

健康危機管理に関連する微生物の分子疫学解析と検査法の開発に関する研究

長島 真美^a, 藤原 卓士^b, 村田 ゆかり^c, 長谷川 乃映瑠^d, 有吉 司^d, 上原 さとみ^e, 小西 典子^e, 門間 千枝^f, 浅倉 弘幸^a, 林 真輝^g, 熊谷 遼太^a, 原田 幸子^a, 永野 美由紀^b, 山崎 貴子ⁱ, 河上 麻美代^e, 糟谷 文^e, 矢尾板 優^a, 黒木 絢士郎^a, 天野 有紗^a, 北村 有里恵^a, 磯貝 まや^a, 小杉 知宏^f, 加來 英美子^f, 鈴木 薫^e, 南須原 亮^c, 田部井 由紀子^e, 小川 麻萌ⁱ, 中村 三琴^f, 後藤 千恵^e, 村内 このみ^e, 古谷 実^e, 原田 順子^f, 川合 由華^e, 小池 浩二^e, 灘岡 陽子^f, 中村 貴恵子^f, 久保田 寛顕^d, 安中 めぐみ^d, 吉田 勲^d, 小林 甲斐^d, 水戸部 森歌^d, 奥野 ルミ^d, 内谷 友美^d, 田淵 優里^d, 森 功次^d, 高橋 由美^e, 村上 昂^e, 和田 紀乃^e, 河村 真保^e, 赤瀬 悟^a, 三関 詞久^e, 中里 彩乃^e, 小野 明日香^e, 浅山 睦子^e, 新井 麻里^e, 鈴木 愛^e, 岡田 若葉^a, 古田 菜摘^k, 齊木 大^e, 前田 雅子^e, 尾畑 浩魅^e, 西野 由香里^e, 井田 美樹^e, 宗村 佳子^e, 千葉 隆司^e, 新開 敬行^g, 横山 敬子^k, 三宅 啓文^e, 鈴木 淳^d, 貞升 健志^l

2021～2023年度に東京都健康安全研究センターで実施した重点研究「健康危機管理に関連する微生物の分子疫学解析と検査法の開発に関する研究」の概要について報告する。本研究では、新型コロナウイルス、多剤耐性菌、結核菌、真菌、腸管出血性大腸菌、芽胞菌やデータベースを対象とし、次世代シーケンサー、リアルタイムPCR、MALDI-TOF MS等の新しい手法を駆使して病原体を網羅的に解析した。さらに、実際の検査への導入を図るとともに、行政への貢献（東京iCDCへの報告を含む）や都民へ情報発信を行った。本研究で得られた膨大な成果は、関連学会や論文等で報告しており、今後、全国の地方衛生研究所等における食中毒や感染症等の健康危機対策への応用が可能と考えられる。

キーワード：健康危機管理、次世代シーケンサー、リアルタイムPCR、MALDI-TOF MS、データベース

はじめに

2019年末に中国武漢において発生が報告された新型コロナウイルス感染症（COVID-19）は世界規模で拡大した。COVID-19発生初期と比較して重症度が低下し、「強力な措置を行うほど国民の生命および健康に重大な影響を与えるおそれがある状態とは考えられない」との判断から、日本では、2023年5月8日に感染症法の位置づけが二類相当の全数把握疾患から五類定点把握疾患へかわり、患者数の全数把握ができなくなったが、2024年になっても流行を繰り返している。コロナ禍では、生活様式が大きくかわり、2020年は「密」を避ける生活が求められ、渡航制限がかかったことから食中毒事件や輸入感染症事例が

減少した。さらに、COVID-19流行後の数年間は、インフルエンザをはじめとした感染症の発生も抑えられていた。

しかし、行動制限が緩和され、人流が回復し、社会生活が以前の姿に戻ると、感染症や食中毒の流行も再びみられるようになってきたが、従来の流行期と異なる時期に流行が見られるなど、2019年以前とは様相を変えていた。

このような状況を踏まえ、本研究では7つの個別研究課題を立て、健康危機管理に関連する微生物の分子疫学解析と検査法の開発を目的に、都内で発生した感染症や食中毒等の健康危機管理事例において、患者検体や食品等から検出された微生物を、従来法だけでなく

-
- ^a 東京都健康安全研究センター微生物部ウイルス研究科
169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1
 - ^b 東京都健康安全研究センター食品化学部残留物質研究科
 - ^c 東京都健康安全研究センター企画調整部健康危機管理情報課
 - ^d 東京都健康安全研究センター微生物部病原細菌研究科
 - ^e 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
 - ^f 当時：東京都健康安全研究センター
 - ^g 東京都健康安全研究センター食品化学部食品添加物研究科
 - ^h 東京都健康安全研究センター精度管理室
 - ⁱ 東京都健康安全研究センター薬事環境科学部医薬品研究科
 - ^j 東京都南多摩保健所
206-0025 東京都多摩市永山 2-1-5
 - ^k 東京都芝浦食肉衛生検査所
108-0075 東京都港区港南 2-7-19
 - ^l 東京都健康安全研究センター微生物部

次世代シーケンサー (NGS) やMALDI-TOF MS等の新しい手法を駆使して網羅的に解析し、実態の把握を行うことを計画した。さらに、得られたデータを用いて、新規検査法や同定法の開発・迅速化、詳細な型別法の構築を試みた。また、研究で得られた成果の一部は、迅速に行政検査へ応用・活用することとした。

[個別研究課題名 (担当者)]

1. 都内の新型コロナウイルスについての分子遺伝学のおよび血清学的解析に関する研究 (藤原卓士)
2. 流行性ウイルス・細菌感染症の疫学解析と情報統合 (村田ゆかり)
3. 結核菌の型別および薬剤耐性検査に資する遺伝子検査法の検討 (長谷川乃映瑠)
4. 多剤耐性菌の原因となるプラスミドの分子疫学解析 (有吉 司)
5. 真菌の同定法および疫学解析に関する研究 (上原さとみ)
6. 三類感染症起因菌を対象とした検査法の構築および分子疫学解析手法に関する研究 (小西典子)
7. 芽胞形成菌を中心とした食中毒起因菌の疫学解析と検査法の確立および病原因子の解明に関する研究 (門間千枝)

個別研究課題の内容と成果

1. 都内の新型コロナウイルスについての分子遺伝学のおよび血清学的解析に関する研究

2019年に中国武漢において発生した新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) は新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) を原因とする。SARS-CoV-2は、1ヶ月に2塩基程度変異し、変異の場所によっては病原性や伝播性の増加やワクチンの有効性に影響をきたすため、迅速なモニタリングが重要である。また、COVID-19に罹患した場合、体内にSARS-CoV-2の抗体が作られる。都民のSARS-CoV-2の抗体価の測定は、抗体保有者の割合からの過去のCOVID-19の感染率の推測や今後発症する可能性などの情報が得られる可能性がある。これらの分子遺伝学のおよび血清学的な検査手法を用いて、都内のSARS-CoV-2を調査し、その特徴を明らかにすることを目的とした。

1) 変異株スクリーニング法の開発および次世代シーケンサー (NGS) による全ゲノム解析

リアルタイムPCR法を用いてSARS-CoV-2のアルファ、デルタ、オミクロン株 (BA.1, BA.2~G.K.1.1, H.K.3) に特徴的な変異を検出する変異株スクリーニング法を開発した。新たな変異株の出現にあわせ、逐次検出系を構築し変異株サーベイランスに用いることで、都内での流行株の動向をいち早く把握することに活用した。またウイルス量の多い臨床検体については、直接、次

世代シーケンサー (NGS) による全ゲノム解析を行い、得られた塩基配列についてはGlobal Initiative on Sharing Avian Influenza Data (GISAID) への登録を行った。民間検査会社への外部委託分を含め、148,107件の登録を行った (2024年9月27日現在)。

得られた情報については、東京都新型コロナウイルス感染症モニタリング会議への情報提供や東京都健康安全研究センターにHPに掲載し、行政への貢献や都民へ情報発信を行った。

2) 公的検査機関で採取された血清及びワクチン接種前後の血清における抗体価の測定

2019年12月から2023年11月にかけて都内の公的HIV検査機関で採取された血清検体を用いて、SARS-CoV-2抗体 (N抗体とS抗体) を対象とする検査を行った。SARS-CoV-2に感染することで増加するとされる抗N抗体は2019年12月分の測定では観察されなかったが、2020年1月から検出され始め、その後時間の経過とともに抗体陽性率が上昇した。ワクチン接種と深く関係していると考えられる抗S抗体の陽性率については、2021年5月以降ゆるやかに上昇し、11月に89.0%を示した後は高い値を維持していた。ただし、今回の測定に用いた検査試薬はプロトタイプ (武漢型) のSARS-CoV-2を対象としており、流行中のオミクロン株とは異なることを今後考慮する必要があると考えられる。

また20名の当センター職員から得られたSARS-CoV-2ワクチン接種前後の血清を対象にSARS-CoV-2抗体を測定したところ、抗N抗体は全て陰性であった。抗S抗体については、2回目のワクチン接種後から全員の抗体価の上昇が確認され、平均値で見ると2回目接種後は1回目の、3回目接種後は2回目の値を超えていた。

3) 下水中のSARS-CoV-2の測定

全自動遺伝子検査装置を用いた下水中のSARS-CoV-2遺伝子検出法を検討し、都内下水処理施設 (水再生センター) の流入下水を対象としてモニタリング調査を実施した。検討した方法は操作手順が簡便かつコンタミネーションのリスクが低く、多検体処理に活用できることから、下水を用いたモニタリング調査に有用と考えられた。

