

## 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 年から 20 年</p>	<p><b>【目的】</b> 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および接触者健診の充実が図られるとともに、本市における今後の結核対策に役立てる。なお、本調査は保健所の「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。 本年度は、日本国内の結核菌型別に適する新しい JATA(12)VNTR 法を用いて型別を行い、従来の RFLP 法と比較し VNTR 法の有用性を検証する。</p> <p><b>【方法】</b> 平成 11～19 年までの結核集団感染疑いの 13 事例・30 株を用いて、IS6110-RFLP(以下、RFLP)法及び JATA(12)-VNTR(以下、VNTR)法により分析を行った。</p> <p><b>【結果及び考察】</b> RRFLP による分析の結果、13 事例・30 株中 10 事例・22 株では各事例内における遺伝子型の類似度は 91～100%と類似性が高く、各々同一感染源からの感染事例と判断された。VNTR 法においても 10 事例・22 株は各事例内でプロファイルはすべて一致した。 RFLP 法で 2 事例・4 株では各事例内の類似度が 89%及び 84%と類似性の低い事例においても、VNTR 法では各事例内でプロファイルはすべて一致した。 1 事例・4 株では RFLP 法で 3 株が類似度 90～100%を示したのに対し 1 株は 50%であることから、この株は異なる感染源の同時発症例と判断された。VNTR 法においても、この 1 株のプロファイルは他の 3 株と比較すると 12 箇所中 10 箇所で異なり、同一株でない判断された。 以上の結果から、結核集団感染疑いの 13 事例・30 株について、VNTR 法による分析を行った結果、RFLP 法とほぼ一致した。今回の結果においては、VNTR 法の遺伝子型の識別能力は RFLP 法と同等であると考えられた。</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 20 年度</p>	<p><b>【目的】</b> 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。 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索する上で、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><b>【方法】</b> 当所で取り扱った菌株を 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><b>【結果及び考察】</b> 腸管出血性大腸菌 0157 は、12 菌株集まり制限酵素 <i>Xba</i> で解析した。老人施設の集団発生事例 6 株については、同一のパターンだったが他の株については異なるパターンを示した。性状はすべて H7、ベロ毒素 1&amp;2 であった。 腸管出血性大腸菌 026 は、5 菌株集まり制限酵素 <i>Xba</i> で解析した。兄弟で感染した事例以外は異なるパターンを示した。親子で感染しバンド 1 本が異なり 93.8%の類似度を示した事例があった。性状は全て H11、ベロ毒素 1 であった。 <i>Salmonella</i> Heidelberg(04 : r : 1, 2)の食中毒が 9 月にあった。食材の保存は無く、8 検体のふき取りは全て陰性だったが、従業員 3</p>

