

神奈川県微生物検査情報

<http://www.eiken.pref.kanagawa.jp/>

神奈川県衛生研究所

第 143 号

(2004年11月)

平成 17 年 1 月 24 日発行

特集：結核菌の新しい遺伝子型別法による感染源究明への応用

ヒト由来細菌情報

医療機関からの患者発生届けに伴う関係者調査を実施し、腸管出血性大腸菌が検出された。
感染症発生動向調査検査定点からの検体検査で病原血清型大腸菌が検出された。
他県関連の食中毒検査および依頼検便からサルモネラが検出された。
平塚保健所で有症者からカンピロバクターが検出された。
県内病院からの検体検査でマイコプラズマが検出された。

食品由来細菌情報

食中毒汚染実態調査の鶏挽き肉からサルモネラが検出された。

環境由来細菌情報

河川水腸管系病原菌調査から 01 & 0139 以外のコレラ菌が検出された。
浴槽水等の検査からレジオネラが検出された。

集団発生情報

神奈川県域で食中毒様胃腸炎が 1 事例発生した。食品 1 検体および便 8 検体について遺伝子検出法で検査したところ、患者および調理従事者の便 6 検体からノロウイルスが検出された。

ウイルス情報

感染性胃腸炎患者の便 1 検体から、遺伝子検出法によりノロウイルスが検出された。
手足口病患者の咽頭拭い液 4 検体から、コクサッキーウイルス A16 型が 2 株分離された。
咽頭結膜熱患者の咽頭拭い液 1 検体から、アデノウイルス 3 型が分離された。
その他、RS ウイルス肺炎を疑う患者 1 名の咽頭拭い液から、遺伝子増幅法により RS ウイルス遺伝子が検出された。

(微生物部・地域調査部)

特集

結核菌の新しい遺伝子型別法による感染源究明への応用

1 結核の集団感染と感染経路の解明

結核の集団感染は学校、事業所、病院あるいは福祉施設等で発生しており、1990年代から増加の傾向を辿っています（図1）。学校での集団発生が多く（約3割）、本県でも、2004年2月に横浜市内の大学において男子学生3名が結核を発病し、88人が予防内服治療を受けた事例がありました。また、最近では成人における集団発生（サウナ、簡易宿泊所、老人施設等）も増えており、その原因として、結核未感染者や高齢者等の結核ハイリスク集団の増加および結核に対する認識の低下（重症になるまで結核であると気がつかない）などが挙げられています。

集団感染が発生した場合、結核菌検査と同時に、感染の拡大や以後の再発を防止する意味で、感染経路を調べ、感染源の究明や感染の広がりを把握することが重要になってきます。その感染経路を追求するための方法として、現在、患者から検出された結核菌の遺伝子を調べて型別する分子疫学的手法が実施されています。複数の患者から検出された結核菌の遺伝子型が同一であれば同じ菌株による感染と判断され、他の様々な発生疫学情報から感染経路を究明することが可能となります。

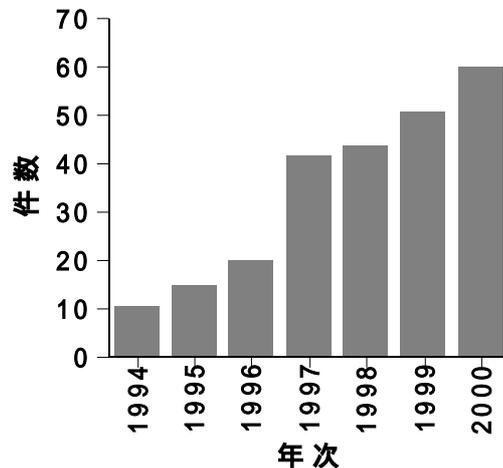


図1 国内における結核集団感染発生数の年次的推移

2 VNTR法を利用した結核菌の遺伝子型別

結核菌は危険度分類でレベル3に属しており（病原細菌に関するバイオセーフティー指針：日本細菌学会）、その取り扱いには一定レベルの設備と技術が必要とされています。現在、当衛生研究所ではP3施設を備え、結核菌の塗抹検査、培養検査および遺伝子型別等の業務が実施可能となっています。遺伝子型別法としてはVNTR（Variable Number of Tandem Repeat）と言う新しい方法の導入を検討しています。従来から利用されてきた遺伝子型別法はRFLP（Restriction Fragment Length Polymorphism）で、この方法では結果が判明するまで1～2週間を要します。しかし、VNTR法では1～2日で済み、格段に迅速で操作も簡便です（図2）。