開発した検査法を用い、都内の水再生センター20か所 (区部13か所および多摩地域7か所) で採水された下水中のSARS-CoV-2遺伝子を測定した。その結果、都内の新規SARS-CoV-2感染者が一定数を越えたところではほぼ全ての処理場からの検体が陽性となり、感染者数の増加と下水中のSARS-CoV-2の陽性率の間には関連性が確認された。

4) 多項目同時検出試薬の有用性の検討

2020年1月から2021年8月の間、インフルエンザ様疾患としてインフルエンザ病原体定点医療機関から東京都健康安全センター (以下、当センター) に搬入された検体について、FilmArray呼吸器パネル2.1 (以下、呼

吸器パネル；バイオメリュー・ジャパン）を用いて測定を行い、その結果を当センターで実施している遺伝子検査の結果と比較した。検出されたウイルスに大きな違いは認められなかったが、当センターで遺伝子検査の対象としていないパラインフルエンザウイルスなどの病原体が呼吸器パネルの測定により検出された。

2022年4月から9月にセンターにインフルエンザ病原体定点医療機関から搬入されたインフルエンザ様疾患患者検体23件について、呼吸器パネルを用いて測定を行ったところ、インフルエンザ陰性でSARS-CoV-2陽性となった検体が3件（13.0%）あった。

また、2022年4月5日から5月26日の間に、WHOの5つの地域、33カ国から、小児における原因不明の急性肝炎の疑い例650例がWHOに報告され、アデノウイルス41型やSARS-CoV-2の関与が疑われた。そこで、小児における原因不明の急性肝炎として当センターに搬入された18事例について呼吸器パネルおよびFilmArray消化管パネル（バイオメリュー・ジャパン）により測定を行った。その結果、原因解明には至らなかったが、アデノウイルスが1事例、ライノ／エンテロウイルスが2事例、パラインフルエンザウイルス1が1事例から検出され、FilmArrayシステムを不明疾患のスクリーニング検査として用いる有用性が示唆された。

2023年11月に中国で小児の原因不明の肺炎が報告された。11月下旬に都内で中国渡航歴のある幼児が肺炎症状を示したため、積極的疫学調査としてセンターに3検体が搬入され、呼吸器パネルを用いて測定を行った。その結果、搬入された3検体全てからヒトコロナウイルスOC43が、うち2検体からライノウイルスが、残り1検体からインフルエンザウイルスB型が検出された。いずれの検体からもマイコプラズマやSARS-CoV-2は検出されなかった。

5) 簡易抗原検査試薬の検討

分離したSARS-CoV-2従来株と変異株計5株を用いて、市販されている簡易抗原検査試薬11種類の検出感度を比較した。製品により感度に10～100倍の差が見られたが、株の違いによる感度の差は認められなかった。

さらに、新型コロナウイルスとインフルエンザウイルスの同時検査キットを用いて、両ウイルスの検出感度と精度について比較を行った。両ウイルスの培養上清を希釈し、コピー数を揃えた試料液を用いてそれぞれのウイルスを検査した場合、インフルエンザウイルスの方が検出感度が高かった。次に一方のウイルスで濃度勾配を作成し、他方が逆の濃度勾配になるように混合した試料液で同様に検出試験を行ったところ、単一のウイルスで検査した場合に比べ新型コロナウイルスの検出感度が若干高くなる結果が得られた。

発 表 実 績

1) 熊谷遼太, 河上麻美代, 林 真輝, 他：都内下水中

の新型コロナウイルス検出状況（2020年度），東京健安研七 年 報, 72, 87–92, 2021.

- 2) 浅倉弘幸, 吉田 勲, 熊谷遼太, 他：東京都内で分離された新型コロナウイルスの次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析（2020年6月～2021年5月），東京健安研七 年 報, 72, 101–108, 2021.
- 3) 浅倉弘幸, 吉田 勲, 熊谷遼太, 他：東京都内で分離された新型コロナウイルスの次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析（2020年2月～2021年4月），令和3年度 全国公衆衛生獣医師協議会 調査研究発表会, 2021.
- 4) 浅倉弘幸, 吉田 勲, 熊谷遼太, 他：東京都内で分離された新型コロナウイルスの次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析（2020年2月～2021年6月），第17回東京都福祉保健医療学会, 2021.
- 5) 北村有里恵, 長島真美, 熊谷遼太, 他：インフルエンザ様疾患におけるFilmArray呼吸器パネル2.1の有用性の検討，第70回日本感染症学会 東日本地方学術集会, 2021.
- 6) 山崎貴子, 河上麻美代, 北村有里恵, 他：新型コロナウイルス簡易抗原検査試薬のウイルス分離株を用いた検討，第35回関東甲信静支部ウイルス研究部会, 2021.
- 7) 林 真輝, 山崎貴子, 長島真美, 他：都内の新型コロナウイルス施設内感染事例における次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析，第35回関東甲信静支部ウイルス研究部会, 2021.
- 8) 林 真輝, 山崎貴子, 長島真美, 他：都内の新型コロナウイルス施設内感染事例における次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析，地方衛生研究所全国協議会 NGS情報交換, 2021.
- 9) 林 真輝, 山崎貴子, 長島真美, 他：都内の新型コロナウイルス施設内感染事例における次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析，東京健安研七 年 報, 72, 73–79, 2021.
- 10) 三宅啓文, 黒木絢士郎, 磯貝まや, 他：東京都で検出された新型コロナウイルス変異株の分子系統樹解析，東京健安研七 年 報, 72, 93–99, 2021.
- 11) 山崎貴子, 河上麻美代, 北村有里恵, 他：新型コロナウイルス簡易抗原検査試薬のウイルス株を用いた検討，東京健安研七 年 報, 72, 109–114, 2021.
- 12) 長島真美, 熊谷遼太, 河上麻美代, 他：リアルタイムPCR法を用いたSARS-CoV-2変異検出法の検討，東京健安研七 年 報, 72, 65–71, 2021.
- 13) 長島真美：東京都健康安全研究センターにおける新型コロナウイルス変異株の検査対応，東京健安研七 年 報, 73, 15–24, 2022.
- 14) 三宅啓文, 黒木絢士郎, 天野有紗, 他：新型コロナウイルス変異株B.1.1.529系統（オミクロン株）における「懸念される変異株における監視下の系統」の

- 全ゲノム情報による解析, 東京健安研セ年報, **73**, 79–86, 2022.
- 15) 浅倉弘幸, 吉田 勲, 藤原卓士, 他: 東京都内で分離された新型コロナウイルス (オミクロン株) の次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析, 東京健安研セ年報, **73**, 51–57, 2022.
 - 16) 根岸あかね, 林 真輝, 山崎貴子, 他: 東京都における新型コロナウイルスの全ゲノム解析 (2022年1月～5月), 東京健安研セ年報, **73**, 115–121, 2022.
 - 17) 藤原卓士, 浅倉弘幸, 熊谷遼太, 他: 東京都におけるコロナウイルス感染症の変異株スクリーニング検査系の構築について, 第18回 東京都福祉保健医療学会, 2022.
 - 18) 黒木絢士郎, 三宅啓文, 根岸あかね, 他: 東京都内で検出された新型コロナウイルスのオミクロン株 BA.5系統の分子系統樹解析, 第36回関東甲信静支部ウイルス研究部会, 2022.
 - 19) 藤原卓士, 山崎貴子, 河上麻美代, 他: 当センター職員の血清を用いた新型コロナウイルスワクチン接種前後の抗体価の変動, 東京健安研セ年報, **73**, 95–99, 2022.
 - 20) 藤原卓士, 長島真美, 鈴木 淳, 他: 抗体価測定による都内の新型コロナウイルスの血清学的解析, 第96回日本感染症学会総会・学術講演会, 2022.
 - 21) 熊谷遼太, 林 志直, 森 功次, 他: 東京都内における流入下水中の新型コロナウイルスの検出状況 (2020–2022年), 第63回日本臨床ウイルス学会, 2022.
 - 22) 北村有里恵, 熊谷遼太, 河上麻美代, 他: インフルエンザ様疾患における核酸多項目同時検出試薬の有用性の検討, 東京健安研セ年報, **73**, 65–69, 2022.
 - 23) 藤原卓士, 浅倉弘幸, 永野美由紀, 他: 東京都における小児肝炎疑い事例の検査結果について (2022年4–7月), 東京健安研セ年報, **73**, 87–93, 2022.
 - 24) 伊藤 仁, 河上麻美代, 北村有里恵, 他: 新型コロナウイルス抗原定性検査キットのウイルス分離株を用いた比較検討, 第36回関東甲信静支部ウイルス研究部会, 2022.
 - 25) 浅倉弘幸, 吉田 勲, 藤原卓士, 他: 東京都内で分離された新型コロナウイルス (オミクロン株) の次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析 (2022年9月～2023年3月), 東京都健安研セ年報, **74**, 89–97, 2023.
 - 26) 熊谷遼太, 岡田若葉, 糟谷 文, 他: 都内下水中の新型コロナウイルスモニタリング調査 (2021年度～2022年度), 東京健安研セ年報, **74**, 75–79, 2023.
 - 27) 根岸あかね, 三宅啓文, 原田幸子, 他: 東京都における新型コロナウイルスの全ゲノム解析 (2022年6月～2023年5月), 東京健安研セ年報, **74**, 99–106, 2023.
 - 28) 黒木絢士郎, 横田翔太, 磯貝まや, 他: 新型コロナウイルス感染症の持続感染事例におけるSARS-CoV-2 遺伝子解析, 東京健安研セ年報, **74**, 107–111, 2023.
 - 29) 黒木絢士郎, 浅倉弘幸, 長島真美, 他: 新型コロナウイルスBA.5系統とBA.2系統の混合感染疑い事例の全ゲノム解析, 第27回日本ワクチン学会・第64回日本臨床ウイルス学会合同学術集会, 2023.
 - 30) 北村有里恵, 黒木絢士郎, 熊谷遼太, 他: 新型コロナウイルス陽性検体における核酸多項目同時検出試薬を用いた網羅的な検索, 東京健安研セ年報, **74**, 901–905, 2023.
 - 31) 熊谷遼太, 糟谷 文, 天野有紗, 他: 東京都内における流入下水中の新型コロナウイルスモニタリング調査 (2022年), 第27回日本ワクチン学会・第64回日本臨床ウイルス学会合同学術集会, 2023.
 - 32) 伊藤 仁, 河上麻美代, 北村有里恵, 他: 新型コロナウイルスの分離株を用いた抗原定性検査キットと抗原定量検査の比較検討, 第72回日本医学検査学会, 2023.

