

学会・研究会発表

公衆衛生関係 (全 国)

島根県における手足口病の原因ウイルス

木内郁代、飯塚節子、日野英輝

第 53 回日本臨床ウイルス学会 (平成 24 年 6 月 16 日～17 日 : 豊中市)

【背景と目的】

ヘルパンギーナの原因ウイルスとして知られていたコクサッキーウイルス A 6 (CA 6) による大規模な手足口病の流行が 2011 年に島根県で認められた。今回 CODEHOP VP1 RT-snPCR 法による遺伝子検出および RD-A 細胞による分離を試み、陽性株の分子疫学的解析を行ったので報告する。

【方法と材料】

手足口病を疑う 135 検体 (咽頭拭い液:122、糞便:12、髄液:1) について、エンテロウイルス (EV) の VP1 領域を対象とした CODEHOP VP1 RT-snPCR、Vero 細胞、RD-A 細胞、哺乳マウスによりウイルス検出を行った。CA 6 について VP1 領域 (約 300bp) の塩基配列を決定し系統樹解析を行った。

【結果】

CODEHOP VP1 RT-snPCR は 123 検体中 85 検体 (CA6:53、CA16:27、CA10: 2、E 3 : 2、CB4: 1) が PCR 陽性となった。Vero 細胞は、134 検体中 13 検体 (CA16:12、CB4: 1)、哺乳マウスは、75 検体中 36 検体 (CA 6 :28、CA16:7、CA10: 1)、RD-A 細胞は、128 検体中 51 検体 (CA 6 :30、CA16:15、CA10: 4、E 3 : 1、CB4: 1) が陽性となった。系統樹解析の結果より昨年流行した CA 6 は、2009 年の本県の分離株および 2008 年にフィンランドで流行した手足口病の株と高い相同性が認められた。

【結論】

CODEHOP VP1 RT-snPCR は高感度で EV の検出が可能である。しかし、シーケンスのための十分な遺伝子量が得られない検体もあり、他の検出方法との併用が必要であった。CA 6 のウイルス分離法として哺乳マウスの分離率が最も高かったが、RD-A 細胞でも分離が可能であった。今回大流行を起こした CA 6 の類似株は 2009 年にすでに本県に浸淫していた。

糞便に含まれるサルモネラ及びウェルシュ菌の DNA 抽出法に関する検討

川瀬 遵

第 53 回 島根県保健福祉環境研究発表会 (平成 24 年 7 月 13 日 : 松江市)
第 58 回 中国地区公衆衛生学会 (平成 24 年 8 月 24 日 : 岡山市)

1 序論

当所では、細菌検査の効率化と迅速な情報提供を行うために、食中毒菌の 24 標的遺伝子を一斉検出する迅速スクリーニング法 (RFBS24) を報告した。しかし、一部の食中毒菌については検出感度が低く、サルモネラなどについて検出できない食中毒事例もあったため、検出感度の向上が課題となっている。今回、糞便 DNA 試料の作製法として、従来から使用している界面活性剤を利用した方法とビーズ破砕を利用した方法を比較検討したところ、ビーズ破砕法は PCR 検査の感度向上に有効であることが明らかになったのでその概要を報告する。

3 材料と方法

3. 1 模擬糞便試料からの DNA の抽出 : ウェルシュ菌とサルモネラの菌液を添加した模擬糞便試料 200 μ l を作成した。これを界面活性剤による溶菌を利用し Q kit とビーズ破砕法を利用した M kit で処理した。Q kit は溶菌ステップを 70°C と 95°C 5 分間の条件で DNA 試料を作製した。M Kit のビーズ破砕は Vortex と Fastprep24 によるビーズ破砕を検討し、破砕スピード (4.0, 5.0, 6.5m/s) と時間 (20, 30, 40, 50, 60 秒) について条件設定を行った。なお、3. 3 の実験では、Qkit の 70°C 5 分間の溶菌ステップ後にビーズ破砕 (4.0m/s 60 秒) の工程を加えて DNA を抽出し、実験に使用した。

