

1. 学会発表

1.1 筆頭発表

令和4年度食品等収去検査結果について

伊藤佑歩 関谷優晟 佐藤由衣子
今野貴之 高橋志保

秋田応用生命科学研究会第36回講演会
2023年12月 秋田市

秋田県では、県内で流通している食品の安全性を確保するため、「秋田県食品衛生監視指導計画」に基づき、食品等の抜き取り検査（収去検査）を行っている。当センターでは、毎年200～300検体の細菌検査を実施しており、多くの食品は基準適合と判定されているが、中には基準に不適合となる検体もある。今回は、令和4年度の収去検査結果について報告する。

令和4年度に県内8保健所管内で収去した食品計238検体を対象とし、秋田県検査実施標準作業書に従って検査を実施した。検査項目は、大腸菌群、黄色ブドウ球菌など、計12項目である。また、黄色ブドウ球菌陽性検体から分離した菌株については、PCR法により主要な毒素であるエンテロトキシンA～E遺伝子を検索した。

対象となった238検体中、基準に不適合だったのは5検体だった。そのうち4検体から大腸菌群が検出された。大腸菌群は人や動物の腸管の他、自然界の土壌や水環境中に広く分布する。そのため、汚染要因は従事者や原材料に限らず、施設設備や製造環境など様々なものが考えられた。

残りの1検体からは黄色ブドウ球菌が検出された。PCR法によりエンテロトキシンA～E遺伝子を検索したところ、エンテロトキシンA遺伝子が検出された。黄色ブドウ球菌が食品中で増殖する際に産生するエンテロトキシンは熱に強く、食品を加熱しても失活しないため、食中毒防止のためには食品を汚染させないことが重要である。保健所の聞き取りの結果、食品や器具を素手で扱っていたことが原因と考えられた。黄色ブドウ球菌は健康な人の20～40%が保菌しており、鼻腔や手指等に存在するため、食中毒防止のためには、従事者の手洗いや食品を素手で扱わないなど、基本的な衛生管理が必要なこ

とが改めて示唆された。

パンソルビン・トラップ法により給食食材からノロウイルスが検出された食中毒の一例

斎藤博之 秋野和華子 野田衛*1 上間匡*1

第44回日本食品微生物学会学術総会
2023年9月 堺市

【目的】パンソルビン・トラップ法は、食品検体からノロウイルス（NoV）を検出するための実践的な手法である。2023年2月に発生した食中毒事例において、本法を適用したところ給食食材からNoVが検出され、原因究明に資することができたので報告する。

【材料と方法】2023年2月15日～16日にかけて、病床数366床の総合病院にある4つの病棟全てで胃腸炎の集団発生が起きているとの情報が管轄保健所に寄せられ、調査したところ喫食者数165名中、入院患者19名と病院給食を試食した管理栄養士1名に症状があることが判明した。原因究明のため、患者便6検体、給食調理従事者便2検体について常法によりNoVの検査を行った。さらに検食38検体について以下のとおりパンソルビン・トラップ法を用いてNoVの検出を試みた。

【結果】患者便6検体と調理従事者便2検体全てから、NoV-GII.2が検出された。検食のうち、野菜のごま醤油和えから、NoV-GII.2が検出され、汚染量は食品1g当たり8コピーであった。検出されたNoVの塩基配列を比較したところ、患者便、調理従事者便、検食由来のものが全て一致した。

【考察】今回の事例は、発症率が12%（20/165）と低かったことに加えて、病院給食という特性上、調理工程が複雑で細分化（常食・シニア食・刻み食・妊婦食・小児食・腎臓病食・糖尿病食等）されており、原因の究明が難しいところがあった。パンソルビン・トラップ法によりNoVが検出された野菜のごま醤油和えは、全ての有症者が喫食していた。調理工程は白菜と人参を