2. 流行性ウイルス・細菌感染症の疫学解析と情報統合

麻しん, 風しん, 新型コロナウイルス感染症, 溶血性連鎖球菌感染症など, 流行性のウイルス・細菌感染症の疫学的特徴を明らかにするためには, 発生場所, 伝播経路, 罹患者の特性といった疫学的パラメーターに, 微生物特異的な情報 (分子疫学的情報や血清型, 病原因子型など) を加えて解析し, より精密な結果を得ることが求められる. 一方で, 得られた結果を迅速に発信し, 患者発生抑制のための施策につなげていくことも重要である.

そこで, 従来構築されてきた疫学情報のデータベースに, 微生物特異的な情報など, 他の情報ソースを結び付け, 統合的な感染症疫学情報データベースを構築する方策を追究することを目的とした.

1) 対象とするデータ取り扱いの確認, 問題点の整理

発生届が提出された後の三類～五類感染症については, 保健所が検体・菌株を確保し, 東京都健康安全研究センターで病原体の解析が行われている. 病原体の解析結果は, 保健所および東京都感染症情報センターに報告され, 一部の疾患については, 保健所が検査結果を国のサーベイランスシステムである National Epidemiological Surveillance of Infectious Disease (NESID) へ登録している. NESIDへの入力があるもの, 新型コロナウイルス感染症が流行し保健所業務が逼迫した時期には結果の入力までに時間を要していた. . . また, 病原体の解析結果の入力に関する取り決めがなされていない疾患については, NESIDへ入力するかどうかは保健所に任されている. そのため, 病原体情報を収集する際, NESIDから情報が得られない場合には, 結果報告書に立ち返り情報を得ることになる.

これらの点を改善するため, 積極的疫学調査依頼票およびその検査結果を, 依頼票とほぼ同じ書式で入力できるデータベースを作成し, 容易に検査結果が検索できる

システムを構築することとした。

2) 新規データベースの構築および検証

データベースの管理ソフトとしては様々あるが、Accessが現在のシステム環境下で用いやすいことから、これを用いてデータベースを作成することとした。まずは、1疾患でデータベースを作成し検証することとし、積極的疫学調査票の書式に準じて、バンコマイシン耐性腸球菌感染症（VRE）についてのデータベースを作成、操作性を確認した。さらに、カルバペネム耐性腸内細菌目細菌感染症、劇症型溶血性レンサ球菌感染症、侵襲性インフルエンザ菌感染症、侵襲性肺炎球菌感染症についてのデータベースをAccessファイルで作成した。

データベースの特徴としては、トップメニューから5疾患の入力画面に飛べるように作成した。入力画面は入力者の労力が極力省かれるように積極的疫学調査票及びその結果判定の形式と同じものにした。また、Accessファイルを用いることでExcelファイルとの互換性があり、その後の分析を行う場合、CSV形式で扱うことが可能である。

データベースのバックアップ方法についても検討を行った。データの消失を防ぐため、データ入力後ファイルを閉じるとバックアップデータが自動保存される仕組みとした。その後、容量節約のため1週間経過したデータについては自動的に削除されるが、週の最初に入力したデータについては削除されず1週ごとのデータが週保存用のフォルダに蓄積される仕組みとした。また、データの入力についても担当内で行えるようマニュアルを整備し、2021年1月から2023年12月までの結果について入力を行った。

本データベースの成果として、今までは紙ベースで結果をファイルにまとめて保管していたため、過去の結果を検索するのに時間を要していたが、データベースに保管することによって容易に検索することができるようになった。また、今後の検査結果の解析を行うにあたり、性別や届出保健所毎のデータの取り出しも容易になった。Accessファイルを用いたことで誰でも簡便に使いやすい入力フォームを作成することができた。また、デジタル化したことにより、試験的ではあるが、微生物部、企画調整部健康危機管理情報課事業推進担当ともデータベースを迅速に共有することができた。

3) 梅毒集計ツールの作成

2021年からの梅毒届出数急増を受け、2022年9月より東京都では梅毒の発生届に独自項目を追加した。独自項目であるためNESIDシステム上に入力欄がなく、東京都でひな形を作成し、備考欄に文字入力しているが、文字列データであるため、集計が非常に煩雑であるという問題点がある。NESIDからダウンロードしたCSVファイルから、上記問題点を解決し、簡便に集計できるExcelファイルツールを作成した。

発表実績

- 1) 村田ゆかり, 鈴木江利子, 星美代子, 他: 東京都における梅毒の発生状況 (2019年~2021年), 第81回公衆衛生学会総会, 2022.
- 2) Murata, Y., Yoshida, A., Suzuki, E., *et al.*: Epidemiology of Syphilis in Tokyo from 2019 to 2022: a Descriptive Epidemiological Study. *Jpn J Infect Dis.*, 77, 274–280, 2024.

3. 結核菌の型別および薬剤耐性検査に資する遺伝子検査法の検討

近年、結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) の疫学解析において次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析の活用が注目されている。東京都健康安全研究センターでは結核菌の積極的疫学調査事業として24BeijingのVNTRを実施しているが、VNTRでは区別できない事例も存在している。型別法として全ゲノムデータを利用するcgMLST解析はVNTRよりも分解能が高く、疫学調査で把握できなかった感染経路や地域的な流行の推定が期待される。また、薬剤耐性遺伝子変異の検出は、一か月ほどを要し発育を目視で判定する培養法よりも、迅速に結果が得られ、判定者による結果のぶれがない。

そこで、2021年4月から2023年5月までに当センターに搬入された結核菌254株を供試し、現在実施しているVNTRによる型別と培養による薬剤感受性試験の結果を、全ゲノム解析から得たデータと比較し、日常検査や調査における有用性を検討することを目的とした。

1) VNTRとcgMLST解析との型別結果比較

VNTRとRidom SeqSphere+を用いたcgMLST解析によるクラスター形成について比較した。254株のVNTRは196パターンに分かれ、うち87株がVNTR24領域一致の29クラスターを形成した (クラスターサイズ2~13)。疫学情報の分類は、疫学的リンクあり (場所と時間の共有あり) が46株、疫学的リンク可能性あり (場所の共有あり) が7株、疫学的リンク不明が34株となった。cgMLSTでは5アレル以内を疫学的リンクが示唆されるクラスターとしたところ、83株が28クラスターを形成した (クラスターサイズ2~8)。疫学情報の分類は、疫学的リンクありが58株、疫学的リンク可能性ありが7株、疫学的リンク不明が18株となった。cgMLSTではVNTRで1~2領域違いでも疫学的リンクありのクラスターを形成した一方、VNTR一致であってもクラスターを形成しない株もあったため、疫学的リンクありの株が増え、疫学的リンク不明の株が減った。このことからcgMLST解析によって、より正確に疫学的リンクを示唆するクラスターを検出できたと考えられる。

2) クラスターと疫学情報の突合

cgMLSTクラスターについて各患者の疫学情報を突合した。疫学的リンクありの患者間では、同居家族、施設内集団発生、職場同僚、同一人物など明確な関連を確認で

きた。疫学的リンク可能性ありの患者間では、同一のまんが喫茶やカプセルホテルの利用歴があるものの同時期の利用であるかは不明であった。また、疫学的リンク不明であっても一部の患者間では、同一施設か不明だがまんが喫茶や日本語学校などの共通する施設の利用歴が確認できた他、居住地・勤務地が近隣であるなど地域的な感染を示唆する情報も確認できた。このように患者への聞き取り調査では見出しにくい軽微な接触や顔見知り以外からの感染もcgMLSTクラスターから探知できる可能性がある。現在は保健所が患者への聞き取り調査の上、疫学的関連を疑った患者の株についてVNTRや全ゲノム解析の比較を当センターに依頼するフローとなっているが、関連を疑っていない株の中からも全ゲノム解析から得られたクラスター情報を保健所に提供することで、疫学調査や感染対策に一層役立てられると考える。

