

1 保健科学課
(1) 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：山口 温</p> <p>研究期間：平成 11～27 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、本市における現状把握と今後の結核対策に役立てる。</p> <p>【方法】 PCR を用いた、VNTR（反復配列多型分析）により、JATA12 の 12 Locus と追加の 6 Locus について、遺伝子型別を行った。</p> <p>【結果及び考察】 平成 27 年度は、99 検体受付、59 検体検査を行った。2 検体が、過去に検査した菌株と 18 Locus 全てが一致した。それ以外の JATA12 一致又は 1 Locus 違いの 37 件と JATA12 の 2 Locus 違いのみの 2 件、合わせて 39 検体について、過去の菌株との関連性が疑われる旨、保健所に報告した。</p> <p>山形県衛生研究所が開発したプログラムにより、これまで検査した菌株の VNTR 型から、遺伝子系統（北京型）を推定したが、北京型 71.1%、その中で新興（Modern）型は 14.1%で、過去の日本の分離比率と大きな違いはなかった。</p> |
| <p>遺伝子検査による腸管出血性大腸菌の検出について － O26, O103, O111, O121, O145, O157 を中心に －</p> <p>研究担当者：坂本裕美子</p> <p>研究期間：平成 27 年度</p> | <p>【目的】 細菌検査における標準的検査法は培養した菌を同定するという方法である。</p> <p>しかし、この方法の欠点は、結果判明までに時間を要する点である。近年は遺伝子検査を取り入れることによる迅速化の動きが出てきている。そこで、平成 25 年の衛生微生物技術協議会で報告のあった「コンベンショナル PCR による腸管出血性大腸菌 7 大 O 群血清型（O26、O103、O111、O121、O145、O157、O165）の検出方法」を参考としてマルチプレックス PCR 法を実施し、この方法がスクリーニング検査として使用可能かについて検討する。</p> <p>【方法】</p> <ol style="list-style-type: none"> 札幌市衛生研究所にて分離し、保存してある菌株の中から <ol style="list-style-type: none"> 腸管出血性大腸菌 O26、O103、O111、O157（7 大 O 群血清型に属する）各 1 株 腸管出血性大腸菌 O91、O128（7 大 O 群血清型に属さない）各 1 株 腸管毒素原性大腸菌 O159（腸管出血性大腸菌に属さない）1 株の 7 菌種（7 株）について、平板培地で純培養した。 純培養した菌を掻き取り、アルカリ熱処理にてテンプレート DNA を作製した。 平成 27 年度 4 月～12 月に腸管出血性大腸菌検査依頼があった検体のなかで、実際に腸管出血性大腸菌が検出された 4 検体（O103：1 検体、O26：3 検体）について、糞便を mEC 培地で 42℃、22±2 時間培養を行った増菌液をアルカリ熱処理にてテンプレート DNA を作製した。 <p>上記 1、2 のテンプレート DNA について One-shot multiplex PCR 法を実施した。</p> <p>【結果及び考察】 菌株を用いたマルチプレックス PCR 法の結果はプライマー対応のある腸管出血性大腸菌 4 株についてはそれぞれ対応する O 群プライマーで増幅バンドを確認した。対応するプライマーのない腸管出血性大腸菌 2 株</p> |