刻んでゆでた後に放冷して調味料と和えてから盛り付けとなっており、加熱後の汚染が強く示唆された。NoV が検出された2名の調理従事者は、症状があった日も調理に携わっていた（調理品は喫食していない）。今回の事例のように判断材料が少ない状況下においては、食品検体から直接 NoV を検出できるパンソルビン・トラップ法は食中毒事例の原因食品や汚染経路の究明の有力なツールとなり得ることが示された。

*1：国立医薬品食品衛生研究所

秋 田 県 健 康 環 境 セ ン タ ー に お け る SARS-CoV-2 の検出状況とゲノム解析結果

樫尾拓子 柴田ちひろ 伊藤佑歩
鈴木純恵 藤谷陽子
秋野和華子 斎藤博之

第19回秋田県公衆衛生学会学術大会
2023年10月 秋田市

【目的】新型コロナウイルス感染症(COVID-19)の発生に伴い、当センターでは新型コロナウイルス(SARS-CoV-2)の検出、変異株解析を行ってきた。2023年5月8日にCOVID-19の感染症法上の位置付けが5類定点把握対象疾患へ移行したことに伴い、行政対応としては一つの区切りをむかえた。今回、これまでの県内における流行状況を把握するため、検査状況とその結果をまとめたので報告する。

【対象と方法】当センターにCOVID-19疑いとして搬入された23,958検体(2020年2月～2022年12月)を対象に、リアルタイムPCRによるSARS-CoV-2 遺伝子の検出を実施した。リアルタイムPCRで陽性となった3,930検体(2020年11月～)について、各変異株(R.1系統、alpha株、delta株、omicron株)に特徴的なウイルス蛋白質の特定アミノ酸変異(E484K、N501Y、L452R、G339D)を検出する変異株スクリーニング検査を行った。そのうち、Ct値30以下かつクラスターや発生地域等を考慮して抽出した428検体について次世代シーケンサーによるゲ

ノム解析を行った。得られたデータは国立感染症研究所のWebアプリケーションで系統分類し、ハプロタイプ・ネットワーク図を作成した。

【結果】SARS-CoV-2の検出率は、2020年5.9%(146/2,491検体)、2021年7.1%(523/7,375検体)、2022年23.8%(3,356/14,092検体)であった。ゲノム解析で得られた配列とネットワーク図からは、より詳細な系統分類と各ウイルス株間のつながりが確認された。

【考察】COVID-19の世界的な流行を反映して、県内においても時間経過とともに検体数、陽性率が増加したと推察された。変異株については、2021年1月にR.1系統が検出され、次いでalpha株、delta株と、それぞれ5～6ヶ月の期間で変遷した様子が確認された。2022年1月以降は、それまで主流であったdelta株からomicron株に完全に置き換わり、omicron株の感染力の強さが検査結果からも推測された。ゲノム解析からは、疫学調査の結果と併せることでクラスター間の関連性や、感染リンクが不明だった事例同士の繋がりが示唆された。Omicron株以降は詳細な疫学情報と併せた感染リンクの追跡は困難となったが、BA.1やBA.2といった派生型の蔓延状況が示された。

【結論】ゲノム解析は疫学調査と組み合わせることにより、特に感染拡大初期には感染経路の追跡等に有用であり、感染拡大防止への一助となるものと考えられた。ただし、検査の所要時間やコスト等に課題があるため、リアルタイムPCRによる変異株スクリーニング検査とゲノム解析を並行して実施することが実用的と考える。COVID-19の流行はまだ収束しておらず、今後も継続して動向を注視していきたい。

Update of the PANtrap method protocol
reflecting the supply situation of
reagents in recent years

斎藤博之 秋野和華子 野田衛*1 上間匡*1

第70回日本ウイルス学会学術集会
2023年9月 仙台市

【目的】パンソルビン・トラップ法（パントラ法）は、食品検体からノロウイルス（NoV）を検出するための実践的な手法である。本法はウイルス粒子の回収に黄色ブドウ球菌を用いるため、得られた RNA サンプルに菌由来遺伝子の混入が避けられず、試薬の選定や反応条件の工夫等で影響を回避してきた。その後、ホルマリンによる菌体再固定をしたパンソルビンを用いることで、先に様々な対策を余儀なくされていた菌由来遺伝子の混入問題も解消された。これらの知見を踏まえ逆転写反応系及び PCR 反応系の最適化を検討し、プロトコルのアップデートを行った。