3) TB Profilerによる薬剤耐性関連遺伝子変異の検出

リファンピシン (RFP), イソニアジド (INH), エタンブトール (EB), ピラジナミド (PZA), ストレプトマイシン (SM), レボフロキサシン (LVFX), エチオナミド (TH) の7剤について培養による薬剤感受性試験と薬剤耐性関連遺伝子変異の検出の結果を比較した。培養による薬剤感受性試験の結果はRFP耐性が18株, INH0.2耐性が54株, EB耐性が11株, PZA耐性が7株, SM耐性が59株, LVFX耐性が14株, TH耐性が9株, 全剤感受性が148株, 検査不能が2株, 未検査が7株であった。なおMIC中間判定も耐性に含めた。TB Profiler (ver4.4.0) で検出された変異から、変異検出の感度・特異度 (%) を算出したところ、全体で87.7, 97.8となった。薬剤ごとの感度・特異度 (%) はそれぞれ, RFP 100, 100, INH0.2 96.3, 99.5, EB 81.8, 100, PZA 57.1, 97.9, SM 96.6, 95.7, LVFX 28.6, 100, TH 77.8, 91.9となった。RFPは培養と変異検出の結果が一致し、耐性18株すべてでrpoBに変異が検出された。うちRFP耐性株の95%の変異を持つRRDR外の変異Val170Pheが1株あった。INHについてはkatGの変異を持つ株はMIC (μg/ml) 2.0- > 32, fabG1-inhAの変異を持つ株はMIC 0.5-1.0に分布する傾向があった。これはINHの濃度が低い場合にはInhA産生の増加が主なメカニズムであるのに対し、INHの濃度が高い場合にはKatG酵素の変化が利用されるという報告と一致する。また、耐性株・感受性株どちらからもkatG上に未知の変異や欠損を持つ株が見つかった。EB耐性9株の変異はすべてembBにあったが、耐性株でも変異のないものが2株あった。PZAについては耐性株4株, 感受性株5株でpncAの変異や欠損が検出された。いずれもPZA耐性と関連がある変異であったため、培養による結果の判定が誤っている可能性がある。PZAの薬剤感受性試験は偽陽性が多い問題が指摘されており、ピラジナミダーゼ試験の利用が提案されている。SMについてはrpsLに変異を持つ株が56株あり、そのうちLys43ArgおよびLys88Argの51株はすべてMICが>128であったが、Lys88Glnの5株は感受性判定のMIC4.0

を示した。この変異はWHOの変異カタログではAssoc w R - Interimに分類されている。LVFXについては中間判定となるMIC1.0の株で変異が検出されず感度が低くなった。高いMICを示した4株はgyrAに変異があったが、変異がなかった10株についてはgyrA以外のMICをやや上昇させるような耐性機構が関与している可能性がある。THはINHと途中から作用機序が重なっており、fabG1-inhAの変異が検出されたが、感受性株も19株含まれていた。今回THの薬剤感受性に使用した検査キットはビットスペクトルSR (20 μg/ml) であるため、今後微量液体希釈法によるMICの判定も検討したい。薬剤耐性関連遺伝子変異はすべてが判明しているわけではないので、表現型との完全な一致は難しい。培養による結果と合わせて判断する必要があるが、遺伝子変異の検出結果は迅速に得られるため、参考として活用できると考える。

4) サンガーシーケンスによる薬剤耐性関連遺伝子変異の検出

変異の検出頻度の高かった領域についてサンガーシーケンスによる変異検出の体制を整えた。RFP耐性はrpoB, INH耐性はkatG, EB耐性はembB, PZA耐性はpncA, SM耐性はrpsLを対象とした。TB Profilerで検出された変異のうちサンガーシーケンスで検出できた変異は、rpoBが5/5種類, katGが3/9種類 (欠損4種類を含む), embBが4/5種類, pncAが6/8種類, rpsLが3/3種類であった。rpoB, katG, embBは領域が長いため、変異の多い部分を増幅領域としたが、katGについては大きな欠損を持つ耐性株もあり、サンガーシーケンスでは検出できない変異が多くなった。embB, pncAについては増幅領域を拡大したプライマーの設計を検討中である。また、対象領域中には耐性と関係のない系統特異的な変異も含まれており、判定時に注意する必要がある。

発表実績

- 1) 長谷川乃映瑠, 安中めぐみ, 吉田 勲, 他: 国内飼育下のアジアゾウからのヒト型結核菌の分離, 病原微生物検出情報, 42, 228-230, 2021.
- 2) 長谷川乃映瑠, 安中めぐみ, 吉田 勲, 他: カプセルホテルにおける結核集団感染事例の全ゲノム解析, 第34回日本臨床微生物学会総会・学術集会, 2023.

4. 多剤耐性菌の原因となるプラスミドの分子疫学解析

病原菌の薬剤耐性化は臨床で大きな問題であり、特に、腸内細菌科細菌をはじめとするグラム陰性桿菌では多剤耐性化が顕著である。病原菌の薬剤耐性機序は様々であるが、特に、プラスミドを介した薬剤耐性機序は、菌種を超えて広く伝播する可能性がある。実際に、様々な菌種から同一の薬剤耐性プラスミドが検出され、院内感染の一因となった事例も報告されている。このような背景から、薬剤耐性プラスミドの分子疫学解析が、薬剤耐性 (AMR) 対策の一環として必要であると考えられる。

本研究では、当センターに搬入された多剤耐性菌から薬剤耐性プラスミドを分離し、薬剤耐性遺伝子の確認だけでなく薬剤耐性プラスミド自体の遺伝子型、表現型を含む解析を行い、臨床問題になり得る薬剤耐性プラスミドの実態把握および分子疫学的解析を目的とした。

1) NDM-1陽性株の全ゲノム解析

NDM-1陽性株22株について全ゲノム解析を行い、20株の配列データを得た。配列データのプラスミド解析したところ、20株全てが bla_{NDM-1} 搭載IncA/C2プラスミドを保有していた。 bla_{NDM-1} 搭載IncA/C2プラスミド比較解析の結果、保有していたプラスミドの塩基数は170から300kbpであり、遺伝子配列は大きく4つのグループに分かれた。今回解析した22株は、院内感染疑い事例の関連株であるため、同じ施設に同じ期間で多発的に異なる bla_{NDM-1} 搭載IncA/C2プラスミドが広がっていた可能性が示唆された。

NDM-1陽性の20株のうち患者由来株と環境由来株で、検出が稀な*Phytobacter diazotrophicus*が検出された。*P. diazotrophicus*は腸内細菌目細菌の一種で、当初は植物の成長を促進するグラム陰性菌として同定された。近年、この菌種が臨床環境におけるヒトの日和見感染や院内感染に関連していることが報告されている。*P. diazotrophicus*の全ゲノム解析の結果、 bla_{NDM-1} 搭載IncA/C2プラスミドのキャリアとして機能し、 bla_{NDM-1} の拡散に関与している可能性を明らかにした。

2) NDM-5陽性株の全ゲノム解析

NDM-5陽性菌17株について全ゲノム解析を行い、全ての株の配列データを得た。17株の内訳は、*Escherichia coli*が11株、*Klebsiella pneumoniae*が4株、*Citrobacter freundii*と*Citrobacter* sp.が各1株であった。全ゲノム解析の結果、17株全てが約46kbの bla_{NDM-5} 搭載IncX3プラスミドを保有していた。NDM-1とは異なり、各プラスミド間でトランスポゾンの挿入、欠損は見られたものの大部分の配列が類似しており、NDM-5は同一タイプの bla_{NDM-5} 搭載IncX3プラスミドが広がっている可能性が示唆された。

一方で、 bla_{NDM-5} 搭載IncX3プラスミドの塩基配列（遺伝子型）が非常に類似しているのにも関わらず、薬剤感受性や伝達効率（表現型）が他と異なるものがあった。これらに対し、遺伝子型、表現型の同時解析を行う新規プロトコルの開発と活用を通じ、 bla_{NDM-5} 搭載IncX3プラスミドの経時的変化や宿主菌へ及ぼす影響解析を試みた。

方法として、解析済みの bla_{NDM-5} 搭載IncX3プラスミドを大腸菌DH5 α に接合伝達した株（Day0）をメロペネム（MEPM）（1 μ g/mL）添加 LB培地にて30日間継代培養し、継代の都度、薬剤感受性試験とNGSを用いたプラスミド解析を実施した。その結果、継代 14日目（Day14）までは、Day0と比較し、薬剤感受性およびプラスミド塩基配列に変化はなかった。Day16から23にかけて、MEPMに対する薬剤感受性が1管上昇する株もあったが、プラスミド塩基配列に変化はなかった。Day26から30にかけ

て、プラスミド塩基配列内に1~2SNPが生じ、宿主菌のMEPMに対する感受性も1~2管上昇した。プラスミド内の変異箇所は、カルバペネム系抗菌薬耐性に寄与する bla_{NDM-5} のすぐ下流のIS5遺伝子であり、この変異が宿主菌の薬剤感受性に影響を与えた可能性が示唆された。