3. 2 リアルタイム SYBR Green PCR 法による Ct 値の測定 : Q kit と M Kit により作製された DNA 試料を用いて、サルモネラとウェルシュ菌の標的遺伝子を検出するリアルタイム SYBR Green PCR を行い、Ct 値の平均と標準偏差を求めた。

3. 3 リアルタイム PCR 法による標的遺伝子の定量 : Q kit (溶菌ステップ 70°C 5 分間、95°C 5 分間、70°C 5 分間の溶菌ステップ後にビーズ破砕を実施) と M Kit (破砕条件 : Fastprep24 4.0m/s 60 秒) により抽出された DNA 試料を用いて、リアルタイム PCR (Taqman probe 法) を行い、サルモネラとウェルシュ菌の標的遺伝子 copy 数を算出した。

3. 4 食中毒事例の検討 : 2010 年に発生したサルモネラ食中毒 1 事例の患者等の糞便から Q kit と M kit を用いて DNA 試料を作製し、RFBS24 キットを用いてリアルタイム PCR を行った。RFBS24 の結果と培養法の結果を比較検討した。

4 結果

4. 1 リアルタイム SYBR Green PCR 法による Ct 値測定 : 3. 1 で作製された DNA 試料について、リアルタイム SYBR Green PCR を行った。サルモネラについては、Mkit は Qkit より Ct 値が小さい傾向を示すとともに、Mkit のボルテックス処理と Fastprep24 処理 (4.0m/s 60 秒処理) はほぼ同等の Ct 値であった。ウェルシュ菌については、Mkit は Qkit より Ct 値が小さい傾向を示すとともに、Mkit の 4.0m/s 60 秒処理はボルテックス処理より Ct 値が小さかった。

4. 2 リアルタイム PCR による標的遺伝子の定量 : 3. 1 で作製された DNA 試料について、サルモネラとウェルシュ菌の標的遺伝子の定量を行った。サルモネラとウェルシュ菌の Mkit copy 数は Qkit の約 100 倍であった。Qkit において 70°C 5 分間の溶菌ステップ後にビーズ破砕を行った条件では、両菌種とも 70°C 5 分間処理よりも copy 数が増加した。

4. 3 RFBS24 による食中毒事例の検討及び Mkit と Qkit の性能評価 : 細菌検査結果は患者 4 人中 4 人、従事者 8 名中 3 名 (無症状) からサルモネラが分離された。RFBS24 の結果は Qkit の DNA 試料を用いた検査では患者及び従業員からサルモネラを検出することができなかった。Mkit の DNA 試料を用いた検査では患者 4 人中 3 人、従業員 8 名中 1 名からサルモネラを検出した。

5. 考察

Mkit は Qkit よりリアルタイム SYBR Green PCR で Ct 値が小さく、早いサイクル数で遺伝子の増幅曲線のたちあがり確認された。またリアルタイム PCR 法による定量で、Mkit は Qkit より copy 数が約 100 倍大きく、Qkit の溶菌工程にビーズ破砕を加えた場合においても copy 数が大きくなった。Mkit は Qkit より DNA 回収量が大きいと考えられるが、これは菌体をビーズ破砕することやその後の処理工程によるものと考えられた。サルモネラ食中毒事例については、Qkit の DNA 試料については患者、従業員ともサルモネラを検出することができなかったが、Mkit では患者 4 人中 3 人、従業員 8 名中 1 名からサルモネラを検出し、陽性率が向上した。このことから Mkit は DNA 回収量が大きく、RFBS24 の検出感度向上に有効な方法と考えられた。

糞便に含まれる食中毒原因菌の DNA 抽出法に関する検討

川瀬 遵

全国公衆衛生獣医師協議会平成 24 年度全国大会 (平成 24 年 9 月 7 日: 東京都)
平成 24 年度獣医学術中国地区学会日本獣医公衆衛生学会 (平成 24 年 9 月 30 日: 山口市)
平成 24 年度獣医学術学会年次大会 (日本獣医公衆衛生学会) (平成 25 年 2 月 9 日: 大阪市)