| | |
|--|--|
| | <p>及び毒素原性大腸菌 1 株についてはいずれの O 群プライマーにも増幅しないことを確認した。O 群以外の stx1、stx2 については VTEC-RPLA の検査結果と一致した。</p> <p>増菌液からのマルチプレックス PCR 法は O103 と O26-1 について分離株の性状に対応するプライマーの増幅バンドを確認したが O26-2、O26-3 についてはいずれのプライマーでも増幅バンドを確認しなかった。鋳型 DNA 量が少量または多量である可能性を考えテンプレート量を基本の 2.0 μl から 3.5 μl、5.0 μl に変更、またはテンプレートを 10 倍、50 倍、100 倍に希釈し、再度マルチプレックス PCR 法を実施したがいずれの条件でも増幅バンドは確認できなかった。培養液中の夾雑物等が PCR 反応を阻害している可能性が考えられた。</p> <p>菌株、増菌液どちらの PCR 反応でもエキストラバンドの形成はなく、特異性が高いプライマーであることを確認した。</p> <p>以上より、今回検討を行った One-shot multiplex PCR 法は増菌液のテンプレート DNA については今後の検討が必要であるが、特異性は高いことが確認された。</p> <p>よって One-shot で腸管出血性大腸菌主要 7 血清群と 3 種類の病原性遺伝子を検出可能な本方法は EHEC 検査時のスクリーニングとして有効な方法であると考えられる。</p> |
| <p>札幌市における抗インフルエンザ薬耐性株のサーベイランス</p> <p>研究担当者：大西麻実</p> <p>研究期間：平成 26～28 年度</p> | <p>【目的】</p> <p>インフルエンザは毎年冬季シーズンを中心に、世界的に流行する感染症である。抗インフルエンザ薬のオセルタミビル（商品名：タミフル）はインフルエンザの治療薬として世界的に使用されており、その使用拡大によるオセルタミビル耐性株の出現が懸念されている。このため、WHO では抗インフルエンザ薬耐性株サーベイランス強化のため、加盟国にサーベイランスの要請を行っており、日本では国立感染症研究所を中心に地方衛生研究所が協力し、抗インフルエンザ薬サーベイランスを行っている。</p> <p>札幌市では、2013/2014 シーズンに A(H1)pdm09 型ウイルスのオセルタミビル耐性株が高頻度に発生した。このため、抗インフルエンザ薬サーベイランスにおいて、耐性株の発生状況を把握し、速やかに医療現場へ情報を提供することは重要である。</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強化を目的として、A(H1)pdm09 型ウイルスの遺伝子解析を行うことで、耐性株の発生状況を把握する。また、A(H3)型ウイルス、B 型ウイルスについても耐性株の発生状況を把握する。</p> <p>【方法】</p> <p>平成 27 年度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(H1)pdm09 型ウイルスについて「インフルエンザ診断マニュアル（平成 24 年 3 月第 2 版）」（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、オセルタミビル耐性マーカー H275Y 変異の有無を確認した。A(H3)ウイルス、B 型ウイルスについては、国立感染症研究所（感染研）が実施した薬剤感受性試験の還元データより耐性株の発生状況について把握を行った。</p> <p>【結果及び考察】</p> <p>平成 27 年度は A(H1)pdm09 型ウイルスが 53 株分離・検出され、このうち 43 検体について H275Y 変異の解析を行った。この結果、H275Y 変異をもつウイルスは検出されなかった。全国的には、831 株の A(H1)pdm09 型が解析されており、このうち、オセルタミビル及びペラミビルに耐性を示すウイルスが 8 株（1.0%）検出されている（平成 28 年 3 月 8 日現在）。また、今年度は A(H3)型ウイルスが 30 株、B 型ウイルスが 20 株分離されている。このうち、A(H3)型ウイルス 7 株、B 型ウイルス 5 株について、感染研が実施した薬剤感受性試験の結果、全て抗インフルエンザ薬に</p> |

