

微生物係

調査研究名	研究の概要
<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 22 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、食中毒事例では原因食品との因果関係を考察する上で、感染症事例では感染の関係を探る上で、有効活用されているところであり、当所で取扱った菌株の PFGE を蓄積しているところである。 また、昨年より EHEC O157 については IS Printing System (Version2) (TOYOBO) と併せて実施中である。</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 については、IS Printing System は取扱い説明書に従って実施した。</p> <p>【結果及び考察】 EHEC O111 は同一事例の 3 株で同じパターンを示していた。2004 年 2 株、2005 年 2 株、2006 年 2 株の保存株とも比較したが異なるパターンであった。 EHEC O157 は 12 株集まり PFGE と IS Printing System で解析した。PFGE で類似度 100% 一致したのは 3 例 7 株であった。 一例は親子の 2 株であり、残りの 2 例 5 株はそれぞれ同時期の発症であったが関係は不明であった。 PFGE で 100% 一致した株は IS Printing System の 1 st set、2nd set と同一のパターンを示した。 別の親子で PFGE の類似度 97.2% であった株の IS Printing System の結果は、1 st set で一箇所異なったところが確認された。 また、今回 PFGE と IS Printing System が同じパターンを示した 3 株については、2008, 2009 年も一株ずつ検出されていた。 PFGE と IS Printing System は良く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。</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</p> <p>研究期間：平成 22 年度</p>	<p>【目的】 本調査研究は平成 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。 結核菌の遺伝子型別検査法は RFLP 法により行ってきた。平成 20 年度から従来法よりも迅速検査が可能な PCR を用いた JATA(12)-VNTR 法を行っているが、RFLP 法に比べてクラスター形成率が高く解析能が劣っていると考えられた。 そこで、複数の Locus を追加することによって同等程度の解析能を有する組合せを検討した。</p> <p>【対象】 過去の集団感染事例及び平成 17～22 年の結核陽性 260 株を用いた。</p> <p>【方法】 財団法人結核予防会結核研究所「Kekkaku Vol.83, No.10:673-678, 2008」JATA(12)-VNTR 法に 6 箇所 Locus を追加して実施し比較した。 追加 Locus は 1982(QUB18)、2163a(QUB11a)、2165(ETR-A)、3820(VNTR3820)、4120(VNTR4120)、3232(VNTR3232)である。</p> <p>【結果及び考察】 昨年までの統計をとると RFLP 法のクラスター形成率は約 31% であったのに対して JATA(12)-VNTR 法では、約 41% であった。 過去の集団感染事例においては JATA(12)-VNTR 法と 6 箇所の Locus</p>

を追加してもほとんど差異はみられなかった。
 集団感染事例以外では JATA(12)-VNTR 法で同一のパターンであった 9 種・25 株中 2 種 4 株が同一由来の可能性があったが残り 7 種・21 株は異なると考えられた。
 RFLP 法と同等のクラスター形成率を有する追加の組合せとして 1982(QUB18)、2165(ETR-A)、3820(VNTR3820)、4120(VNTR4120)の 4 箇所がコピー数も小さく判別しやすいことから良いと思われた。
 今後、JATA(12)-VNTR 法でクラスター解析をし同一のパターンを示した場合に Locus を追加していくことが良いと思われる。
 なお、今年度は 3 事例の検査依頼があり同室入院歴があった事例では同一のパターンを示したが残りの 2 事例は異なるものであった。

鶏肉における食中毒菌汚染調査と検査法についての研究

研究担当者：坂本裕美子

研究期間：平成 22 年度

【目的】

食肉を生あるいは生に近い状態で喫食することによる食中毒が最近増加傾向にある。そこで、鶏肉が原因で起こる食中毒の主な起因菌であるサルモネラ、カンピロバクターについて市販鶏肉を用い、

1. サルモネラ、カンピロバクター汚染調査
 2. 検査試料と増菌培養液の比率が検査結果に与える影響について
 3. 汚染鶏肉の冷凍保存による菌の消長について
- 以上 3 点について、調査研究を実施する。

【方法】

1. 産地、部位などが異なる市販鶏肉 5 種類を購入し検査試料 5 検体とし、食品衛生検査指針に準じた方法で目的細菌の検査を実施した。
2. サルモネラは試料が 2 倍、10 倍、100 倍に、カンピロバクターは 2 倍、5 倍、100 倍になる条件で培養液を調整し、目的菌の検出を調査した。
3. サルモネラまたはカンピロバクターに汚染されている鶏肉を -20℃ と -45℃ で保存し、1 週間、1 ヶ月、3 ヶ月、6 ヶ月、1 年経過後に培養検査を実施し、菌の消長を確認した。

【結果及び考察】

1. サルモネラは 5 検体中 3 検体から、カンピロバクターは 5 検体中 4 検体から検出され、鶏肉がこれらの菌に高率に汚染されていることを確認した。
2. サルモネラは試料を 10 倍にカンピロバクターは 5 倍に希釈した条件が菌を最も検出しやすい結果となり、試料と増菌培養液の比率が高くても低くても菌の検出率は悪くなり、試料と培養液は最適な条件で培養することが重要であることを確認した。
3. 結果を下記表に示す。