3) NDM-16b陽性株の全ゲノム解析

2018~2020年度までの課題研究にて報告したNDM-5-likeが、NCBIへの相談を経てNDM-16bという新規名称が付与された。今回分離したNDM-16b陽性株は $bla_{NDM-16b}$ 搭載IncX3プラスミドを保有していた。 $bla_{NDM-16b}$ 搭載IncX3プラスミドは、接合伝達能を有し β -ラクタム系抗菌薬への高度耐性を惹起する点や塩基配列から既報の bla_{NDM} 搭載IncX3プラスミドと高い類似性を有していることが分かった。 $bla_{NDM-16b}$ は、 bla_{NDM-5} の一塩基置換体であるため、アジアを中心に広く伝播している bla_{NDM-5} 搭載IncX3プラスミド内の bla_{NDM-5} が点変異し、 $bla_{NDM-16b}$ 搭載IncX3プラスミドが出現したことが強く示唆された。

また、NDM-16b陽性株TA8571はsequence type746の大腸菌であり、4本のプラスミドを保有していた。保有していたプラスミドの1本であるpTMTA8571-1は、46,161bpであり、供与菌(TA8571)1コロニー当たり約 2.0×10^{-5} の割合で受容菌に接合伝達され、接合伝達体はアズトレオナムを除く β -ラクタム系抗菌薬に対する高度耐性を惹起した。pTMTA8571-1に搭載されていた $bla_{NDM-16b}$ は、水平伝達に関わる遺伝子であるIS26、trpF、ISAba125などで構成されたTn125関連領域にコードされており、この構造は既報の bla_{NDM} 搭載IncX3プラスミドと類似していた。そのため、141本の bla_{NDM} 搭載IncX3プラスミドの塩基配列をGenBankや先行論文から引用し、pTMTA8571-1を加え比較解析を行った。その結果、本研究で解析した142本の bla_{NDM} 搭載IncX3プラスミドの共有遺伝子は、搭載されている bla_{NDM} のバリエーションに関係なくほとんど変異していないが、 bla_{NDM} には点変異が生じている可能性が示唆された。そういった背景から、アジアを中心に広く拡散している bla_{NDM-5} 搭載IncX3プラスミドの bla_{NDM-5} 内の698番目のシトシンがチミンに変異し $bla_{NDM-16b}$ 搭載IncX3プラスミド（pTMTA8571-1）は出現したものと考えられた。

解析対象の bla_{NDM} 搭載IncX3プラスミドは、アジアを中心に南アメリカを除く世界中で報告されており、プラスミドを保有する菌種は大腸菌や*Klebsiella pneumoniae*をはじめとする様々な腸内細菌科細菌であった。また、これらの菌株は、人からだけでなく動物や環境からも分離されている。そのため、今後世界中のあらゆる宿主で、様々なバリエーションの bla_{NDM} 搭載IncX3プラスミドが検出される可能性が示唆された。

発表実績

- 1) 有吉 司, 青木弘太郎, 板垣智之, 他: $bla_{NDM-16b}$ 搭載IncX3プラスミドの分子系統解析, 第33回日本臨床微生物学会総会・学術集会, 2022.

- 2) Ariyoshi, T., Aoki, K., Kubota, H., *et al.*: Molecular characterization of *bla*_{NDM}-carrying IncX3 plasmids: *bla*_{NDM-166} likely emerged from a mutation of *bla*_{NDM-5} on IncX3 plasmid. *Microbiol Spectr.*, 10:e0144922. doi:10.1128/spectrum.01449-22. (2024年9月27日現在)
- 3) Kubota, H., Nakayama, T., Ariyoshi, T., *et al.*: Emergence of *Phytobacter diazotrophicus* Carrying an IncA/C2 Plasmid Harboring *bla*_{NDM-1} in Tokyo, Japan, *mSphere*. 2023 Jul 14:e0014723. (2024年9月27日現在)
- 4) 有吉 司, 内谷友美, 奥野ルミ, 他: 抗菌薬存在下における bla_{NDM-5} 搭載IncX3プラスミドの経時的変化解析, (第35回日本臨床微生物学会総会・学術集会, 2024.

5. 真菌の同定法および疫学解析に関する研究

2014年9月から播種性クリプトコックス症が五類感染症に分類されたことに伴い、東京都では発生動向調査及び菌株の収集を実施している。日本における播種性クリプトコックス症の原因菌はほとんどが *Cryptococcus neoformans* であり、その大半は血清型A型、遺伝子型VN I, multi locus sequence typing (MLST) 5であることが知られている。しかし、血清型別用のキットは販売中止となっており、菌種同定以外に有益な疫学データの提供が困難な状況である。そこで、新たに疫学解析を行うための検査法を検討した。

一方、微生物迅速同定装置として普及しているMALDI-TOF MSは、細菌や酵母の同定は多くの報告があるが糸状菌については少ない。そこで当センターの保存株を用いて糸状菌の前処理法及び菌種同定率について検討した。また、MALDI-TOF MSライブラリーの充実を目的とし、株の登録を行った。

1) *Cryptococcus neoformans/gattii*の疫学解析と薬剤感受性試験

積極的疫学調査により当センターに収集された播種性クリプトコックス症の菌株67株について菌種同定及び血清型、交配型の各試験とMLST及び遺伝子型、並びに薬剤感受性試験を行った。その結果、67株中66株が *C. neoformans* であり、1株が *C. gattii* であった。 *C. neoformans* の血清型及び交配型はすべてA型及びMAT α , *C. gattii* の血清型及び交配型はB型及びMAT α であった。MLSTはST5が61株、ST2とST31が2株、ST32とST20が1株ずつであった。遺伝子型は *C. neoformans* がすべてVN I, *C. gattii* はVG IIaであった。 *C. neoformans* の結果はこれまでの国内及びアジア地域の報告と同様の傾向であり、特定の型に偏っていることから詳細な疫学解析を行うためにはMLST法以外の解析法が必要であると考えられた。 *C. gattii* VG IIaは北米で優占する型であるが、患者にカナダへの渡航歴があったことから、海外由来の可能性が高いと考えられた。

薬剤感受性試験は微量液体希釈法によりアムホテリシ

ンB, フルシトシン, フルコナゾール, イトラコナゾール, ポリコナゾールの5薬剤について行った。アムホテリシンBとフルコナゾール, イトラコナゾール, ポリコナゾールはすべて感受性であったが、フルシトシンは2株が低感受性であった。

2) *Cryptococcus neoformans*の疫学解析

担子菌系酵母である *C. neoformans* は菌体の外側に硬い莢膜を有し、細菌と同様の手法ではDNAを抽出することができなかったため、効率的なDNA抽出方法を検討した。物理的破砕法1つと細胞壁溶解法3つについて検討した結果、物理的破砕法及び市販のDNA抽出キットに細胞壁溶解酵素としてLiticase又はZymolaseを組み合わせた方法では、DNA量不足であった。異なる細胞壁溶解酵素Westaseを用いて、三角フラスコによる大量振盪培養とフェノール/クロロホルム抽出を組み合わせることにより最終的にNGS解析に必要なDNA収量を確保することができた。この前処理法により6株 (ST2:1株, ST31:1株, ST32:1株, ST5:3株) の *C. neoformans* についてNGSでSNP解析を行った結果、MLST型ごとにクラスターを形成した。また、ST5に特異的なSNPが存在する遺伝子のうち、タンパク質をコードしている非同義置換であったものは5領域であった。このうち3領域がHypothetical Proteinを、1領域がserine/threonine-protein kinase TEL1を、1領域がdynein heavy chain 1をコードしていた。

C. neoformans の代表株15株 (MLST:ST5) を用いてNGSでSNV解析を行った結果、都内分離株の92%を占めたST5は3つのSubtypeに分かれた。Subtypingを行うためのSNV検出プライマーを設計し、NGS未実施のST5の25株を加えた合計40株でAllele Specific PCRにより判定した結果、subtype1が15株、subtype2が8株、subtype3が17株であった。Subtypeと患者の疫学情報を解析した結果、年齢、症状及び基礎疾患との関連性は見られなかったが、届出病院の地域 (多摩地区及び23区部) と性別にやや偏りが見られた。

3) MALDI-TOF MSによる糸状菌同定のための前処理法の検討とライブラリー登録

安定性及び再現性が高く、手技が簡便な糸状菌の前処理法を調べることを目的として、①液体培養法 (メーカー標準法) にビーズと凍結を加味した方法と、②発育した平板から菌体を直接かきとるNITE法及び③平板からのかきとりにビーズを添加したアメリカ国立衛生研究所 (NIH) 法の改変法の3つについて検討した。その結果、①は高いスコア値を示したが、回転培養や凍結により手技が煩雑となるほか、低分子量側のバックグラウンドが高くなる傾向があった。②と③は抽出法が異なるため、市販ライブラリーでは同定できないが、ピーク数が①よりも多く、低分子量側のバックグラウンドも低い傾向であった。②よりも抽出時のエタノール濃度が高く、ビーズ添加した③の方が、スコア値が高くなった。以上の結果から、最も手技が簡便で再現性が高かったのは③NIH

改変法であった。

動物由来感染症事業への適用を目的として、皮膚糸状菌6菌種 (*Trichosporon coremiiforme*, *Trichosporon asahii*, *Trichophyton interdigitale*, *Trichophyton rubrum*, *Microsporium gypseum*, *Microsporium canis*) 18株で検討を行なった。塩基配列解析により菌種同定した株を液体培養法で前処理を行い、3回測定して市販ライブラリーで菌種とスコア値を比較した。その結果、液体培養法では*T. interdigitale*以外の5菌種は高いスコア値で正確に同定されたが、*T. interdigitale*は8株全て正確に同定できなかった。そこで、NIH改変法により*Trichophyton mentagrophytes*, *T. rubrum*, *T. interdigitale*, *M. gypseum*, *M. canis*の5菌種でライブラリーを作成し、*T. interdigitale*と*M. canis*の同定を行ったところ、スコア平均値が1.79–2.02で比較的高いスコア値で正確に同定可能であった。しかし、*M. canis*では同定不能であった。この理由としては、*M. canis*が寒天平板上で培地に張り付くように成長し、かさとりが困難であったためであると考えられた。以上の結果から、同定精度向上のためにはNIH改変法と液体培養法を併用し、菌種により使い分けた方が良いことが判明した。この結果をもとに、動物由来感染症事業で分離された皮膚糸状菌の菌種同定にMALDI-TOF MSを適用した。