| | |
|--|---|
| | <p>対する感受性を保持していた。札幌市において平成 27 年度に流行しているインフルエンザウイルスは、抗インフルエンザ薬に対する耐性を獲得していない、またはその耐性ウイルスは非常に少ないと考えられる。今後も解析を進めていく。</p> |
| <p>札幌市におけるアデノウイルスの遺伝子解析に基づく発生動向</p> <p>研究担当者：古舘大樹</p> <p>研究期間：平成 27 年度</p> | <p>【目的】</p> <p>アデノウイルスは、50 種類以上の血清型が知られており、咽頭炎、扁桃炎、肺炎などの呼吸器疾患、咽頭結膜熱、流行性角結膜炎などの眼疾患、胃腸炎などの消化器疾患、出血性膀胱炎などの泌尿器疾患から、肝炎、膵炎から脳炎にいたるまで、多彩な臨床症状を引き起こす。</p> <p>これまで当所では、感染症発生動向調査事業において定点把握対象の咽頭結膜熱や流行性角結膜炎等の患者の検体について病原体検査を行い、アデノウイルスを分離・同定してきた。しかし、血清型同定の主要な方法である中和試験法は同種のアデノウイルス間で交差反応することが知られている。また、遺伝子組換えなどによる新たな型のアデノウイルスが分類・提唱されており、日本国内でも眼疾患検体から新たに分類されたアデノウイルス 56 型が遺伝子解析により検出されている。しかしながら、このような新しい型のアデノウイルスは、中和試験法では交差反応のため実際の型とは異なって判定されている可能性もあり、検出報告例が少ないことから、その詳細な発生動向は明らかとなっていない。</p> <p>そこで本研究では、新しい型のアデノウイルスの発生動向を明らかにするため、過去の分離株の遺伝子解析を行い、遺伝子配列を基準にした型同定とそれに基づくアデノウイルスの発生動向の分析を行う。</p> <p>【方法】</p> <p>2005 年度以降の眼科検体から分離された D 種アデノウイルス 37 株を研究対象とした。2012 年度以降の検体については、初めから Penton 領域、Hexon loop 1 領域および Fiber 領域の遺伝子解析を行い、遺伝子型を同定した。一方、2011 年度以前の検体については、主に中和試験で 8 型と同定された 5 株の遺伝子解析を行い、遺伝子型として再分類した。</p> <p>【結果及び考察】</p> <p>解析した 37 株は、それぞれアデノウイルス 19 型 1 株、37 型 7 株、53 型 4 株、54 型 4 株、56 型 21 株と同定された。そのうち、当初中和試験で 8 型と同定されていた 5 株については、53 型 4 株、56 型 1 株に再分類された。これらの結果及び既報から、遺伝子組換えなどによる新型の 53 型、54 型、56 型が、それぞれ少なくとも 2005 年、2015 年、2008 年から札幌市内で存在していたことが明らかとなった。以上より、アデノウイルスの同定に際しては遺伝子解析を行うことにより正確な発生動向を把握できると考えられる。</p> |
| <p>札幌市において検出されたエンテロウイルスの分子疫学的解析</p> <p>研究担当者：古舘大樹</p> <p>研究期間：平成 26～27 年度</p> | <p>【目的】</p> <p>エンテロウイルスは、夏季における小児のウイルス性感染症（手足口病、ヘルパンギーナ等）の主要な病原体である。感染・発症した際は、発熱、上気道炎、発疹等多様な臨床症状を示す。通常は予後良好であるが、まれに脳炎や心筋症など重篤な症状を引き起こすことがある。近年では、エンテロウイルス 71 型による重症例、コクサッキーウイルス A6 型による爪剥落などの臨床症状を伴う手足口病の流行などが報告されている。したがって、エンテロウイルスの発生動向及び他の時期・地域で検出された株との関係性を把握しておくことは、感染症の流行予防とまん延防止のために重要である。</p> <p>そこで本研究では、札幌市において検出されたエンテロウイルスについて、手足口病・ヘルパンギーナの患者発生状況との比較や、その塩基配列を決定し他の時期・地域で検出された参照株とあわせた分子疫学的な解析を行う。</p> <p>昨年度までに 2010 年から 2014 年に採取された検体について解析を終え</p> |

た。そこで今年度では、さらに 2015 年に採取された検体についても解析を進めるとともに、本期間に検出されたエンテロウイルスについて長期疫学的な解析を行う。

【方法】

昨年度に引き続き、感染症発生動向調査において 2015 年 12 月に小児科定点にて採取された咽頭ぬぐい液等 147 検体について、ウイルス分離を行った。また、分離陰性だった検体のうち 44 検体については、PCR 法によりエンテロウイルス VP1 遺伝子の検出を試みた。型の同定は、遺伝子解析によった。

【結果及び考察】

分離法により 10 株分離、PCR 法により 25 件検出された。内訳は、コクサッキーウイルス A4 型 1 件、コクサッキーウイルス A6 型 20 件、コクサッキーウイルス A10 型 2 件、コクサッキーウイルス A16 型 9 件、コクサッキーウイルス B5 型 3 件であった。特に、コクサッキーウイルス A6 型はほとんど PCR 法によってのみ検出された。以上のことから、分離法に加え PCR 法を併用することで分離が難しいエンテロウイルスも検出できるようになり、より正確な発生動向を把握できると考えられる。

また、分子系統解析及び Blast 検索により、札幌市で検出された株の中には国内の他地域に加え海外で検出された株と近縁なものがあることが示唆された。