【はじめに】福島らは病因物質の早期推定による細菌培養検査の効率化と迅速な情報提供等を目的として、食中毒原因菌の 24 標的遺伝子を一斉検出する迅速スクリーニング法 (RFBS24II) を報告した¹。これは急性期の患者糞便 DNA 試料について、8 セットの Multiplex リアルタイム SYBR Green PCR 法を 96 穴 PCR プレート上でを行い、食中毒原因菌の 24 標的遺伝子を網羅的に検査する方法である。しかし、サルモネラなどで検出感度不足による細菌培養結果との不一致や従来から使用している界面活性剤を利用した DNA 抽出法はグラム陽性菌の DNA 回収率が低いことが課題となっている。そこで、DNA 試料の作製法として、従来法とビーズ破砕法を比較検討したところ、ビーズ破砕法は RFBS24 の検出感度向上に有用であることが明らかになったのでその概要を報告する。

【材料及び方法】1. ウェルシュ菌、黄色ブドウ球菌、サルモネラ、カンピロバクターを添加した模擬糞便試料から界面活性剤を利用した方法 (QIAamp DNA Stool mini kit: 以下 Q kit) とビーズ破砕を利用した方法 (Mobio UltraClean Fecal DNA Isolation Kit: 以下 M kit) により DNA を抽出した。Q kit は溶菌ステップを 70°C と 95°C 5 分間の 2 つ条件 (n=3) で行い、M Kit はボルテックスによる破砕 (10 分間) と細胞破砕機の Fastprep24 によるビーズ破砕を検討し、Fastprep24 については破砕スピード (4.0m/s, 5.0m/s, 6.5m/s) と時間 (20 秒~60 秒) について条件設定を行った (各条件につき n=3)。2. 1 の DNA 試料について、上記 4 菌種を検出するリアルタイム SYBR Green PCR 法を行い、条件ごとに Ct 値の平均と標準偏差を求めた。さらに、Q kit (溶菌 70°C と 95°C、70°C 5 分間の溶菌後にビーズ破砕) と M Kit (Fastprep24 4.0m/s 60 秒による破砕) により抽出された DNA 試料を用いて、Taqman Probe によるリアルタイム PCR 法を行い、4 菌種の標的遺伝子 copy 数を算出した。プライマーとプローブは既報で特異性が確認されたものを使用した。

3. サルモネラ食中毒 (4 事例、患者等 20 名) とカンピロバクター食中毒 (7 事例、患者 24 名) の患者などの糞便から Q kit と M kit を用いて DNA 試料を作製し、RFBS24II 及び RFBS24V (RFBS24II の改良版) により検査を行った。RFBS24II 及び RFBS24V の結果と直接分離培養法の結果を比較検討した。

【成績】1. リアルタイム SYBR Green PCR 法による Ct 値測定: 4 菌種の Mkit の Ct 値は Qkit より小さい傾向を示した。黄色ブドウ球菌の Mkit の Fastprep24 処理 (4.0m/s 60 秒処理) はボルテックス処理より Ct 値が小さい傾向を示したが、他の菌種ではほぼ同程度の Ct 値であった。

2. リアルタイム PCR 法による標的遺伝子の定量: 4 菌種の Mkit の copy 数は Qkit より大きい値を示した。その差はウェルシュ菌で 234 倍、黄色ブドウ球菌で 36 倍、サルモネラで 79 倍、カンピロバクターで 8 倍であった。Qkit において 70°C 5 分間の溶菌ステップ後にビーズ破砕を行った条件では、4 菌種とも copy 数が約 2~7 倍増加した。

3. サルモネラ食中毒: Qkit DNA 試料を用いた RFBS24II の結果は 1 名からサルモネラを検出し、Mkit DNA 試料の場合は 6 名から検出した。RFBS24V と Mkit を併用した結果では 11 名から検出し、直接分離培養法とほぼ同等の結果を得た。

4. カンピロバクター食中毒: Qkit DNA 試料を用いた RFBS24V の結果は 16 名からカンピロバクターを検出し、Mkit DNA 試料の場合は 19 名から検出した。Mkit は直接分離培養法よりも検出率が向上した。なお、直接分離培養法で陰性、RFBS24V でカンピロバクターが検出された患者 2 名について増菌培養を行ったところ、カンピロバクターが分離された。

