

(2) 微生物係

調査研究名	研究の概要
<p>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 大西 麻実</p> <p>研究期間：平成 23 年度</p>	<p>【目的】 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、食中毒事例で原因食品との因果関係を考察する上で、また、感染症事例で感染源や感染経路を探る上で有用である。当所では、取扱った菌株の PFGE パターンのデータ蓄積のため、PFGE で解析を行っているところである。 EHEC O157 は IS Printing System (Version2) (TOYOBO)と併せて実施し、解析を行う。</p> <p>【方法】 PFGE 法は国立感染症研究所ニュープロトコールに基づき実施し、泳動パターンを Fingerprinting II で解析し類似度を比較した。 EHEC O157 は IS Printing System の取扱説明書に従って実施し、PFGE 法との比較を行った。</p> <p>【結果及び考察】 EHEC O157 は、14 株集まり PFGE と IS Printing System で解析した。 PFGE パターンの類似度が 100%一致したのは 6 事例 8 株であった。 2 事例 4 株は家族内事例であり、残りの散発事例 4 事例 4 株はそれぞれ同時期の発症であったが、因果関係はわからなかった。 PFGE で 100%一致した株は IS Printing System でも同一のパターンを示した。 また、今回 PFGE と IS Printing System が同一パターンを示した散発事例の 2 株は、2010 年度に検出された 2 株と一致していた。 PFGE と IS Printing System は概ね一致しているので、確認のため併用していくことが望ましいと思われた。 EHEC O26 は 3 株集まり、3 株とも泳動パターンが異なり、過去の菌株と一致するものはなかった。</p>
<p>結核菌の遺伝子型別について</p> <p>研究担当者：廣地 敬 大西 麻実</p> <p>研究期間：平成 23 年度</p>	<p>【目的】 調査研究は平成 11 年 3 月から保健所と共同で「結核菌遺伝子分析研究事業」として実施しており、結核菌の遺伝子型分析を行うことにより、集団発生時における同一感染源の特定及び結核菌株の蔓延状況を把握するなど、結核予防対策に役立てることを目的としている。 今年度は、感染伝播力が強く、薬剤耐性と関連が高く、発病・再発を引き起こしやすいといわれている北京型について札幌市の状況を調べた。</p> <p>【対象】 市内の協力医療機関 2 施設で検査協力を同意がえられた患者から分離された 2008 年から 2011 年までの 197 株、事例については保健所の疫学調査結果とすり合わせ検討した 1999 年から 2011 年までの 21 例 53 株、再発例は 2001 年から 2003 年までの 2 例 4 株、多剤耐性菌は、当所が保有し三種病原体として届出している 1999 年から 2002 年までの 5 株を用いた。</p> <p>【方法】 Warren らの方法(primer は、set 1, TTCAACCATCGCCGCCTCTAC andCACCTCTACTCTGCGCTTTG;set2,ACCGAGCTGATCAAACCCGand ATGGCACGGCCGACCTGAATGAACCset3,GATCGCTTGTCTCAGTGCA Gand CGAAGGAGTACCACGTGGAG;set 4, GGTGCGAGATTGAGGTTCCC andTCTACCTGCAGTCGCTTGTGC) を用いた。 PCR は TaKaRa TP600、電気泳動は QIAxcel System Type S で High Resolution Gel Cartridge を用い OM1600 10s Method、Alignment Marker 15bp/3kb で実施した。</p>

