

(2) 微生物係

| 調査研究名   | 研究の概要  |             |       |       |         |         |         |         |  |  |  |      |      |      |      |      |      |      |      |     |       |       |       |       |         |         |         |         |     |        |        |       |       |        |        |        |       |             |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |       |       |       |         |         |         |       |
|---|--|-------------|-------|-------|---------|---------|---------|---------|--|--|--|------|------|------|------|------|------|------|------|-----|-------|-------|-------|-------|---------|---------|---------|---------|-----|--------|--------|-------|-------|--------|--------|--------|-------|-------------|--|--|--|--|--|--|--|--|--|-------|-------|-------|-------|---------|---------|---------|-------|
| <p>結核菌の遺伝子型別について</p> <p>研究担当者：廣地 敬<br/>大西 麻実</p> <p>研究期間：平成 24 年度</p> | <p><b>【目的】</b><br/>平成 11 年度から「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律」に基づき、集団発生時における同一感染源の特定等の疫学調査及び接触者健診の充実を図るとともに、札幌市における今後の結核予防対策に役立てるため、「札幌市結核菌分子疫学調査事業」として結核菌の遺伝子分析を実施してきた。</p> <p>この事業は「患者の同意」を取った上で保健所と共同で実施してきたが、平成 23 年 5 月に「結核に関する特定感染症予防指針の一部改正について」で分子疫学的手法を積極的に取り入れることが盛り込まれ、札幌市の事業も平成 23 年 6 月に事業の要領を一部改訂して「患者の同意は要しないが目的を説明する」ことにより全ての培養陽性株について検査が可能になった。</p> <p>当所の結核菌分子疫学検査は、開始当初 RFLP 法により行ってきたが、平成 20 年度から迅速検査が可能な PCR を用いた JATA(12)-VNTR 法と必要に応じて 6 箇所 Locus を追加することにより解析能を高めて実施しているところである。</p> <p>当所年報第 38 号で「札幌市における結核菌北京型株について」で北京型株の割合を報告したが、今年度は北京型の新興型と祖先型について調査した。</p> <p><b>【対象】</b><br/>平成 21 年から平成 24 年までに「札幌市結核菌分子疫学調査事業」で収集した 332 株を用いた。</p> <p><b>【方法】</b><br/>JCM32,1542-1564(1994),FEMS Microbiol Lett291,35-43(2009)神戸市環境保健研究所 岩本先生報告を参考に PCR で NTF 領域に IS 存在しない場合は祖先型、NTF 領域に IS 存在する場合は新興型と分別した。</p> <p><b>【結果及び考察】</b><br/>以前分析した株と今回分析した株の合わせて 332 株中、北京型が 236 株で 71%、非北京型が 29%であった。北京型 236 株中の祖先型は 207 株で 88%、新興型は 29 株で 12%であった。</p> <p>祖先型の年齢分布は 70 代以上が 75%を占め圧倒的に高齢者に多いことが分かった。一方新興型は、件数が少ないが 20 代と 30 代で 41%、その親世代の 60 代が 21%を占めていて両世代合わせると 62%を占めていた。特に若い人の交流が活発になり新興型が海外より持込まれ親の世代に感染を広げていることが伺える結果であった。(別表)</p> <p>また、今年度は保健所から依頼を受けた 113 検体中 5 検体が調査により同一感染源と判明し新たに 3 事例追加されることとなった。</p> <p>(別表)</p> <table border="1" data-bbox="486 1592 1428 1787"><thead><tr><th colspan="9">北京型 (236 株)</th></tr><tr><th></th><th>20 代</th><th>30 代</th><th>40 代</th><th>50 代</th><th>60 代</th><th>70 代</th><th>80 代</th><th>90 代</th></tr></thead><tbody><tr><td>祖先型</td><td>4 (2)</td><td>9 (4)</td><td>8 (4)</td><td>9 (4)</td><td>22 (11)</td><td>51 (25)</td><td>81 (39)</td><td>23 (11)</td></tr><tr><td>新興型</td><td>7 (24)</td><td>5 (17)</td><td>1 (3)</td><td>2 (7)</td><td>6 (21)</td><td>3 (10)</td><td>3 (10)</td><td>2 (7)</td></tr><tr><th colspan="9">非北京型 (96 株)</th></tr><tr><td></td><td>3 (3)</td><td>6 (6)</td><td>5 (5)</td><td>9 (9)</td><td>17 (18)</td><td>24 (25)</td><td>25 (26)</td><td>7 (7)</td></tr></tbody></table> | 北京型 (236 株) |       |       |         |         |         |         |  |  |  | 20 代 | 30 代 | 40 代 | 50 代 | 60 代 | 70 代 | 80 代 | 90 代 | 祖先型 | 4 (2) | 9 (4) | 8 (4) | 9 (4) | 22 (11) | 51 (25) | 81 (39) | 23 (11) | 新興型 | 7 (24) | 5 (17) | 1 (3) | 2 (7) | 6 (21) | 3 (10) | 3 (10) | 2 (7) | 非北京型 (96 株) |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 3 (3) | 6 (6) | 5 (5) | 9 (9) | 17 (18) | 24 (25) | 25 (26) | 7 (7) |