NIH改変法により*Penicillium* subgenus *Penicillium*のライブラリーを作成し13菌種 (25株) の菌種同定を行った。その結果、遺伝子レベルでの同定が必要な類縁菌を除いてMALDI-TOF MSで正確な同定が可能であった。類縁菌はβチューブリン遺伝子のイントロン領域やエクソン領域に非同義のSNVを保有していたが、タンパク質に差異が現れない変異は、MALDI-TOF MSでは識別が難しい場合があることが判明した。

NIH改変法による糸状菌の前処理法をMALDI-TOF MS微生物同定コンソーシアム内で標準化し、施設間検証を実施した結果、他施設においても高い精度で*Penicillium*属菌の正確な同定が可能であった。

4) MALDI-TOF MSのライブラリー拡充

当センターにMALDI-TOF MSが導入された2017年以降、MALDI-MSコンソーシアムから提供された株及び文部科学省NBRPプロジェクトにより公開された約1,700株を含めて導入から6年間でインハウスライブラリーに3,292株を登録した。

また、近年、国内初の死亡例があった*Candida auris*の検査体制を整備するとともに同定精度の向上に努めた。さらに、MALDI-TOF MSの活用により、国内初のF型ボツリヌス毒素を有する*Clostridium baratii*食中毒事例や2023年11月に発生したマフィンによる大規模食品苦情事例の原因菌種の迅速同定に貢献した。

発 表 実 績

- 1) 上原さとみ, 高橋由美, 千葉隆司, 他: MALDI-TOF MSを用いた*Aspergillus flavus*類縁菌の同定, 第42回日

本食品微生物学会学術総会, 2021.

- 2) 上原さとみ: 東京都健康安全研究センターにおけるMALDI-MSの活用, MALDI-MS食品微生物研究会第2回シンポジウム, 2022.
- 3) 上原さとみ, 高橋由美, 和田紀乃, 他: MALDI-TOF MS同定用の糸状菌前処理方法の検討, 第43回日本食品微生物学会学術総会, 2022.
- 4) 上原さとみ: ヒスタミン産生菌の迅速検査法, 東京都微生物検査情報, 43(5), 1–3, 2022.
- 5) Uehara, S., Takahashi, Y., Iwakoshi, K., et al.: Isolation of azole-resistant *Aspergillus* spp. from food products, Med Mycol., 62:myae026, 2024. doi: 10.1093/mmy/myae026 (2024年9月27日現在)
- 6) 上原さとみ: MALDI-TOF MSによる糸状菌の同定手法の検討, MALDI-TOF MS微生物同定コンソーシアム 第1回シンポジウム, 2023年.

6. 三類感染症起因菌を対象とした検査法の構築および分子疫学解析手法に関する研究

三類感染症起因菌の中でも分離数が多い腸管出血性大腸菌 (EHEC) および赤痢菌を対象に検査法及び疫学解析手法について検討を行った。

現在、EHECに対するDNA分析法として、「パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE)」による解析法が多く用いられている。しかし、電気泳動装置の販売が終了したことから、PFGEに代わる新たな解析法の標準化が求められている。そこで、原因血清群として多く分離されるO103, O121, O145を対象に、PFGE法以外の分子疫学解析手法が有効であるかを検討した。また近年、市販血清に凝集しないEHECが増加していることから、その実態を明らかにする目的で分離菌株の特徴を調べ、得られた結果を元に糞便から効率的に検出する方法を検討し、検査法を構築した。

細菌性赤痢の多くは海外感染であるが、国内感染や食品媒介が疑われる事例も発生する。分子疫学解析としてPFGE法が用いられているが、EHECと比較して多様性に乏しく比較が困難な事例も認められる。そこでPCR法で実施できるClade解析法による赤痢菌分類法の検討や分子疫学解析マーカーの有用性を検討した。

1) EHEC血清型別不能 (OUT) 株の O genotypeing および病原因子保有状況

2018年から2021年の4年間に東京都で分離され、当センターで収集した腸管出血性大腸菌は1,404株であった。そのうち市販の血清に凝集しない血清型別不能 (OUT) 株は95株 (6.8%) であった。OUT株の年次別分離率は、2018年 3.0%, 2019年 6.8%, 2020年 9.2%, 2021年 10.2%と、年々増加傾向にある。EHECは血清型によって菌の性状 (CTに対する感受性, 発育温度, 糖分解性など) が異なることから、OUT株についてもその特性を明らかにし、実際の糞便や食品からの検出法を早期に確立してい

く必要のあることが示唆された。

2018～2020年に分離されたO157 730株のうち下痢、血便等の有症症状が認められたヒトの割合は69.3%、無症状者 14.4%、不明 16.3%であった。一方、OUT株検出者では、有症者が20.0%、無症状者が43.1%、不明36.9%であった。

EHECの主要な病原因子の1つである*eae*遺伝子保有率はO157やO26ではほぼ100%であると報告されている。一方、OUT株では、供試した65株中23株（35.4%）であり、O157と比較して保有率は低かった。また新しい定着因子の1つといわれている*saa*遺伝子保有株は26株（40.0%）であった。*saa*遺伝子がヒトの発症にどの程度影響しているかについては、今後、更にデータを集めて解析していく必要があると考えられた。

2) EHEC OUT株における発育阻害剤に対する最小発育阻止濃度（MIC）の分布状況

2018年～2020年に分離されたOUT株86株を対象に、セフェキシムおよび亜テルル酸Kに対するMIC値を調べた。セフェキシムに対するMIC値は0.125 µg/mLをピークに0.016～1.0 µg/mLの範囲に一峰性に分布していた。一方、亜テルル酸Kに対してはMIC値が0.25～2.0 µg/mLの感受性株が44株（51.2%）、8～>256 µg/mLの耐性株が42株（48.8%）であった。腸管出血性大腸菌用選択分離培地の亜テルル酸K含有濃度は2.5 µg/mLであることから、OUT株の半数以上がこれら寒天平板には発育しないことが明らかとなった。亜テルル酸K感受性菌の検出をどのように行っていくのが今後の課題である。

3) EHECを対象とした糞便検体の効率的な検査法の確立

腸管出血性大腸菌、特に血清型別不能株の生化学的性状等の特徴を参考にし、実際に搬入された糞便検体を用いて効率的な検査方法を検討した。その結果、効率的な検査を行うためには、1) 検査対象とする血清群が6大血清群であるか、2) 6大血清群ではない場合、血清型が判明しているか、3) 血清型・毒素型いずれも不明かの3つの情報から、適切な増菌培地と分離培地を選択し、培養液を対象としたスクリーニング試験等を行うことで、効率的な検査が可能と考えられた。これらの成果は研修会や講習会で紹介し、他の地方衛生研究所の職員と情報交換を行った。

4) EHEC O157, O26, O111以外の血清群を対象とした分子疫学解析法の検討

現在、O157, O26, O111血清群のMLVAが一般的に実施されている。今回、O103, O121, O145, O91を対象としたMLVAを導入するための基礎研究として、MLVA解析に用いる遺伝子領域について検討した。O157等の解析には17領域を用いているが、この領域でどの程度の多様性が認められるのか、更に文献から選択した4領域を加え、その多様性について従来のPFGE法と比較した。多様性の指標にはSimpson's diversity Index (D) を用いた。その結

果、17領域で多様性が認められたのはO103, O121およびO91 (D=0.95～1.0) であった。一方O145は、PFGE法ではD=0.94と多様性が認められたが、17領域ではD=0.70となり多様性は低かった。しかし4領域ではD=0.80となり、多様性が認められた。

2023年に分離されたO103 17株, O121 5株, O145 2株を対象にPFGEおよびMLVAを実施し、多様性を比較した。O145は同一家族由来株であったことから、いずれの方法でも同一型となった。O103およびO121は従来のMLVAに4領域を加えることでPFGEと同等の識別能を得ることが可能であった。

5) Clade解析法による赤痢菌分類法の検討

赤痢菌の分子疫学解析には主にPFGE法が用いられているが、EHECと比較して多様性に乏しく比較が困難な事例も認められる。そこでPCR法で型別可能なClade解析と合わせることで、より詳細な分類ができると考え、解析を実施した。供試菌株は*S. sonnei* 21株, *S. flexneri* 11株である。Clade解析の結果、菌種ごとに同じCladeに分類されたが、詳細な分類は不可能であった。今後はMLVAや全ゲノム配列を用いた解析について検討していく予定である。