	<p>【結果及び考察】</p> <p>197株のうち北京型株は141株で残りの56株は非北京型株で、北京型株の割合は71.6%であった。</p> <p>同一感染事例は21例53株中の11例27株が北京型株で50%強であった。再発例は2001年から2003年までの2例で1例が北京型株、1例が非北京型株であった。</p> <p>多剤耐性菌は1999年から2002年までの5株全てが北京型株であった。今年度は、2月末までに104株が搬入され事例比較依頼の6株中3株は同一のパターンを示し新たに1事例追加して21事例となった。現在まで377株の解析では、21事例40パターンでクラスター形成は119株の31.6%であった。</p> <p>札幌市の北京型株の割合71.6%は、千葉県、大阪市、神戸市等の都市部の報告より低く岡山県、沖縄県とほぼ同じ割合であり、結核罹患率の低い地域は北京型株の割合も若干低いことが伺える結果であった。</p> <p>また、同一感染事例・再発例については北京型が優勢とはならなかったが多剤耐性菌については全て北京型であり他の報告と同様な結果が得られた。</p> <p>VNTR法での解析数蓄積が進みクラスター形成率も31.6%とRFLP法に近づいてきている。</p>
<p>食肉増菌培養液からのPCR法による病原菌検出について</p> <p>ーサルモネラ、カンピロバクターー</p> <p>研究担当者：坂本裕美子</p> <p>研究期間：平成23年度</p>	<p>【概要】</p> <p>食品の細菌培養同定検査は検査開始から結果が判明するまで長時間を要する。この培養検査の途中にPCR法による遺伝子検査を実施することにより、培養同定終了以前に結果を予想できるかについて検討した。</p> <p>【検査資料】</p> <p>サルモネラ検査にはサルモネラに汚染されている鶏肉を試料とした。カンピロバクター検査にはカンピロバクターに汚染されている鶏肉を試料とした。</p> <p>【方法】</p> <p>1. 培養検査</p> <p>1-1 サルモネラ</p> <p>① 鶏肉10gにBUFFERED PEPTONE WATER(略してBPW)90mlを加え35℃18時間好気培養した。</p> <p>② ①液0.1mlをPAPPAPORT-VASSILISDIS BROTH(略してRV)10mlに加え42℃22時間好気培養した。</p> <p>③ ②液の1白金耳をSS寒天培地、DHL寒天培地に塗抹し35℃24時間培養した。</p> <p>④ 疑わしいコロニーの発育を認めた場合は同定検査を実施した。</p> <p>1-2 カンピロバクター</p> <p>⑤ 鶏肉10gにBOLTONE SELECTIVE ENRICHMENT BROTH(略してボルトンブロス)40mlを加え42℃24時間微好気培養した。</p> <p>⑥ ⑤液の1白金耳を変法スキロー寒天培地EXに塗抹し42℃48時間微好気培養した。</p> <p>⑦ 疑わしいコロニーの発育を認めた場合は同定検査を実施した。</p> <p>2. 遺伝子検査</p> <p>2-1 サルモネラ</p> <p>i. ①のBPW培養液からPCR用テンプレートを作製した。</p> <p>ii. ②のRV培養液からPCR用テンプレートを作製した。</p> <p>PCRは<i>invA</i>を標的遺伝子とするプライマー(TaKaRa)を用いて実施した。</p> <p>2-2 カンピロバクター</p> <p>iii. ⑤のボルトン培養液からPCR用テンプレートを作製した。</p> <p>PCRは16S rRNA領域を標的遺伝子とするプライマー(Lintonら)を用い</p>

て実施した。

培養液からのテンプレート作製方法は熱処理とインスタジーン処理の2通りの方法を実施した。

【結果】

サルモネラ

● : 遺伝子の増幅を確認

培養法		サルモネラの発育確認	
PCR法	処理方法 テンプレート	熱処理	インスタジーン処理
	BPW 培養液	●	●
	RV 培養液	●	●

BPW 培養液、RV 培養液共に熱処理でもインスタジーン処理でも遺伝子の増幅を確認した。

カンピロバクター

● : 遺伝子の増幅を確認

培養法		カンピロバクターの発育確認	
PCR法	処理方法 テンプレート	熱処理	インスタジーン処理
	肉入り ボルトン培養液		

熱処理、インスタジーン処理共に遺伝子の増幅を確認できなかった。鶏肉の脂肪成分等がカンピロバクター遺伝子抽出の阻害物質になっている可能性が推察されたので、鶏肉にボルトンブロスを加えてストマッカーで良く混ぜ合わせた後、鶏肉を取り除きボルトンブロスのみ培養したものと従来通り鶏肉が入ったまま培養したボルトンブロスで結果を比較した。

