

調査研究の概要

2. 微生物係

調査研究名	研究の概要
<p>RFLP による結核菌の型別分類について</p> <p>研究担当者: 川合 常明、 廣地 敬</p> <p>研究期間: 平成 11 年度から 20 年度</p>	<p>【目的】 結核菌の遺伝子型別を行うことにより、集団発生時における同一感染源の特定など疫学調査及び接触者健診の充実を図るとともに結核予防対策に役立てる。なお、本調査研究は保健所の「結核菌遺伝子分析研究事業」による共同研究により行われている。</p> <p>【方法】 感染症法に基づいて保健所長が入院勧告した患者のうち、本事業の協力医療機関において結核菌が陽性で、RFLP 検査について本人から同意が得られた菌株を用いて RFLP 解析を行った。</p> <p>【結果及び考察】</p> <ol style="list-style-type: none"> RFLP 検査実施状況 協力医療機関における平成 19 年の結核菌陽性株は 108 株あり、そのうち同意が得られた 24 株(22%)について RFLP 検査を実施した。 RFLP 検査実施状況は平成 15 年までは結核菌陽性株の約 50%を実施することができたが、それ以後減少傾向が続いており平成 19 年は 22%に減少したことから、今回の結果から本市全体の結核菌のまん延状況を把握することは困難であると考えられる。 クラスター分析結果 平成 11 年から 19 年までの累計 474 株のうち IS-6110 RFLP を実施した 457 株についてクラスター分析を行った。 その結果、バンドパターンが一致したクラスター数は 32 種・142 株(31%)あり、そのうち平成 19 年分の 24 株では 5 種・7 株あった。またバンドパターンの類似度が 90~100%未満のクラスター数は 69 種・155 株あった。一方、類似パターンを示さなかったものは 160 株(35%)であった。 集団感染事例 保健所における疫学調査の結果、病院内感染が疑われた 4 株(平成 18 年 3 株、平成 19 年 1 株)について RFLP 解析を行ったところ同一の感染源であったことが裏付けられた。 * 協力医療機関: 独)国立病院機構札幌南病院、北海道社会保険病院
<p>血中インターフェロン 測定キット「クオンティフェロン TB-20」を用いた結核感染診断</p> <p>研究担当者: 川合常明</p> <p>研究期間: 平成 19 年度</p>	<p>【目的】 近年開発された結核感染診断薬-血中インターフェロン 測定キット「クオンティフェロン TB-2G」(以下、QFT)を用いて、結核患者発生時の接触者健診における感染診断の有用性を検証する。 平成 19 年度は 4 月に行った接触者健診の QFT 検査の結果、患者との接触状況及びツ反の結果等から推定した以上に多くの陽性及び判定保留があり、また陰性対照値(以下、Nil 値)も高値を示した。そのため、ヘパリン採血管が QFT 検査に及ぼす影響を検討した。</p> <p>【方法】 平成 19 年 4 月の接触者健診を受診した 78 名を対象に再採血及び再検査を行った。 初回採血は B 社ヘパリンリチウム採血管、また再採血には T 社ヘパリンナトリウム採血管を使用した。 QFT 検査はすべて同一ロット品を使用した。</p> <p>【結果及び考察】 事例: 平成 18 年 12 月末、市内の高校生 1 名の結核患者発生届があり、患者の家族、同級生及び教師等を対象に接触者健診を実施した。その結果、平成 19 年 4 月に QFT 検査を行った 78 名のうち陽性が 20 名(26%)・判定保留が 15 名(19%)であり、また陰性対照値(以下、Nil 値)の平均 1.0IU/ml は CDC の基準値</p>