【考察】ウェルシュ菌、黄色ブドウ球菌、サルモネラ、カンピロバクターについて検討した結果、ビーズ破砕法 (Mkit) は界面活性剤を利用した方法 (Qkit) より標的遺伝子量が大きく、グラム陽性菌だけでなくグラム陰性菌の DNA 抽出についても有用な方法であることが確認された。一部の菌種のみを検査結果であるが、ビーズ破砕法 (Mkit) は RFBS24 の検出感度向上に有用である可能性が示唆された。RFBS24 は、検出感度の改善により細菌培養結果との不一致が改善され、病因物質の早期推定、さらに抗生剤を服用した患者についても病因物質の推定が可能と考えられた。

【参考文献】

- 1) Fukushima, H. et. al.: Inter. J. Microbiol., volume 2010, article ID864817, 18 pages, 2010

改良した網羅的迅速遺伝子検査システム Rapid Foodborne Bacteria Screening 24 による食中毒事例等の検討

川瀬 遵

第 33 回日本食品微生物学会学術総会 (平成 24 年 10 月 25 日 : 福岡市)

【目的】福島らは病因物質の早期推定による細菌培養検査 (培養法) の効率化と迅速な情報提供等を目的として、Rapid Foodborne Bacteria Screening 24 (RFBS24II) を報告した¹⁾。これは急性期の患者糞便 DNA 試料について、8 セットの Multiplex リアルタイム PCR (インターカレーター法) を 96 穴 PCR プレート上でを行い、食中毒原因菌の 24 標的遺伝子を網羅的に検査する方法であるが、サルモネラなど一部の食中毒原因菌の検出感度不足などが課題となっていた。我々はこれらの課題を解決するために、プライマーの変更、競合内部増幅標準の導入や PCR 反応条件の検討を行い、RFBS24 を改良した (RFBS24V)。今回、食中毒事例等について RFBS24 で検査を行い、培養法と比較したので、報告する。

【方法】一般的な事例として、サルモネラ (3 事例 : 患者及び健康保菌者等 18 名)、カンピロバクター (7 事例 : 患者 24 名)、下痢原性大腸菌 (1 事例 : 患者 8 名) による食中毒等の事例や希少事例として、仮性結核菌の有症苦情事例 (1 事例 : 患者 5 名)、プレシオモナス・シグロイデスの食中毒事例 (1 事例 : 患者 5 名) について検討を行った。患者等糞便を PBS で 10 倍希釈し、市販の DNA 抽出キットで DNA を抽出した。これら DNA 試料を用いて、RFBS24II と RFBS24V で検査を行い、培養法の結果と比較した (仮性結核菌の事例は RFBS24V による検討のみ)。なお、RFBS24II の PCR 内部増幅標準は *Yersinia ruckeri* の DNA 及びその検出プライマー (非競合内部増幅標準) を使用した。培養法は 12 種類の選択分離培地を用いて患者便を塗沫培養し (直接分離培養)、定法に従って、食中毒原因菌の分離・同定を行った。

【結果及び考察】サルモネラの事例では、RFBS24II で 5 名、RFBS24V で 9 名からサルモネラが検出された。RFBS24V は患者について培養法と同等の結果を得た。カンピロバクターの事例では、RFBS24II で 15 名、RFBS24V で 19 名からカンピロバクターが検出され、RFBS24V は培養法と同等以上の結果を得た。なお、直接分離培養で陰性、RFBS24V でカンピロバクターが検出された患者 2 名について増菌培養を行ったところ、カンピロバクターが分離された。下痢原性大腸菌の事例は、RFBS24II で培養法と同等の結果を得ることができなかったが、RFBS24V では *astA* 遺伝子、*aggR* 遺伝子、*ST* 遺伝子等が検出され、培養法と同等以上の結果を得た。仮性結核菌とプレシオモナスの事例は RFBS24V で培養法と同等の結果を得た。今回、検討した範囲では、RFBS24V は検出感度の改善により、培養法と概ね同等の結果を得ることができ、病因物質の早期推定に有用な方法と考えられた。今後は更に事例検討を追加し、培養法と同等の結果を得ることが可能か確認する必要がある。