| 北京型 (236 株)   |  |             |       |       |         |         |         |         |  |  |  |      |      |      |      |      |      |      |      |     |       |       |       |       |         |         |         |         |     |        |        |       |       |        |        |        |       |             |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |       |       |       |         |         |         |       |
|   | 20 代   | 30 代        | 40 代  | 50 代  | 60 代    | 70 代    | 80 代    | 90 代    |  |  |  |      |      |      |      |      |      |      |      |     |       |       |       |       |         |         |         |         |     |        |        |       |       |        |        |        |       |             |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |       |       |       |         |         |         |       |
| 祖先型   | 4 (2)  | 9 (4)       | 8 (4) | 9 (4) | 22 (11) | 51 (25) | 81 (39) | 23 (11) |  |  |  |      |      |      |      |      |      |      |      |     |       |       |       |       |         |         |         |         |     |        |        |       |       |        |        |        |       |             |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |       |       |       |         |         |         |       |
| 新興型   | 7 (24)   | 5 (17)      | 1 (3) | 2 (7) | 6 (21)  | 3 (10)  | 3 (10)  | 2 (7)   |  |  |  |      |      |      |      |      |      |      |      |     |       |       |       |       |         |         |         |         |     |        |        |       |       |        |        |        |       |             |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |       |       |       |         |         |         |       |
| 非北京型 (96 株)   |  |             |       |       |         |         |         |         |  |  |  |      |      |      |      |      |      |      |      |     |       |       |       |       |         |         |         |         |     |        |        |       |       |        |        |        |       |             |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |       |       |       |         |         |         |       |
|   | 3 (3)  | 6 (6)       | 5 (5) | 9 (9) | 17 (18) | 24 (25) | 25 (26) | 7 (7)   |  |  |  |      |      |      |      |      |      |      |      |     |       |       |       |       |         |         |         |         |     |        |        |       |       |        |        |        |       |             |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |       |       |       |         |         |         |       |