● : 遺伝子の増幅を確認

培養法		カンピロバクターの発育確認	
PCR法	処理方法 テンプレート	熱処理	インスタジーン処理
	ボルトン培養液のみ		●
	肉入りボルトン培養液		

鶏肉成分を取り除いたボルトンブロス培養液をインスタジーン処理したサンプルのみから遺伝子の増幅を確認した。

【考察】

サルモネラ

BPW 培養液、RV 培養液から作製した PCR 用テンプレートから遺伝子の増幅を確認した。

この結果より、検査翌日の BPW 培養液から PCR 検査を実施することで、培養検査結果を予想することは可能であると思われる。

カンピロバクター

鶏肉をボルトン培養液に入れたままの培養液の PCR では遺伝子の増幅確認が出来ず、鶏肉を取り除いた培養液で遺伝子の増幅を確認した。また、鶏肉を取り除いた状態の培養液でも、熱処理によるテンプレートでは増幅が認められず、インスタジーン処理のテンプレートから遺伝子増幅が確認できた。この結果より、鶏肉成分、培養液成分等が PCR 反応を阻害している可能性が考えられるが、鶏肉を除いた培養液をインスタジーン処理することにより、遺伝子増幅は可能であると思われる。

以上より、培養液からの PCR 検査は培養検査結果を予想することが可能で

<p>低温で増殖可能な食中毒原因菌制御への低温活性リゾチームの応用</p> <p>研究担当者：坂本裕美子</p> <p>研究期間：平成 23 年度</p>	<p>【目的】</p> <p>ニワトリ卵白リゾチームは、食品添加物として広く利用されているが、食品を低温で保存する場合、ニワトリ卵白リゾチームより更に高い増殖抑制を示す物質の添加が望ましい。そこで、低温でより高い抗菌活性を示す新規添加物について調査することを目的とした。（ノーステック財団「研究開発助成事業」のイノベーション創出研究支援事業として北海道大学(相沢准教授)、日本ハム(藤村)との産官学共同研究として実施）</p> <p>【方法】</p> <p>ニワトリ卵白リゾチームと抗菌物質であるタキプレシンの併用によるサルモネラに対する抗菌力についてその最適濃度を調査した。</p> <p>【結果及び考察】</p> <p>ニワトリ卵白リゾチームとタキプレシンを各種濃度で組み合わせ実験した結果、タキプレシン濃度 $0.5 \mu\text{M}/\text{ml}$ とニワトリ卵白リゾチーム $25 \mu\text{M}/\text{ml}$ の組み合わせでサルモネラに対する抗菌力が最大になる結果を得た。</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：菊地正幸</p> <p>研究期間：平成 23 年度</p>	<p>【目的】</p> <p>2008/2009 シーズンに流行した季節性 A/H1N1 亜型インフルエンザウイルスは、そのほとんどが抗インフルエンザ薬オセルタミビル（商品名：タミフル）耐性であった。2009 年 4 月に発生した A/H1N1 新型インフルエンザウイルス(A/H1N1pdm)は、日本を含む世界中に広がり、オセルタミビル耐性 A/H1N1pdm 株の検出も報告された。</p> <p>このような薬剤耐性インフルエンザウイルスの出現により、臨床現場では抗インフルエンザウイルス薬の選択等の治療方針に混乱が生じることが懸念される。また、日本は世界有数のオセルタミビル使用国であるため、耐性株発生状況を把握することが公衆衛生上重要であり、薬剤耐性サーベイランスを強化・継続して、速やかに臨床現場等に還元されることが望まれる。</p> <p>本研究では、札幌市におけるオセルタミビル耐性株のサーベイランスとして、インフルエンザウイルス分離株の遺伝子解析を行い、感染症対策のための科学的データを得ることを目的とした。</p> <p>【方法】</p> <p>2011/2012 シーズンに感染症発生動向調査病原体検査定点から搬入された咽頭ぬぐい液から分離された A/H1N1pdm 型 1 株、A/H3N2 亜型 50 株について遺伝子解析を行った。A/H1N1pdm 分離株の遺伝子解析は、「H1N1pdm オセルタミビル耐性株検出法実験プロトコール（2010 年 11 月 ver.1）」(国立感染症研究所)に基づき One-step RT-PCR(TaqMan Probe 法)により実施した。A/H3N2 分離株については、塩基配列を決定して E119V および R292K のアミノ酸変異の有無を調査した。</p> <p>【結果及び考察】</p> <p>A/H1N1pdm および AH3N2 亜型分離株について耐性マーカーをもつ分離株は無かった。全国的にも、オセルタミビル耐性株は検出されていない(3 月 5 日現在)。以上より、2011/2012 シーズンに流行しているインフルエンザウイルスは、オセルタミビル耐性を獲得していないか、その耐性ウイルスの出現頻度はかなり低いと考えられる。</p>