビナン ト抗原を固定化させた磁性粒子に検体(血清または 血漿)を加え、検体中の抗体を結合させる。そこに 発光するよう標識化した抗体を加えて、磁性粒子上 の目的の抗体に結合させる。トリガーを加えて反応 させ、発光した標識部位からの光量を測定する(図)。 測定された光量が閾値を超えた検体については、 SARS-CoV-2 に対する抗体が存在している、すなわ ち陽性と判定する。発光免疫測定法は、発光の強度 により検体中の抗体量を定量的に扱うことも可能で あるが、大きな装置や様々な試薬を用いるため、検 査に必要な費用がイムノクロマト法と比較して高額 になりやすい。なお、2020年に国内数か所の都市で 実施された SARS-CoV-2 抗体保有率の調査では、こ の原理を用いた方法が使用された。

いずれの方法も簡便性、コストによる導入のしや すさなどメリットとデメリットが明確に存在するため、検出目的に合わせた利用が必要と考えられる。 現在、日本においては薬事承認の得られた抗体検査 試薬はまだないが、今後、新型コロナウイルスワク チンの普及に伴い、抗体獲得率の調査等で抗体検査 の必要性が増すものと考えられる。

<引用文献>

- 1) 厚生労働省:COVID-19 tests, https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/ 0000121431_00182.html
- 2) Li Z, Yi Y, Luo X, et al., J Med Virol. 92:1518– 1524.2020

図. SARS-CoV-2 免疫測定法の原理



-第 12-2 号-

新型コロナウイルスの変異株 (N501Y変異ウイルス)の検査について 東京都健康安全研究センター 微生物部 ウイルス研究科 長島真美

新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) は 29,900 塩基の RNA ウイルスであり、1 か月に 2 塩基程度の割合で変異するといわれている。なかでもスパイク (S) タンパクの 501 番目のアミノ酸がアスパラギン (N) からチロシン (Y) に変異する (N501Y 変異)と感染性や伝播のしやすさに影響するとされている。N501Y 変異ウイルスは、現在世界各地で検出されており、その流行が懸念されている。

2021年2月末現在、N501Y変異ウイルスとして、VOC-202012/01(501Y.V1)、501Y.V2、501Y.V3 の3つのタイプが報告されている。501Y.V2、501Y.V3は、N501Y変異の他に、抗原性に影響を与える可能性がある E484K変異(スパイクタンパクの484番目のアミノ酸がグルタミン酸(E)からリジン(K)に変異)を有している(表)。VOC-202012/01 および501Y.V2 は2020年12月中旬に、501Y.V3 は1月中旬に日本の検疫で見つかったウイルスである。

ウイルスは細菌とは異なり、生きた細胞の中に 入らないと増殖することはできない。また、ウイ ルスが細胞に入るためには細胞側にあるレセプ ターと呼ばれる結合部分と結合する必要がある。 SARS-CoV-2 に対するレセプターは、アンギオテ ンシン転換酵素2:ACE2といわれるタンパク質 であり、ACE2 と SARS-CoV-2 のスパイクタンパ クが結合することで、感染が成立する。このスパ イクタンパクに N501Y 変異が入ると、今までの SARS-CoV-2 に比べ ACE2 への吸着度が増すと され、N501Y変異株の感染性が高まる所以と考え られる。また、これら 3 種類の N501Y 変異ウイ ルスは、いずれも N501Y 変異を有するものの異 なった系統のウイルスであり、それぞれが異なる 地域で発生したものである。そのため、今後も新 たな地域から新しい N501Y 変異株が出現する可 能性は否定できない。また、501番目以外のアミノ酸変異による感染力への影響については、現状では十分な科学的裏付けに至っていない。

我が国では、2020年12月23日付厚生労働省 の事務連絡で、英国滞在歴のある感染者の検体を 国立感染症研究所に送付することとされた。東京 都では、12月28日から東京都健康安全研究セン ターで実施した SARS-CoV-2 検査陽性例につい て、N501Y変異株スクリーニング検査を実施して いる(図)。当初は多数処理が可能な N501Y 変異 スクリーニング検査法がなく、独自に開発したリ アルタイム PCR 法を用いた。その後、2021年1 月 21 日付けで、感染研からリアルタイム PCR 法 を用いた N501Y 変異検出マニュアルが地方衛生 研究所に通達され、全国の地衛研で統一された方 法による N501Y 変異スクリーニング検査が可能 となっている (2月19日に N501Y 変異検出マニ ュアルが ver2.1 として改訂された)。N501Y 変異 スクリーニング検査陽性となったものを対象に 次世代シーケンサーを用いた全ゲノム解析を実 施し、3 つのうちどのタイプの N501Y 変異株か の確認が行われる。

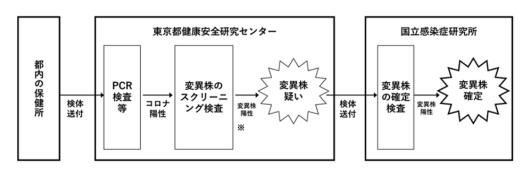
2021 年 2 月末現在、国内各地で VOC-202012/01 (501Y.V1) の感染者が報告されている。しかし、諸外国の様な N501Y 変異ウイルスの蔓延状態には至っていないと思われる。変異株蔓延阻止を目標に、SARS-CoV-2 陽性例に対する変異株スクリーニング検査を今後も継続的に実施していく必要がある。

<参考文献>

- ・変異株を追え!~新たな迅速判定法の開発~ https://note.com/tokyo_icdc/n/n82950294c56a?mag azine key=md3e14b3a61b6
- ・日経サイエンス、30-37、2021年4月号

表 N501Y変異株の特徴

名称	VOC202012/01 または 501Y.V1	501Y.V2	501Y.V3
【Pangolin 分類】	【B.1.1.7】	【B.1.351】	【P.1】
報告地	英国	南アフリカ共和国	ブラジル
			日本で発見
(公表日)	(12月19日)	(12月18日)	(1月10日)
スパイクの	69/70 欠損、	E484K,N501Y,K417N	E484K, N501Y, K417T
主な変異	N501Y		
感染性の変化	50%以上高まる	南アフリカの流行状況	不明
	可能性	から増加が示唆	
感染者の死亡リス	3割高まる可能性	不明	不明
クの変化			
6 -L		7 h m h h h h	77 - 177 - 10 H))
免疫への影響	不明	試験管内の実験で	E484K 変異は
		E484K 変異により免	B.1.351 と共通。ブラ
		疫回避が起こる可能性	ジルで再感染の事例あ
		が示されている。	り。



※リアルタイムPCRを使用12月28日~センター独自検査法1月21日付、N501Y変異検出マニュアル(感染研)2月19日付、N501Y変異検出マニュアルver2.1(感染研)

センター独自検査法で使用したプライマーブローブ: S_N501Y-F:GGCCGGTAGCACACCTTGTA、S_N50Y-R:GGTGCATGTAGAAGTTCAAAAGAAAG、S_N501a:FAM-AACCCACT(a/t)ATGGTGTTG-MGB

図 東京都における変異株スクリーニングの流れ

◆ 東京都微生物検査情報◆

2 0 2 1 年 7月 16日 編集・発行

東京都健康安全研究センター 〒169-0073

東京都新宿区百人町 3-24-1 TEL: 03-3363-3213 FAX: 03-5332-7365 S0000786@section.metro.tokyo.jp http://idsc.tokyo-eiken.go.jp/