白菜浅漬けによる腸管出血性大腸菌 0157 食中毒事例について  
 — IS-printing System 法を中心に —

研究担当者：坂本裕美子  
 廣地 敬 大西 麻実

研究期間：平成 24 年度

【概要】

平成 24 年 8 月に起こった白菜きりづけを原因食とする腸管出血性大腸菌 0157（以下 0157）の集団食中毒事例について遺伝子検査による解析をするために平成 24 年 8 月 1 日～10 月 31 日までの期間に分離した 0157 菌株について IS-printing System 法と PFGE 法による遺伝子解析を実施した。

【対象】

平成 24 年 8 月 1 日から 10 月 31 日まで札幌市衛生研究所で分離した 0157 菌株、または菌株として病院等から搬入された 0157 菌株、合わせて 84 株を使用した。

【方法】

1. IS-printing System 法

東洋紡績（株）の試薬キットを使用し、取扱い説明書に従って実施し、泳動は QIAxcel (QIAGEN) を用いて実施した。

2. PFGE 法

国立感染症研究所から提示された方法に従い PFGE 法を実施した。制限酵素は Xba I を用いて処理し、泳動は QIAxcel を用いて実施した。解析は BioRad Fingerprinting II を用いた。

【結果】

1. IS-printing System 法

結果を表 1 に示す。解析の結果を IS コードで表すと、5 つのグループと単独のパターンを示す 6 株に分けられた。

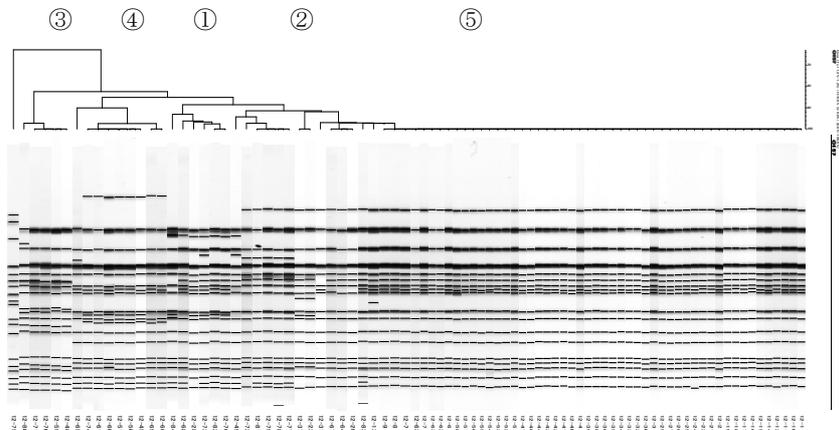
2. PFGE 法

結果を図 1 に示す。解析の結果 5 つのクラスターに分類された。

表 1 IS-printing System 結果

| 1st set |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    | 2nd set |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    | IS コード | IS 結果 | 検査数           |               |        |      |
|---------|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|----|---------|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|----|--------|-------|---------------|---------------|--------|------|
| 1       | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 1       | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 |        |       |               | stx2          | stx1   |      |
| 1       | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1  | 0  | 1  | 1  | 1  | 1  | 1  | 1       | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0  | 1  | 1  | 1  | 1  | 0  | 1  | 1      | 1     | 1             | 315577/211757 | Aグループ  | 便 50 |
| 1       | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1  | 0  | 1  | 1  | 1  | 1  | 1  | 1       | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0  | 1  | 1  | 1  | 1  | 0  | 1  | 1      | 1     | 1             | Aグループ         | 浅漬 4   |      |
| 1       | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1  | 0  | 1  | 1  | 1  | 1  | 1  | 1       | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0  | 1  | 1  | 1  | 1  | 0  | 1  | 1      | 1     | 1             | 317577/211757 | Bグループ  | 便 8  |
| 1       | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1  | 0  | 1  | 1  | 1  | 1  | 1  | 1       | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1  | 1  | 1  | 1  | 0  | 1  | 1  | 1      | 1     | 317572/611557 | Cグループ         | 便 5    |      |
| 1       | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1  | 0  | 1  | 1  | 1  | 1  | 1  | 0       | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1  | 0  | 1  | 1  | 1  | 0  | 1  | 1      | 1     | 1             | 317575/611557 | Dグループ  | 便 9  |
| 0       | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0  | 0  | 1  | 1  | 0  | 1  | 1  | 1       | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1  | 1  | 1  | 0  | 1  | 0  | 1  | 1      | 1     | 1             | 215457/311656 | Eグループ  | 便 2  |
| 1       | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1  | 0  | 1  | 1  | 1  | 1  | 1  | 0       | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1  | 1  | 1  | 1  | 0  | 1  | 1  | 1      | 1     | 1             | 317575/211757 | グループなし | 1    |
| 1       | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1  | 0  | 1  | 1  | 1  | 1  | 1  | 0       | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0  | 1  | 1  | 1  | 0  | 1  | 1  | 1      | 1     | 317577/211557 | 1             |        |      |
| 0       | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0  | 0  | 1  | 1  | 0  | 1  | 1  | 1       | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1  | 1  | 1  | 1  | 0  | 1  | 0  | 1      | 1     | 1             | 215457/311756 |        | 1    |
| 0       | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0  | 0  | 1  | 1  | 0  | 1  | 1  | 1       | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0  | 1  | 0  | 1  | 1  | 1  | 0  | 1      | 1     | 1             | 215457/311257 |        | 1    |
| 0       | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0  | 0  | 1  | 1  | 0  | 1  | 1  | 0       | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0  | 1  | 1  | 1  | 0  | 1  | 0  | 1      | 1     | 1             | 215455/311656 |        | 1    |
| 1       | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0  | 0  | 1  | 0  | 1  | 1  | 1  | 1       | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0  | 1  | 1  | 0  | 1  | 1  | 1  | 1      | 1     | 1             | 101057/310457 |        | 1    |