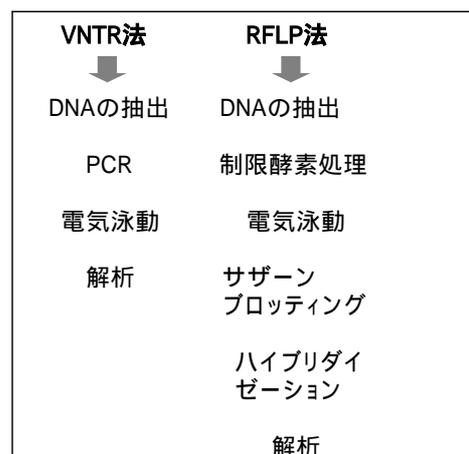


図2 VNTR法とRFLP法の操作手順

VNTR法の技術理論に関する説明は別の機会に譲るとして、ここでは、現在、当衛生研究所で実施しているVNTR法による結核菌の遺伝子型別の実際を簡単に紹介します。結核菌DNA

を抽出し、結核菌に特異的な 16 組のプライマーを使用して PCR を実施後、PCR 増幅産物をアガロースゲル電気泳動して泳動パターンを比較します。図 3 に、結核菌標準菌株(A)および再発事例で分離された 2 株 (B、C) の VNTR 電気泳動パターンを示します。1 ~ 16 のバンドを比較すると、B と C 株は同じ位置にバンドが出ていますが、A 株とは異なることが分かります。B と C 株は結核を再発した同一患者から分離されたものですが、以前に発症した際に菌が肺に残っており、数年後に同じ菌で発症したこと（結核の再燃）が判明したわけです。この場合は以前と同じ治療法（抗生物質等）が利用可能であることとなります。

また、VNTR 法では、PCR 増幅産物の大きさ（bp）を読み取り、換算表に照らし合わせて数値化（アリルプロファイル）することが可能です。数値化の理論を説明するのは容易ではないので、誌面の都合上省きます。取りあえず、図 3 に示した 3 菌株の電気泳動パターンをアリルプロファイルで表してみると、表 1 のようになります。B と C 株のプロファイルは完全に一致し、

一方で、A 株とは異なりました。このように、解析結果を数値化できることは、他機関とのデータ比較や全国的なデータベース構築をする上で大きな武器になると考えられており、画像解析をしなければならぬ従来の RFLP 法と比べ VNTR 法の大きな長所と言えます。

当所において、現在までに県立循環器呼吸器病センターから分譲された 30 数株の結核菌を VNTR 解析したところ、全て異なる電気泳動パターンとアリルプロファイルを示しました。これらの結核菌株はそれぞれ異なる患者から分離されたもので、VNTR 法の型別精度の高いことが示唆されました。