6) 赤痢菌と腸管侵入性大腸菌（EIEC）を鑑別するための手法に関する検討

赤痢菌と腸管侵入性大腸菌（EIEC）は遺伝学的に非常に近いため、生化学的性状では同定が困難な菌株が存在し、誤同定が問題となっている。そこで両者の区別が可能であると報告のある*lacY*遺伝子をPCR法で検出し、両者の区別が可能であるか検討した。生化学的性状試験で赤痢菌と判定した60株およびEIEC 11株を供試した結果、赤痢菌は*lacY*陰性が95%、EIECは9.1%と遺伝子保有状況に優位差が認められた ($p<0.01$)。両者を完全に区別することはできないが、*lacY*遺伝子は鑑別法の1つとして用いることが可能であると考えられた。

7) 赤痢菌を対象とした疫学解析マーカーの有用性についての検討

2018年に発生した細菌性赤痢の国内集団事例4事例由来株 (*S. sonnei*) を対象に薬剤感受性試験、PFGE, MLVA, MLST解析を実施した結果、MLSTはST563で4集団由来株全て同一、PFGEおよびMLVAは集団間の識別は可能であったものの、バリエーションに乏しいため、比較が困難であった。一方、薬剤耐性パターンは集団間で明確に異なっており、疫学マーカーとして簡便かつ有用であることが明らかとなった。

またこれらの菌株を対象に*core* SNP解析を実施した結果、集団ごとにクラスターを形成したことから、分子疫学解析手法の1つとして利用できるものと考えられた。

発表実績

- 1) 小西典子, 上原さとみ, 河村真保: 赤痢菌とMALDI-TOF MS, 第33回日本臨床微生物学会総会・学術集会,

2022

- 2) 河村真保, 村上 昂, 小西典子, 他: 2018年に東京都内で発生した赤痢菌による4集団感染事例について, 第95回日本細菌学会総会, 2022.
- 3) 尾畑浩魅, 小西典子, 齊木 大, 他: 東京都で発生したastA保有大腸菌による集団食中毒事例, 第43回日本食品微生物学会学術総会, 2022.
- 4) 小西典子, 尾畑浩魅, 河村真保, 他: COVID-19流行下における東京都の腸管出血性大腸菌感染症および食中毒発生状況と分離株の特徴, 第24回腸管出血性大腸菌感染症研究会, 2022.
- 5) 小西典子, 和田紀乃, 前田雅子, 他: 健康者糞便から分離された第三世代セファロスポリン耐性およびプラスミド性コリスチン耐性遺伝子保有大腸菌の解析, 第34回日本臨床微生物学会学術総会, 2023.
- 6) 尾畑浩魅, 小西典子, 齊木 大, 他: astA保有大腸菌による食中毒事例と検査法について, 衛生微生物技術協議会第43回研究会, 2023.
- 7) 小西典子, 尾畑浩魅, 河村真保, 他: COVID-19流行下での腸管出血性大腸菌による食中毒発生状況と分離株の特徴, 第44回日本食品微生物学会学術総会, 2023.
- 8) Konishi, N., Obata, H., Saiki D., *et al.*: Foodborne outbreak caused by *Escherichia coli* possessed the astA gene encoding enteroaggregative *E. coli* heat-stable enterotoxin1 (EAST-1) in Tokyo, 57th US-Japan Cooperative Medical Science Program-Joint Panel Conference on Cholera and Other bacterial enteric infection, 2023.

7. 芽胞形成菌を中心とした食中毒起因菌の疫学解析と検査法の確立および病原因子の解明に関する研究

現在, 多くの食中毒起因菌の検査では遺伝子検査や機器分析などの新しい技術を用いた検査法が使用されている。これらの方法は従来法と比較し, 簡易で同等感度以上を担保し, 疫学解析や病原性解析等にも活用されている。しかし, 芽胞を形成する食中毒起因菌においては, 上記のような検査法が十分に検討されているとは言えない。

さらに, 新型エンテロトキシン産生性ウェルシュ菌等の新しい下痢原性毒素産生菌や非定型的な性状を持つウェルシュ菌等が分離されており, 従来の検査法では検査が困難な食中毒事例が発生している。

そこで, 本研究では, 芽胞菌や病因物質不明の食中毒事例等から分離された菌等の疫学解析, 検査法の検討やさまざまな菌体の性状や病原因子の解析を行うことにより, 食中毒の拡大防止に寄与することを目的とした。

1) MALDI-TOF MSによるセレウリド産生セレウス菌の検出法の開発

毒素型食中毒のひとつであるセレウス菌食中毒の原因

物質はセレウス菌が産生する嘔吐毒素セレウリドであり, セレウス菌食中毒事例の原因究明のためには, セレウリドそのものを検出することが重要である。現在, セレウス菌食中毒の検査は, 分離されたセレウス菌のセレウリド産生遺伝子 (crs遺伝子) の有無を調べ食中毒の判定材料としている。

今回, セレウリドを検出する目的で, MALDI-TOF MSを用いた簡易な方法を検討した。

まず, crs遺伝子保有株と非保有株を用いて寒天培地15種類, 液体培地6種類についてセレウリド産生性を比較した。寒天培地については集落およびその周囲をくり抜き, アセトニトリルで抽出, 液体培地については培養液にアセトニトリルを加え, MALDI-TOF MSで測定した。

その結果, 標準寒天から抽出した試料でセレウリドのピークが認められた。さらに, その試料にナトリウムとカリウムを添加後乾固すると, 夾雑物が消え明瞭なピークが得られた。本抽出法を由来 (食中毒事例) が異なるcrs遺伝子保有株15株, crs遺伝子非保有株12株に対しMALDI-TOF MSで測定した結果, 1株を除いてPCR法と同等の結果が得られた。本法は, セレウリドも検出可能であり, 食中毒検査において, PCR法と併用するのが望ましいと考えられた。

2) セレウス菌食中毒事例の原因食品中のセレウリドの検出法の検討

(1) 菌株からのセレウリド検出法の改良 MALDI-TOF MSによる検出法に改良を加え, 選択分離培地上の集落から直接MALDI-TOF MSを用いてセレウリドを検出する方法を検討した。菌の同定に用いるプレート塗布法を応用した結果, 簡易にかつ検体搬入翌日にセレウリドを検出できた。

(2) 食品中に産生されたセレウリド検出法の検討 セレウリド産生セレウス菌を接種したピラフを一晩培養後, QuEChERS法を細菌検査用にアレンジし前処理を行った後, MALDI-TOF MSを用いた結果, セレウリドが検出された。

(3) 食中毒事例への応用 2022年7月に発生したセレウス菌食中毒事例では, セレウリド非産生セレウス菌が多く検出され, 原因菌であるセレウリド産生性セレウス菌の検出が困難であったが, プレート塗布法を応用したMALDI-TOF MSを用いて非常に効率よく原因菌が検出できた。

3) 食中毒検体 (食品) からのセレウリド検出

(1) MALDI-TOF MSを用いたセレウリドの定性 1982年~2022年に東京都で発生したセレウス菌食中毒8事例の原因食品13件 (冷凍保存) に対し, QuEChERS法を応用し必要に応じ固相カラム法を併用した方法でセレウリドを測定した。MALDI-TOF MSで1~3回測定後, 取得したマスペクトルについてFlexAnalysisで解析した。その結果, 12件はQuEChERS法のみでの操作で, 産生量の少ない1件からは固相カラム法の併用により, セレウリドが検出

された。

(2) LC-MS/MSを用いたセレウリドの定量 MALDI-TOF MS測定と同一の試験液を用い、LC-MS/MSで食品中のセレウリドを定量した。セレウリド量は0.09 µg/g~30.0 µg/gであった。2022年事例ではチャーハンと白飯が入った弁当2種類が原因食品とされ、セレウリド量はチャーハンでは26.4 µg/g, 30.0 µg/g, 白飯では0.25 µg/g, 0.11 µg/gとチャーハンの方が高かった。セレウリドの発症量は1 µg/ヒトと言われており、ごはん一口が約10 gであることから、供試した原因食品中には発症に十分量のセレウリドが存在していたことが確認された。

(3) 食中毒検査におけるセレウリド検出の意義 前述のように、セレウス菌食中毒は毒素型食中毒にもかかわらず、分離菌の病原遺伝子（セレウリド遺伝子）の有無で食中毒の判断がなされてきたため、直接毒素の産生が確認できる本検査法の意義は大きい。また、前処理にQuEChERS法を応用し、MALDI-TOF MSを用いる方法は、迅速な結果が求められる食中毒検査において実用的と言える。さらに、同じ試料液を用い、LC-MS/MSによりセレウリドの定量も可能であることから、QuEChERS法を応用した前処理法はセレウス菌食中毒を解明する上で有用と考える。

4) CPILE産生ウェルシュ菌の分子疫学解析

新型エンテロトキシンCPILE産生ウェルシュ菌の分子疫学解析を行うために、CPILE産生ウェルシュ菌14株、既知エンテロトキシン（CPE）産生ウェルシュ菌7株、CPE非産生ウェルシュ菌11株、CPILEに類似しているイオタ毒素産生ウェルシュ菌4株（内2株はCPEも産生）を対象に、血清型別、パルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）パターン解析、MLST解析を実施した。CPILE産生14株の内、4株は血清型TW27であり、他の菌株はHobbs5, TW21, 81, 84, 88, 90（各1株）及びTW86, 型別不能（各2株）であった。血清型TW27の4株のPFGEパターンは互いに異なっていた。MLST解析では、血清型TW27のCPILE産生株のST（近似値を含む）はST 20であり、血清型TW27のCPE非産生株と同じクラスターに分類された。一方、血清型TW27株でもCPE産生株はCPILE産生ウェルシュ菌やイオタ毒素産生ウェルシュ菌産生株4株クラスターとは全く異なるクラスターに分類された。ヒトに下痢を惹起する毒素はCPILEとCPEであるが、血清型TW27株ではCPILEはCPEとは異なる系統で進化したと推定された。