図 1 PFGE 結果 (デンドログラム)



**【考察】**

IS-printing System 結果より便 50 検体、浅漬け 4 検体は同じ IS コード (A グループ) に分類され、浅漬けによる食中毒患者便はすべて A グループの IS コードであった。

B グループに分類された患者 8 名に共通の疫学情報は見いだせなかった。C グループの IS コードは 8 月上旬に札幌市以外の道内の高齢者施設で集団発生した O157 と同じコードであったが、その施設との共通点は見いだせなかった。D グループに分類された患者は 8 月 12 日～15 日の間に共通施設を利用していたことが判明したが、その施設内での感染源を特定するには至らなかった。E グループにも共通点は見いだせなかった。

PFGE の解析結果は「O157 集団発生時の解析ではバンドの相違が 3 バンドまでならば分離菌株はほぼ確実に集団発生の一部である」との考えに基づくと、IS-printing System の結果とほぼ一致するクラスター解析結果となった。

以上の結果より、IS-printing System および PFGE を実施することにより、浅漬け関連の O157 食中毒とそれ以外の原因で分離された O157 を明確に区別することができた。

また、IS-printing System と PFGE の結果がほぼ同一であったことから、O157 の集団発生時にはより迅速に結果を還元することができる IS-printing System は有効であると考えられた。

|   |  |
|---|--|
| <p>マルチプレックス PCR 法による臨床検体中のウイルス遺伝子検出</p> <p>研究担当者：菊地 正幸</p> <p>研究期間：平成 24 年度</p> | <p><b>【目的】</b></p> <p>感染症発生動向調査に伴う病原体検査においては、発熱や上気道炎等を主症状とする患者からの検体が多いため、ウイルスが分離されなかった検体の中には、その他のウイルスが含まれていることも考えられる。呼吸器感染症の原因ウイルスは多種報告されており、従来から行っている培養細胞を用いたウイルス分離法では検出されないウイルスもあり、検体中のウイルスを効率よく検出するには、PCR 法等の遺伝子検出が有効であり、これまでウイルスが検出されなかった検体からのウイルス検出率の向上が期待される。また、検査対象ウイルスを拡げることにより、その流行をより詳細に把握、解析することが可能となる。</p> <p>そこで、効率的に多くのウイルスを検出する方法として、複数の遺伝子を同時に増幅するマルチプレックス PCR 法 (m-PCR) について、対象とするウイルスやプライマー及び反応条件等を検討する。</p> <p><b>【方法】</b></p> <p>複数のウイルスを 4 組に分けて m-PCR 法のプライマーを設定した (インフルエンザ&amp;パラインフルエンザ、アデノ&amp;単純ヘルペス&amp;パルボ B19&amp;ヒトボカ、RS&amp;ライノ &amp;エンテロ &amp;ヒトメタニューモ、コロナ OC43&amp;229E&amp;NL63&amp;HKU1)。過去に分離同定されたウイルス株と 2012 年 4 月から 9 月まで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および結膜ぬぐい液 172 検体について、DNA/RNA を抽出して m-PCR 法を実施した。</p> <p><b>【結果及び考察】</b></p> <p>過去に分離されたウイルス株については、各系で目的とするサイズの遺伝子が確認された。臨床検体については、一部ウイルスが分離された検体から m-PCR 法で検出できない検体があったが (インフルエンザ&amp;パラインフルエンザ&amp;単純ヘルペス各 1 検体)、その他はすべて分離されたウイルスが検出された。分離されていない RS ウイルス (1)、ライノウイルス (7)、エンテロウイルス (5)、ヒトメタニューモウイルス (1)、コロナウイルス (OC43 (1)、229E (1)) が検出できた。RS ウイルス、ライノウイルスおよびコロナウイルスは他のウイルス (インフルエンザウイルス&amp;アデノウイルス) と重複して検出され、混合感染が多いと示唆された。</p> <p>ウイルスが分離されなかった時期の検体から種々のウイルスが検出され、検出率の向上と流行把握に m-PCR 法は有効であると思われる。</p> |
|---|--|