3 今後の課題

VNTR 法はまだ新しい方法ですが、上述のように当衛生研究所の検討成績から見てもその有

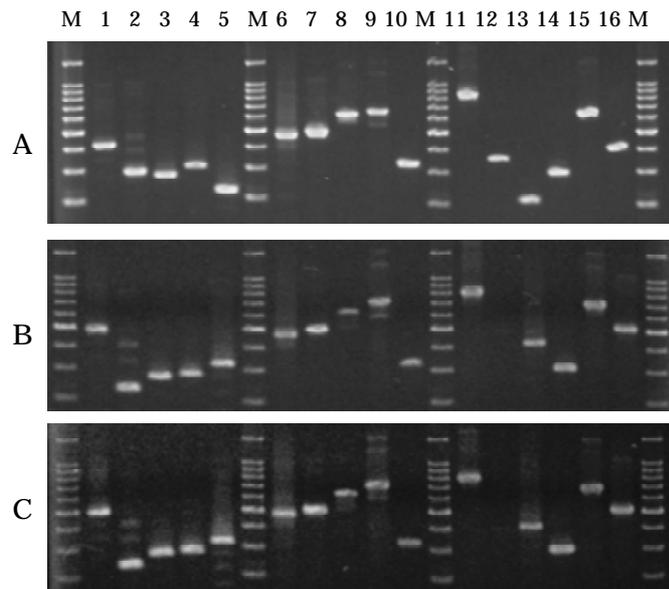


図 3 結核菌の VNTR 解析における PCR 増幅産物の電気泳動像 A：標準株(H37Ra) B：分離株(J-314) C：分離株(J-251) BおよびCは同一患者由来の分離株で、Cは2年後に分離されたもの M：マーカー 1～16：増幅部位(TBTR1～16) BおよびC株におけるTBTR12のPCRについては再試験を行い、両株共に同じ位置に増幅バンドが検出された

表 1 VNTR 解析におけるアリルプロファイル

結核* 菌株	増幅部位(TBTR 1～16)															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
A	3	3	4	3	3	3	2	3	2	2	6	1	3	3	2	1
B	4	2	4	3	5	3	2	3	3	2	5	4	7	3	4	3
C	4	2	4	3	5	3	2	3	3	2	5	4	7	3	4	3

*図 3 を参照

用性は高いと思われます。国内においては、大阪府立公衆衛生研究所、大阪府立呼吸器・アレルギー医療センター、千葉県衛生研究所等で VNTR 法が検討されており、今後、この方法を導入する機関が増えていくと予測されます。当所においても今後データを蓄積しながら、より高精度且つ迅速・簡便な方法の確立を目指し、県立循環器呼吸器病センターをはじめ、県内外の機関と協力しながら検討を進めていきたいと考えています。

また、表 1 にも示すように、VNTR 法においては解析結果を数値化し、これを集積してデータベースの構築が可能です。データベース化には今後検討すべき課題が残されていますが、全国レベルでのデータベース化が実現することにより、広い地域での情報交換が可能となり、県内外の結核対策に大きく貢献することになると考えられます。

更に VNTR 法のもう一つの特徴は、喀痰から直接に結核菌の遺伝子型別が実施できる可能性を秘めていることです。現在、当所で行っている VNTR 法は培地に発育した結核菌を利用していますが、結核菌は増殖が遅く、培地上にコロニーを形成するまでに 3 週間以上もかかってしまいます。従って、解析そのものが迅速であっても、結果的に日数を要してしまいます。VNTR 解析のサンプルとして喀痰を直接利用できれば、遺伝子型別の迅速化が更に進むことになります。これは迅速な感染経路の解明につながり、結核対策の推進にも寄与することになると考えられます。

(微生物部 ・ 企画情報部)

表1 ヒト由来検査件数及び病原菌検出状況(検査材料取扱い機関別)

(平成16年11月)

	平塚保健所	鎌倉保健所	藤沢保健所	小田原保健所	茅ヶ崎保健所	三崎保健所	秦野保健所	厚木保健所	大和保健所	足柄上保健所	津久井保健所	小計	衛生研究所	合計
取り扱い検査件数(海外渡航者)	563	269 (1)	373	1798	352	174	300	284	107	202	97	4519 (1)	11	4530 (1)
腸管出血性大腸菌	1			1								2		2
病原血清型大腸菌													1	1
サルモネラ O4群					2							2		2
サルモネラ O9群				1								1		1
カンピロバクター ジェジュニー	1											1		1
マイコプラズマ ニューモニエ													3	3

平成16年11月、ヒト由来の検体4,530件を検査した。

医療機関からの三類感染症患者発生届けに伴う患者家族検便を実施し、腸管出血性大腸菌が平塚保健所管内で1件(0157 *stx1,2*)、小田原保健所管内で1件(026 *stx1*)検出された。

検査定点より依頼のあった感染性胃腸炎患者から病原血清型大腸菌(血清型O1、*stx*遺伝子非保有)が1件検出された。

茅ヶ崎保健所で他県食中毒の関連調査でサルモネラO4群(血清型Typhimurium)が2件検出された。

小田原保健所で依頼検便からサルモネラO9群(血清型Enteritidis)が1件検出された。

平塚保健所で有症者からカンピロバクター ジェジュニーが1件検出された。

県内2病院からの咽頭ぬぐい液3件からマイコプラズマ ニューモニエが検出された。

表2 食品由来検査件数及び病原菌検出状況(検査材料取扱い機関別)