5) ウェルシュ菌産生下痢原性毒素CPILEの下痢原性の検討

CPILEはCPILEaとCPILEbの2成分から構成され、CPILEbが細胞膜に孔をあけて下痢を惹起する。下痢誘発には類似毒素は2成分が必要であるが、CPILEbのみで下痢原性を有する理由として、アミノ酸配列アライメントにおいて孔を構成する最狭窄部位にセリン残基を持っていることが考えられた。セリン残基をフェニールアラニン残基に置換した変異体を作成し腸管ループ試験を実施

したところ、下痢原性が低くなり、セリン残基がCPILEbのみの下痢原性に関与している一因と考えられた。

6) 本邦初のF型ボツリヌス毒素産生Clostridium baratiiによる事例と性状解析

2021年5月に報告されたボツリヌス症疑いの患者ふん便を検査した結果、F型ボツリヌス毒素（BoNT/F）が検出された。しかし、ボツリヌス菌様集落は認められず、常法のPCR法2種でBoNT/F遺伝子陰性であった。PCR法とMALDI-TOF MSで検討を繰り返した結果、BoNT/F遺伝子に変異が認められるサブタイプF7型遺伝子を持つClostridium baratiiによるボツリヌス症であることが判明した。

7) 鮎のいずしによるE型ボツリヌス食中毒事例における検査法の改良

2022年2月に鮎のいずし（原因食品残品）からE型ボツリヌス毒素が検出されたが、菌の分離が困難であった。残品（鮎のいずし）のpHを測定したところ、pH 4.2であった。E型ボツリヌス菌の発育条件はpH 5.0以上であるので、いずし中のボツリヌス菌が発育し毒素が産生された後、いずしを漬け込んでいた麴内の乳酸菌によって酸性に傾いたため、菌の分離ができなかったと考え、増菌培養液をpH 6.0に調整することで、ボツリヌス菌の分離を行うことができた。

発表実績

- 1) Monma, C., Okada, W., Akase, S., *et al.*: MLST analysis of CPILE as a new enterotoxin produced by Clostridium perfringens isolated from foodborne outbreaks, 12th International Conference on the molecular biology and pathogenesis of the Clostridia, 2021.
- 2) Monma, C., Okada, W., Akase, S., *et al.*: Molecular epidemiological properties of CPILE-producing Clostridium perfringens by MLST analyses, 第95回日本細菌学会総会, 2022
- 3) 岡田若葉, 門間千枝, 古田菜摘, 他: Bacillus cereus 食中毒分離菌株のMALDI-TOF MSによるセレウリド産生性試験, 第43回日本食品微生物学会学術総会, 2022.
- 4) 門間千枝, 上原さとみ, 岡田若葉, 他: F型ボツリヌス毒素産生Clostridium baratiiによるボツリヌス症, 第43回日本食品微生物学会学術総会, 2022.
- 5) 古田菜摘, 門間千枝, 岡田若葉, 齊他: 東京都内で発生した鮎のいずしによるE型ボツリヌス食中毒事例—検査と分離菌株の解析—, 第43回日本食品微生物学会学術総会, 2022.
- 6) Monma, C., Furuta, N., Okada, W., *et al.*: Type E foodborne botulism caused by fermented fish food “izushi” in Japan, IBRCC meeting, 2022.
- 7) 門間千枝, 上原さとみ, 岡田若葉, 他: 2021-2022年に東京都で発生したF型ボツリヌス症とE型ボツリヌ

- ス食中毒, 第52回日本嫌気性菌感染症学会総会・学術集会, 2023.
- 8) Monma, C., Uehara, S., Okada, W., *et al.*: Botulism caused by botulinum neurotoxin type F-producing *Clostridium baratii* in Tokyo, Japan, 第96回日本細菌学会総会, 2023.
- 9) 門間千枝, 岡田若葉, 小池 裕, 他: MALDI-TOF MSにより原因食品からセレウリドが検出された *Bacillus cereus* 食中毒事例, 第44回日本食品微生物学会学術総会, 2023.
- 10) 門間千枝, 岡田若葉, 小池 裕, 他: MALDI-TOF MSおよびLC-MS/MSを用いた *Bacillus cereus* 食中毒8事例の原因食品からのセレウリド検出, 第119回日本食品衛生学会学術総会, 2023.
- 11) 小池 裕, 神田真軌, 門間千枝, 他: 炒飯中の嘔吐毒セレウリドの試験法開発及び産生実験による実証性の検証, 第119回日本食品衛生学会学術総会, 2023.
- 12) 吉田 徹, 門間千枝, 滝口創太郎, 他: 二成分毒素 CP1Eb のセリンで形成された膜貫通孔, 第69回トキシシンポジウム, 2023.
- 13) 門間千枝, 尾畑浩魅, 齊木 大, 他: コロナ禍におけるウェルシュ菌食中毒事例の発生状況, 第53回日本嫌気性菌感染症学会, 2024.

総 括

2021~2023年度に実施した重点研究「健康危機管理に関連する微生物の分子疫学解析と検査法の開発に関する研究」では, 新型コロナウイルス, 多剤耐性菌, 結核菌, 真菌, 腸管出血性大腸菌, 芽胞菌やデータベース等の現在ホットな事象を対象とした. また, COVID-19以降, 全国の地方衛生研究所等で配備されている次世代シーケンサー, リアルタイムPCR, MALDI-TOF MS等の新しい手法を駆使して病原体を網羅的に解析し, 一部は実際の検査への導入を図るとともに, 行政への貢献や都民へ情報発信を行った.

本研究で得られた膨大な結果は学会や論文等でも報告しており, 感染症予防計画や健康危機対処計画に基づき, 地方衛生研究所等における食中毒や感染症等の健康危機への応用が可能と考えられる.

**Research on Molecular Epidemiological Analysis of Microorganisms Relevant to Health Risk Management
and Development of Testing Methods**

Mami NAGASHIMA^a, Takushi FUJIWARA^a, Yukari MURATA^a, Noeru HASEGAWA^a, Tsukasa ARIYOSHI^a, Satomi UEHARA^a, Noriko KONISHI^a, Chie MONMA^b, Hiroyuki ASAKURA^a, Masaki HAYASHI^a, Ryota KUMAGAI^a, Sachiko HARADA^a, Miyuki NAGANO^a, Takako YAMAZAKI^a, Mamiyo KAWAKAMI^a, Fumi KASUYA^a, Yu YAOITA^a, Kenshirou KUROKI^a, Arisa AMANO^a, Yurie KITAMURA^a, Maya ISOGAI^a, Tomohiro KOSUGI^b, Emiko KAKU^b, Kaoru SUZUKI^a, Ryou NASUHARA^a, Yukiko Tabei^a, Asamoe OGAWA^a, Mikoto NAKAMURA^c, Chie GOTOU^a, Konomi MURAUCHI^a, Minoru KOTANI^a, Junko HARADA^b, Yuka KAWAI^a, Kouji KOIKE^a, Youko NADAOKA^b, Kiyoko NAKAMURA^b, Hiroaki KUBOTA^a, Megumi ANNAKA^a, Isao YOSHIDA^a, Kai KOBAYASHI^a, Morika MITOBE^a, Rumi OKUNO^a, Yumi UCHITANI^a, Yuri TABUCHI^a, Kouji MORI^a, Yumi TAKAHASHI^a, Kou MURAKAMI^a, Kotono WADA^a, Maho KAWAMURA^a, Satoru AKASE^a, Norihisa MISEKI^a, Ayano NAKAZATO^a, Asuka ONO^a, Chikako ASAYAMA^a, Mari ARAI^a, Ai SUZUKI^a, Wakaba OKADA^a, Natsumi FURUTA^d, Dai SAIKI^a, Masako MAEDA^a, Hiromi OBATA^a, Yukari NISHINO^a, Miki IDA^a, Yoshiko SOUMURA^a, Takashi CHIBA^a, Takayuki SHINKAI^a, Keiko YOKOYAMA^a, Hirofumi MIYAKE^a, Jun SUZUKI^a, and Kenji SADAMASU^a

This paper reports the outline of the priority research project “Research on molecular epidemiological analysis and development of testing methods for microorganisms related to health crisis management” conducted by the Tokyo Metropolitan Institute of Public Health from 2021 to 2023. In this study, pathogens were comprehensively analyzed using new methods such as next-generation sequencers, real-time PCR, and MALDI-TOF MS, targeting SARS-CoV-2, multidrug-resistant bacteria, Mycobacterium tuberculosis, fungi, enterohemorrhagic Escherichia coli, spore-forming bacteria, and databases. In addition to introducing the method into actual testing, we helped the government (including reporting to Tokyo iCDC) disseminate information to Tokyo residents. The results obtained in this study have been reported at academic conferences and in papers, and believe that they can be applied to future health crisis countermeasures for food poisoning, infectious diseases, etc., at the Japan Association of Public Health Institutes (JAPHI).

Keywords: Health risk management, next-generation sequencer, real-time PCR, MALDI-TOF MS, database

^a Tokyo Metropolitan Institute of Public Health,
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan

^b Tokyo Metropolitan Institute of Public Health, at the time when this work was carried out