|  |   |
|--|---|
| <p>呼吸器系感染症起因ウイルスの遺伝子検出法の検討</p> <p>研究担当者：佐藤 寛子</p> <p>研究期間：平成 24 年度</p> | <p><b>【目的】</b></p> <p>札幌市感染症発生動向調査における主な対象疾患はインフルエンザ、咽頭結膜熱、ヘルパンギーナ、手足口病であり、これらの原因ウイルスであるインフルエンザウイルス、アデノウイルス、エンテロウイルスを主なターゲットとしてウイルス分離を行なっている。</p> <p>持ち込まれる検体においては呼吸器系疾患の検体が多く割合を占めるが、呼吸器系感染症の原因ウイルスは上記のほかにもパラインフルエンザウイルス・ヒトメタニューモウイルス（以下 hMPV）・RS ウイルス（以下 RSV）・ライノウイルス等多数あり、今現在ウイルス不検出となっている検体にはターゲット以外のこれらのウイルス感染症が含まれているのではないかと考えられる。実際に平成 22 年度の村椿の調査研究の結果では、2009/2010 シーズンにおける hMPV・RSV の流行が確認された。</p> <p>そこで今回、ウイルス分離では検出することが困難なウイルスのうち hMPV・RSV・エンテロウイルス・ライノウイルスをターゲットとした遺伝子検出法の検討を行ない、呼吸器系感染症に起因するウイルスの流行状況を把握することを目的とした。</p> <p><b>【方法】</b></p> <p>2012 年度感染症発生動向調査の検査でウイルス不検出であった検体 13 検体とポジティブコントロール（以下 PC）を検査材料とし、平成 22 年度に村椿が構築した検出系を用いて、hMPV、RSV A 型、RSV B 型それぞれについて遺伝子検出法を行なった。</p> <p><b>【結果及び考察】</b></p> <p>hMPV は PC と 1 検体から検出された。シーケンスによる遺伝子解析によって検体から検出されたものは hMPV の配列であることが確認された。</p> <p>RSV A 型は PC と、hMPV が検出された検体とは異なる 1 検体から検出された。シーケンスによる遺伝子解析によって検体から検出されたものは RSV A 型の配列であることが確認された。</p> <p>RSV B 型は検体からも PC からも検出されなかった。PCR 条件等を検討したが PC の検出がされなかったため、ウイルス株を Hep2 細胞に接種しその検出を試みたところ、ウイルス分離はされなかったが培養液から RSV B 型が検出され、シーケンスによる遺伝子解析によって RSV B 型の配列であることが確認された。今後はこの培養液を PC として用いることとした。</p> <p>以上より、hMPV と RSV A 型、RSV B 型について、今回行なった検査が適正な検出条件であることがわかった。感染症発生動向調査の検体に対してこれらの検査を行なうことで hMPV、RSV の流行状況を把握することが可能であると考えられる。</p> <p>また、これら以外のターゲットであるエンテロウイルス、ライノウイルスに対しては検出法が既にある程度確立していることから、hMPV と RSV の検査に併せて検査することで、ウイルス感染による呼吸器系疾患の流行状況を把握できると考えられる。</p> |
|--|---|