サルモネラ						カンピロバクター							
冷凍前	期間 温度	● 菌の発育を確認					冷凍前	期間 温度	● 菌の発育を確認				
		1週間	1ヶ月	3ヶ月	6ヶ月	1年			1週間	1ヶ月	3ヶ月	6ヶ月	1年
●	-20℃	●	●	●	●	●	●	-20℃	●	●	●	●	●
	-45℃	●	●	●	●	●		-45℃	●	●	●	●	●

冷凍ストレスにより、サルモネラ、カンピロバクターは減少することを確認した。一方、1 ヶ月後に生存している試料は 1 年後も生存していることを確認し、冷凍ストレスに勝ち残った菌は長期間の低温環境下でも生存可能であることを確認した。冷凍温度は -20℃ よりさらに低温の -45℃ が菌の生存は良好であった。

<p>低温活性リゾチームを利用した低温増殖食品微生物の制御</p> <p>研究担当者：坂本裕美子</p> <p>研究期間：平成 22 年度</p>	<p>【目的】 食品添加物としてニワトリ卵白リゾチームが利用されている。しかし、このニワトリ卵白リゾチームより低温で活性を示す低温活性型リゾチームを食品添加物として使用することができれば、チーズなどの低温で保存する食品には更に有効と考える。そこで低温活性型リゾチームの細菌に対する増殖抑制効果を調べることを最終目的に、まず卵白リゾチームの細菌に対する増殖抑制効果について調査する。</p> <p>【方法】 ニワトリ卵白リゾチームを 1μM～1mM まで数段階に濃度調製し、調査対象細菌として <i>Salmonella</i> <i>Infantis</i> を用い、寒天平板法による抗菌活性を調べる。</p> <p>【結果及び考察】 ニワトリ卵白リゾチーム単独では抗菌活性が非常に弱い結果であった。このため、今後は抗菌ペプチドであるタキプレシンを併用して抗菌活性を調査する予定である。</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：菊地正幸</p> <p>研究期間：平成 22 年度</p>	<p>【目的】 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。 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。 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】 2010/2011 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 88 株、A/H3N2 亜型 85 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、耐性株が検出された場合には塩基配列を決定して H275Y 変異の有無を確認した。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】 A/H1N1pdm 分離株について、耐性株が 1 株検出された。この事例は予防内服等については確認されていないが検体採取医療機関ではザナミビルが処方されていた。A/H3N2 亜型については、耐性マーカーをもつ分離株は無かった。札幌市におけるオセルタミビル耐性 A/H1N1pdm の出現頻度は 1.1%(1/93)であった。全国的には、出現頻度は 1.8%(27/1521)であり(3 月 7 日現在)、多くの耐性 A/H1N1pdm は薬剤の選択圧により発生していると考えられている。以上より、耐性 A/H1N1pdm は、ヒト-ヒト間で効率よく伝播する性質を獲得していないと考えられる。また、オセルタミビル耐性 A/H3N2 亜型は全国的にも検出されておらず、出現頻度は A/H1N1pdm よりさらに低いと考えられる。</p>

<p>PCR法を用いた呼吸器系感染症起因ウイルスの検出法の検討</p>	<p>【目的】 現在、札幌市感染症発生動向調査に伴う病原体検査においては、インフルエンザ・咽頭結膜熱・ヘルパンギーナ・手足口病が対象疾患（小児科定点等）とされており、ウイルス分離についてはこれらの原因ウイルスであるインフルエンザ・アデノウイルス・エンテロウイルス等を主にターゲットとして行っている。しかし、呼吸器系疾患の原因ウイルスとして、上記以外にヒトメタニューモウイルス（以下hMPV）・RSウイルス（以下RSV）など多数のウイルスがあり、当所ではこれらのウイルスについては検査方法が確立されていない。 そこで、PCR法によるhMPV、RSVの検出法について検討し、市内におけるこれらのウイルスの検出と流行状況の把握を目的とした。</p> <p>【方法】 陽性コントロールを用いて検出系を整備し、2009年10月から2010年9月までに、感染症発生動向調査病原体検査定点(小児科)から搬入された咽頭ぬぐい液271検体について遺伝子検査を行い検出されたウイルスについて遺伝子解析を行った。</p> <p>【結果及び考察】 271検体のうちhMPVとRSVがあわせて44検体から検出され、検出率は16.2%であった。内訳として、hMPVに関しては21検体から検出され、検出率は7.7%(21/271)、RSVに関しては25検体から検出され、検出率は9.2%(25/271)であった。このうち重複感染が2検体あった。hMPV、RSVともに主な臨床症状は発熱で、平均39.0℃であり、また、23人に上気道炎、1人に下気道炎があった。(内訳：上気道炎hMPV11人、RSV12人、下気道炎RSV1人)hMPVの流行時期は4・6月の春から初夏にかけて多い傾向がみられた。RSVは、冬にかけて多いが1年間を通して検出された。 hMPVの遺伝子型は、21検体中20検体がサブグループA2、1検体がサブグループB2に分類された。RSVの遺伝子型は、25検体中21検体がサブグループA(genotypeGA2)、4検体がサブグループB(genotypeBA)に分類された。 今回の調査により、札幌市内でこれらのウイルスが流行していることが示唆された。hMPVは、迅速診断キットが販売されていないことから、今後も継続して発生動向を調査することが必要と考えられる。</p>
-------------------------------------	---