【方法】酵素反応の負荷試験のために、NoV 非汚染の市販きな粉を検体としてパントラ法で精製した核酸抽出液（パントラ法抽出液）を用いた。まず逆転写反応の最適化を行った。NoV-GII.4 型の RNA を蒸留水とパントラ法抽出液で段階希釈し、反応温度の異なる（42℃と 58℃）2 種類の逆転写酵素と 2 種類のプライマー（random 9mer と既報の逆転写専用プライマー）を組み合わせた 4 通りの反応系で cDNA を合成し、real-time PCR で増幅効率を比較した。次に実際の食品検査では conventional PCR（1st.PCR）増幅産物に対して real-time PCR を行うこともあるため、NoV-GII.4 型の cDNA 断片を蒸留水またはパントラ法抽出液で段階希釈した希釈液について反応特性の異なる 7 種類の耐熱性ポリメラーゼで conventional PCR を行い、検出限界を比較した。またプロトコルにキャリーオーバー防止プロセスの導入を考慮し、dUTP 使用の可否を検討した。

【結果】逆転写反応の条件として、42℃反応の酵素と random 9mer の組み合わせが最も良好（Ct 値と蛍光強度）な結果が得られ、パントラ抽出液による影響はほとんど認められなかった。また、1st.PCR で用いる酵素として、パントラ抽出液による影響を受けないものを選定できた。この際、反応系に dUTP を添加することで、ウラシルグリコシラーゼを用いるキャリーオーバー防止プロセスが機能することを確認できた。

【考察】ホルマリン再固定によりランダムプライマーが使用可能となり、簡便化のみならず内部標準物質の添加回収が容易になり、精度管理への寄与も見込まれる。パンソルビンの再固定

は、一手間余計にかかることになるが、大きなメリットがあるものと考えられた。

*1：国立医薬品食品衛生研究所

4 年間にわたる新型コロナウイルス対応の総括

斎藤博之 秋野和華子 藤谷陽子
檜尾拓子 柴田ちひろ 鈴木純恵

秋田応用生命科学研究会第 36 回講演会

2023年12月 秋田市

【目的】2023 年 5 月 8 日付けで、新型コロナウイルス感染症(COVID-19)が 5 類感染症となり、新たな局面を迎えることになった。当センターでは、COVID-19 発生当初から県内の技術的中核機関として検査需要に応え、変異株の解析やモニタリングを行ってきた。5 類移行後は、検査需要そのものは減少したものの、県民に対する情報提供はむしろ強化され、さらには次のパンデミックに備えての体制整備が進められている。こうした取り組みが一般の目に触れる機会はほとんどないため、今回の発表ではこれまでの対応を整理・総括してみたい。

【方法】新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）の検出は 2020 年 1 月 28 日付けで国立感染症研究所（感染研）から発出された検査マニュアル（リアルタイム PCR）に従った。変異株のスクリーニングは、N501Y（アルファ株）、L452R（デルタ株）、G339D（オミクロン株）、T547K（BA.1 系統）のマーカーアミノ酸置換については感染研発出のプロトコルを用い、E484K（R.1 系統）、E484A（オミクロン株）、S387F（BA.2 系統）、F486V（BA.4&BA.5 系統）、M_D3N（BA.5 系統）については当センターで検出プロトコルを構築した。ゲノム解析は、NGS を保有する受託業者に検体を送り、納品された FASTQ ファイルを感染研の解析サイトにアップロードすることにより実施した。