	<p>0.7IU/ml を超える値であった。しかし、患者との接触状況及びツ反の結果等から推定された以上の陽性・判定保留があった。</p> <p>その原因を調べるため、過去の QFT 検査に使用した採血管のメーカー、種類、製造番号及び Nil 値等について関連を検討したところ、平成 19 年 4 月の健診において B 社へパリンリチウム採血管を使用した際、Nil 値等の異常値が多く認められた。</p> <p>そこで、採血管による QFT 検査への影響を検討するため、同一被験者 78 名を対象に再採血及び再検査を行った。再採血には過去に使用して Nil 値に異常がなかった T 社へパリンナトリウム採血管を使用した。</p> <p>再検査の結果、陽性 5 名(6%)・判定保留 6 名(8%)、Nil 値の平均 0.1IU/ml であり、初回採血の結果とは明らかな差がみられた。</p> <p>今回の結果から、B 社へパリンリチウム採血管が QFT 検査の Nil 値及び判定結果に大きな影響を及ぼしたと判断されたため、試薬製造元は検査に適したへパリン採血管を指定すべきであると考えられる。</p>
<p>食中毒事例及び感染症事例の パルスフィールド電気泳動パ ターン(PFGE)の解析について</p> <p>研究担当者:廣地 敬</p> <p>研究期間:平成 19 年度</p>	<p>【目的】</p> <p>細菌学的疫学指標の一つとしてパルスフィールド電気泳動パターン(PFGE)の解析は、食中毒事例及び感染症事例において菌株の関連性を考える上で、重要な検査となっている。</p> <p>食中毒事例では、原因食品との因果関係を考慮する上で、感染症事例では、夏場複数の集団感染が発生した場合に疫学調査とともに感染の関係を探る上で、PFGE 解析結果が有効活用されている。当所で取扱った菌株の PFGE を調べ蓄積し、疫学情報の参考とするため継続実施する。</p> <p>【方法】</p> <p>当所で取扱った菌株を 2003 年に国立感染症研究所が示した PFGE Protocol に準じて実施した。画像解析ソフト(Fingerprinting)でデンドログラムを作成し類似度の比較を行った。</p> <p>【結果及び考察】</p> <p>腸管出血性大腸菌 O157 は、6 月初めから 9 月中旬まで散発的に分離された 8 株について制限酵素 <i>Xba</i> で処理し泳動したところ類似度 94% 以下で全て異なったバンドパターンを示した。ベロ毒素は 2 株が VT2、6 株が VT1+VT2 であった。</p> <p>腸管出血性大腸菌 O26 は、9 月中旬に兄妹が感染し、兄が通っていた保育園の園児を検査した結果、19 名から菌が分離され全て O26:H11、VT1 で類似度 100% の同一パターンを示し保育園内での集団感染が考えられた事例であった。</p>
<p>材料別にみた病原細菌の 検出状況</p> <p>研究担当者:坂本 裕美子</p> <p>研究期間:平成 19 年度</p>	<p>【目的】</p> <p>札幌市における検査材料別病原細菌の検出状況を把握する。</p> <p>【方法】</p> <p>2000 年～2007 年の 8 年間に札幌市内定点 5 病院、2 検査センター より毎月報告をうけた病原細菌を、穿刺液、髄液、血液、咽頭、喀痰、尿、陰部、便の 8 材料別に集計し、その検出状況の経時的変化を考察する。</p> <p>【結果及び考察】</p> <p>報告総数の年次推移を材料別にみると、髄液以外はすべて増加傾向である。特に、穿刺液、血液、咽頭の増加は顕著で、2008 年は 2000 年比の約 1.5 倍である。</p> <p>検出菌の特徴は、穿刺液、血液におけるコアグラゼ陰性ブドウ球菌、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌が例年主要検出菌になっていること、特にコアグラゼ陰性ブドウ球菌検出数が近年急増していることである。</p> <p>材料別にみると、糞便におけるサルモネラ、腸炎ピブリオの検出数減少が特徴的であり、特に腸炎ピブリオは 2000 年までは毎年 3 桁の報告数であったものが 2001 年以降減少傾向を示し、2007 年は 3 件にまで減少している。これは、2001 年に食品衛生法で生食用鮮魚介類の最確数法が定められた事との関連が推測</p>

	<p>される。</p> <p>また、陰部はクラミジア、淋菌の報告数が減少しているのに対し、B群溶血性レンサ球菌、カンジダの報告数が増加傾向なのが特徴的である。</p>
<p>リアルタイム PCR 法によるウイルス検査法の検討</p> <p>研究担当者: 菊地 正幸</p> <p>研究期間: 平成 19 年度</p>	<p>【目的】</p> <p>リアルタイム PCR 法は、PCR 増幅産物の増加を蛍光により検出して解析する技術であり、従来の PCR 法に比べて、DNA や RNA の定量ができること、電気泳動が不要なので迅速かつ簡便に解析できること、コンタミネーションの危険性が小さいこと、ハイブリダイゼーションが同時に行われるため確認検査が必要ないこと等多くの利点があるため、多くのウイルスについて検出法として取り入れられている。</p> <p>特にノロウイルス(NV)については、既に厚生労働省通知によりリアルタイム PCR 法(通知法)が示され、プライマーやプローブが確立されている。反応条件については Applied Biosystems 社の機器を例に示されているが、当所に導入された機器(Applied Biosystems 社)は、通常の PCR の他に、より高速な PCR(Fast PCR)が可能である。食中毒等検査の迅速化を目的に Fast PCR による条件について検討する。</p> <p>【方法】</p> <p>反応に使用する最終プライマー濃度および反応温度が検出感度に影響を及ぼすので、プライマー濃度については 0.9、0.5、0.3 および 0.1 μM、反応温度(アニーリング/伸長反応)については 56 および 60 に設定して検討した。</p> <p>【結果及び考察】</p> <p>アニーリング/伸長温度を 56 に設定した場合、Ct 値(PCR 増幅産物がある一定量に達したときのサイクル数)は 0.9 μM が最も小さく、0.5 μM、0.3 μM、0.1 μM と濃度が低くなるにつれ Ct 値は大きくなった。0.9 μM で最も感度が高かったが、通知法と比較して Ct 値が 2~8 程度大きくなっていった。</p> <p>アニーリング/伸長温度を 60 に設定して、同条件で検討したところ、56 と同様にプライマー濃度が低くなるにつれ感度が低くなった。通知法との比較では、GI および GII ともにプライマー濃度 0.9 μM の場合に Ct 値および PCR 効率の指標となる検量線の傾きは同等の値を示した。</p> <p>アニーリング温度を 60、プライマー濃度 0.9 μM に設定した時、通知法と同等のデータが得られた。この傾向は G および G ともに認められた。このプロトコールによりリアルタイム PCR の反応時間が、通知法と比較して 1 時間程度短縮できる。</p>