	<p>名と患者 19 名から菌が検出された。制限酵素 <i>Bln</i> で解析したところ、従業員・患者合わせて 22 株について結果は全て同一のパターンを示した。</p>																				
<p>レジオネラ属菌の分子生物学的検査法の検討</p> <p>研究担当者： 坂本裕美子</p> <p>研究期間：平成 20 年度</p>	<p><b>【目的】</b> リアルタイム PCR (以下 RT-PCR) 法を用いたレジオネラ属菌検査について検討する。</p> <p><b>【方法】</b> レジオネラ保存菌株 6 株 (<i>Legionella pneumophila</i> (以 <i>L. pneumophila</i>) 1 群、<i>L. pneumophila</i> 5 群、<i>L. pneumophila</i> 6 群、<i>L. pneumophila</i> 8 群、<i>L. micdadei</i>、<i>L. anisa</i>) と腸内細菌 2 株 (<i>Klebsiella oxytoca</i>、<i>Escherichia coli</i>) を用いて RT-PCR 法を実施する。 貯水槽 2 槽の水、給水栓の水、給水栓の湯を試料とし、各々 0.2 μm メンブランフィルターにて濾過濃縮後、RT-PCR 法と培養法を実施し、その結果を考察する。尚、RT-PCR は CycleavePCR <i>Legionella</i> (5S rRNA) Detection Kit を、培養は BCYE 培地、MWY 培地を使用した。</p> <p><b>【結果及び考察】</b> レジオネラ属菌 6 株はすべて増幅を確認し、腸内細菌 2 株は増幅しないことを確認した。 結果を下記の表に示す。</p> <table border="1" data-bbox="512 862 1401 1108"> <thead> <tr> <th>試料</th> <th>貯水槽 1</th> <th>貯水槽 2</th> <th>給水栓水</th> <th>給水栓湯</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>検査法</td> <td>残留塩素濃度 0.5mg/L</td> <td>残留塩素濃度 0.5mg/L</td> <td>残留塩素濃度 0.4mg/L</td> <td>残留塩素濃度 0.2mg/L</td> </tr> <tr> <td>培養</td> <td>60CFU/100ml</td> <td>60CFU/100ml</td> <td>10CFU/100ml 未満</td> <td>10CFU/100ml</td> </tr> <tr> <td>RT-PCR</td> <td>陽性</td> <td>陽性</td> <td>陽性</td> <td>陽性</td> </tr> </tbody> </table> <p>給水栓水は、培養と RT-PCR の結果が不一致となった。これは試料中のレジオネラ属菌が死菌あるいは VBNC 状態で存在していた可能性を示唆する結果であると考えられる。レジオネラ属菌検査は浴槽水、プール水などの塩素添加水が試料となることが多く、RT-PCR を実際のレジオネラ属菌検査に用いるためには、生菌のみを増幅させる工夫が必要と思われる。</p>	試料	貯水槽 1	貯水槽 2	給水栓水	給水栓湯	検査法	残留塩素濃度 0.5mg/L	残留塩素濃度 0.5mg/L	残留塩素濃度 0.4mg/L	残留塩素濃度 0.2mg/L	培養	60CFU/100ml	60CFU/100ml	10CFU/100ml 未満	10CFU/100ml	RT-PCR	陽性	陽性	陽性	陽性
試料	貯水槽 1	貯水槽 2	給水栓水	給水栓湯																	
検査法	残留塩素濃度 0.5mg/L	残留塩素濃度 0.5mg/L	残留塩素濃度 0.4mg/L	残留塩素濃度 0.2mg/L																	
培養	60CFU/100ml	60CFU/100ml	10CFU/100ml 未満	10CFU/100ml																	
RT-PCR	陽性	陽性	陽性	陽性																	
<p>ノロウイルス (GII/4) 型の遺伝子解析</p> <p>研究担当者： 菊地正幸</p> <p>研究期間：平成 20 年度</p>	<p><b>【目的】</b> 2006 年度以降検出された NV の大多数を占める GI/4 型について、ノロウイルス (NV) 遺伝子の中で最も異なっている P2 サブドメインを含む領域 (P2 領域) の解析により、ウイルス株間の相違を見出せるか、領域疫学調査上のデータとして有用であるかを検討する。</p> <p><b>【方法】</b> 2007 年度に NV (GI/4) 型が検出された 20 事例 125 検体について、P2 領域の遺伝子解析を行った。</p> <p><b>【結果及び考察】</b> 19 事例では、事例内の検体間において、N/S 領域及び P2 領域に相違は無かった。 1 事例では、事例内の検体間において、N/S 領域では 100% 一致したが、P2 領域で 1 塩基異なるものがあった。 N/S 領域が 100% 一致していた事例間において、P2 領域では 100% ~ 98.3% の相同性であった。 N/S 領域で 1 塩基異なる事例間でも、P2 領域では 100% 一致する事例があった。</p> <p>以上の結果より、P2 領域の解析によりウイルス株間の相違を検出できる可能性はあるが、異なる事例間においても 100% 一致することもあり、シーケンズデータのみにより感染源や感染経路を明らかにすることには限界があり、疫学調査の補助的手段としての利用が妥当と考えられる。</p>																				

<p>札幌市におけるオセルタミビル耐性インフルエンザウイルスのサーベイランス</p> <p>研究担当者： 村椿絵美</p> <p>研究期間：平成 20 年度</p>	<p><b>【目的】</b></p> <p>2007 年 11 月以降、EU 諸国でオセルタミビル(タミフル)耐性インフルエンザウイルスが報告された。日本国内においても数例報告があることから、札幌市におけるオセルタミビル耐性インフルエンザウイルスのサーベイランスを行うこととし、感染症対策のための科学的データを得ることを目的とする。</p> <p><b>【方法】</b></p> <p>2007 年 10 月から 2009 年 3 月までの間に、札幌市内定点から得られた咽頭ぬぐい液を検体として、分離された A/H1N1 亜型分離株の遺伝子解析を行った。ノイラミニダーゼの 275 番目のアミノ酸をマーカーとして、ヒスチジンからチロシンに変異している場合に耐性株となる。2007 / 2008 シーズン、A/H1N1 インフルエンザウイルス 125 株から無作為に抽出した 55 株を対象とし、また 2008 / 2009 シーズンでは、173 株から無作為に抽出した 79 株を対象として遺伝子解析を行った。</p> <p><b>【結果及び考察】</b></p> <p>2007 / 2008 シーズンでは、対象の 55 株全てが耐性株ではなかったため、出現頻度は 0%であった。しかし、2008 / 2009 シーズンでは、対象の 79 株全てが耐性株へと変異していて、出現頻度は 100%となった。全国的には、2007 / 2008 シーズンでの出現頻度は 2.7%であり、2008 / 2009 シーズンでは、出現頻度は 99.6%となっている。これらのことから、耐性株が 2008 / 2009 シーズンに札幌市を含めた全国に急激に拡大したものと考えられる。</p>
--	--