【結果と考察】2020 年 2 月 14 日に最初の検体が搬入されてから、2022 年 10 月 23 日までに当

センターには 24,091 検体が持ち込まれ、そのうち 4,024 検体から SARS-CoV-2 が検出された。2021 年 1 月からは変異株が問題となり、本県の流行は R.1 系統、アルファ株、デルタ株と推移した。2022 年 1 月 5 日に本県で初のオミクロン株を検出してから、現在までの検出ウイルスは全てオミクロン株となっている。しかし、オミクロン株の中でも BA.1、BA.2、BA.4、BA.5、XBB とさらに細かい亜系統への分岐が続いている。5 類移行後は、感染対策が個人の判断に任されるようになったことから情報提供の重要性が増し、感染症情報センターでは特設ページを開設するなどの対応を行っている。また、今般のコロナ禍を経て、地方衛生研究所（当センターも含む）は地域保健法第 26 条に明文化され、体制整備に関する責務規定が盛り込まれた。

1.2 共同発表

上間匡，南村幸世，秋野和華子，斎藤博之：冷凍ベリーからのウイルス検出法の検討，第 44 回日本食品微生物学会学術総会，2023 年 9 月，堺市。

牛島廣治，Ariful Sk Hoque，斎藤博之，秋野和華子，小瀧将裕，恩田優子，Kim Ngan Thi Pham，沖津祥子，Kattareeya Kumthip，Pattara Khamrin，小林剛，Niwat Maneekarn，早坂智：Molecular epidemiology of diarrheal viruses in wastewater amid COVID19 pandemic，第 70 回日本ウイルス学会学術集会，2023 年 9 月，仙台市。

遠矢真理，南村幸世，國吉杏子，秋野和華子，斎藤博之，上間匡：NGS を活用した下水疫学調査によるノロウイルスの流行状況の把握，第 119 回日本食品衛生学会学術講演会，2023 年 10 月，東京都。

牛島廣治，西村修一，小林正明，杉田久美子，疋田敏之，斎藤博之，Ariful Sk Hoque，Pham Kim，Pattara Khamrin，秋野和華子，恩田優子，沖津祥子，早川智：COVID-19 パンデミック前後における下痢症ウイルスの便・下水からの検出，第 55 回日本小児感染症学会学術集会，2023 年 11 月，名古屋市。

2. 他誌掲載論文等

2.1 共著論文

須田朋洋, 今野貴之, 福田有希, 佐藤唱 :
秋田県のと畜場搬入豚における *Escherichia albertii* の保菌状況及び飼育農場環境の汚染状況, 日獣会誌, **76**, 2023, e157-e163.

Arai S, Hirose S, Yanagimoto K, Kojima Y, Yamaya S, Yamanaka T, Matsunaga N, Kobayashi A, Takahashi N, Konno T, Tokoi Y, Sakakida N, Konishi N, Hara-Kudo Y.: An interlaboratory study on the detection method for *Escherichia albertii* in food using real time PCR assay and selective agars, Int. J. Food Microbiol., **414**, 2024, doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2024.110616.

Chiaki Ikenoue, Mari Matsui, Yuba Inamine, Daisuke Yoneoka, Motoyuki Sugai, Satowa Suzuki

and the Antimicrobial-Resistant Bacteria Research Group of Public Health Institutes (中略 Shiho Takahashi): The importance of meropenem resistance, rather than imipenem resistance, in defining carbapenem-resistant Enterobacterales for public health surveillance: an analysis of national population-based surveillance, BMC Infectious Diseases, **24**, 2024, doi: 10.1186/s12879-024-09107-4.

Sheikh Ariful Hoque1, Hiroyuki Saito, Wakako Akino, Tomohiro Kotaki, Shoko Okitsu, Yuko Onda, Takeshi Kobayashi, Tania Hossian, Pattara Khamrin, Kazushi Motomura, Niwat Maneekarn, Satoshi Hayakawa, Hiroshi Ushijima: The Emergence and Widespread Circulation of Enteric Viruses Throughout the COVID-19 Pandemic: A Wastewater-Based Evidence, Food Environ. Virol., **15**, 4,2023, 342-354, doi: 10.1007/s12560-023-09566-z.