(平成16年11月)

	平塚保健所	鎌倉保健所	藤沢保健所	小田原保健所	茅ヶ崎保健所	三崎保健所	秦野保健所	厚木保健所	大和保健所	足柄上保健所	津久井保健所	小計	衛生研究所	合計
取り扱い検査件数	10	23	20	30	19	4	13	1	6	9	5	140	26	166
サルモネラ O4群					1							1		1

平成16年11月、食品由来の検体166件を検査した。

食中毒汚染実態調査の収去検査において茅ヶ崎保健所管内で、鶏挽き肉からサルモネラO4群(血清型Typhimurium)が1件検出された。

表3 環境由来検査件数及び病原菌検出状況(検査材料取扱い機関別)

(平成16年11月)

	平塚保健所	鎌倉保健所	藤沢保健所	小田原保健所	茅ヶ崎保健所	三崎保健所	秦野保健所	厚木保健所	大和保健所	足柄上保健所	津久井保健所	小計	衛生研究所	合計
取り扱い検査件数	12		1	8		2				12		35	45	80
O1 & O139以外のコレラ菌													1	1
レジオネラ ニューモフィラ 1群										1		1		1
レジオネラ ニューモフィラ 6群				1								1		1

平成16年11月、県内10定点の河川水腸管系病原菌調査から、O1 & O139以外のコレラ菌 1件が検出された。

レジオネラの検査では、足柄上保健所の検査で浴槽給湯口からニューモフィラ血清型1群が1件、小田原保健所の検査で公衆浴場水から血清型6群が1件検出された。

表4 ウイルス検出状況(月別)

(平成16年12月28日現在検出分)

検出ウイルス	平成15年計	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	平成16年累計
インフルエンザ A H 3	92	107	48	4									159
インフルエンザ B	27	1	2										3
パラインフルエンザ 3								1					1
R S												1	1
コクサッキー A 2								3					3
コクサッキー A 4	5							4	1				5
コクサッキー A 6	1						2	1					3
コクサッキー A 9							1						1
コクサッキー A 1 0	8												
コクサッキー A 1 2	9							1					1
コクサッキー A 1 6								3	2		2	2	9
コクサッキー B 1	4								2				2
コクサッキー B 2	1												
コクサッキー B 4									1				1
コクサッキー B 5									1				1
エコー 6	1								1				1
エコー 1 4	1												
エコー 1 8					2	1		4					7
エンテロ 7 1	6												
ムンプス	2				1								1
アデノ 1	1												
アデノ 2								1					1
アデノ 3	1					1	1	3			1	1	7
アデノ 4	3												
アデノ 4 0 / 4 1								1					1
アデノ(型未決定)	1												
ロ タ	10		1	2									3
小 型 球 形	25												
ノ 口	145	46	26	20	21		2		3		27	7	152
未 同 定	1							1	2				3
合 計	344	154	77	26	24	2	7	22	13	0	30	11	366

表5 ウイルス検出状況（疾患別）

（平成16年12月28日現在検出分）

疾患名 検出ウイルス	感 染 性 胃 腸 炎	手 足 口 病	ヘル パン ギー ナ	イン フル エン ザ 様	咽 頭 結 膜 熱	無 菌 性 髄 膜 炎	急 性 脳 炎	食 中 毒	そ の 他	合 計
取り扱い検査件数	1	4	1		1			9	3	19
RS									1	1
コクサッキー A16		2								2
アデノ 3					1					1
ノロ	1							6		7

平成16年11月、県域で食中毒様胃腸炎が1事例発生した。

食品1検体および便8検体について遺伝子検出法で検査したところ、患者および調理従事者の便6検体からノロウイルスが検出された。

発生動向調査の病原体検査定点からの依頼によるもの

感染性胃腸炎患者の便1検体から、遺伝子検出法によりノロウイルスが検出された。

手足口病患者の咽頭拭い液4検体から、コクサッキーウイルスA16型が2株分離された。

咽頭結膜熱患者の咽頭拭い液1検体から、アデノウイルス3型が分離された。

RSウイルス肺炎を疑う患者1名の咽頭拭い液から、遺伝子増幅法によりRSウイルス遺伝子が検出された。