1) Fukushima, H. et. al.: Inter. J. Micro-biol., volume 2010, article ID864817, 18 pages, 2010

パンソルビン・トラップ法による食品からのノロウイルス遺伝子の検出

—弁当屋を原因施設としたノロウイルス集団食中毒事例から—

飯塚節子、斎藤博之¹⁾、田中智之²⁾、野田衛³⁾

1)秋田県健康環境センター、2)堺市衛生研究所、3)国立医薬品食品衛生研究所

第60回日本ウイルス学会学術集会(平成24年11月13日～15日：大阪市)

【目的と意義】食品検体からの高感度ノロウイルス (NoV) 検出法として開発されたパンソルビン・トラップ法(パントラ法)は改良を重ね、検出した NoV 遺伝子のシーケンス解析が可能になったが、実際の食中毒事例への適用はこれからである。今回、弁当屋を原因施設とし患者数 300 名以上となった食中毒事例において原因食品と推定された弁当から本法を用いて NoV 遺伝子を検出しシーケンス解析を実施したので報告する。

【材料と方法】2012年3月17～19日に原因施設で製造された弁当を喫食し発症した5グループ12名の患者便、原因施設の調理従事者23名中18名のふん便、3月20日、26日の施設のふき取り材料各10検体、3月17～19日の弁当4種類を検査材料とし、NoV 遺伝子の検出を行った。検査方法はふん便検体はTaqManリアルタイムRT-PCR法による。ふき取り検体は市販ふき取り検査キットに採取されたふき取り液約8mlにbeef extract(最終濃度0.5%)を添加後PEG沈殿で濃縮しNoVを回収、RNA抽出後random primerでcDNAを合成し、COG1F/G1SKRまたはCOG2F/G2SKRでconventional PCRを行い、PCR産物をリアルタイムPCR法で再増幅した。食品検体は弁当毎に食品約10gに分け、パントラ法でNoVを回収、RNA抽出後PANR-G1またはPANR-G2プライマーでcDNAを合成し、ふき取り検体と同様にconventional PCR後、リアルタイムPCR法で再増幅した。リアルタイムPCR法で陽性となった検体についてconventional PCRまたはnested PCRを行い、陽性バンドが確認された検体はダイレクトシーケンス法で塩基配列を決定した。

【結果と考察】患者12名中12名、調理従事者18名中6名からNoV GII/4が検出された。拭き取り検体は3月20日の1検体(調理済み食品用バット)からNoV GII/4が検出された。食品はA弁当(3/17)、B弁当(3/17)、C弁当(3/18)、D弁当(3/19)中の7検体がリアルタイムPCRで陽性となった。このうちの3検体(B弁当：オレンジ、C弁当：オレンジ・唐揚げ、D弁当：唐揚げ・フライ)がnested PCRで明瞭なバンドが認められシーケンス検査の結果、2検体がGII/4、1検体がGII/2であった。検出されたGII/4株のCapsid領域300bpの塩基配列は、患者、従事者、オレンジ・唐揚げ由来の19株、拭き取りとオレンジ由来の2株はそれぞれ100%一致、両者の間では2塩基異なっていた。パントラ法と新たに開発された逆転写用プライマーは実際の食中毒での食品検査に有用であった。

公衆衛生関係 (県 内)

県内に流通しているウズラ卵のサルモネラによる汚染状況について

川上 優太

平成 24 年度島根県食品衛生監視員研究発表会 (平成 25 年 2 月 15 日 : 松江市)

【目的】ウズラ卵によるサルモネラ食中毒予防の一助とするため、i) 県内流通するウズラ卵のサルモネラによる汚染状況、ii) ウズラ卵殻におけるヒビの有無、iii) サルモネラのウズラ卵殻への侵入と消長について調査したので報告する。

【方法】i) ウズラ卵 10 個入り 1 パックを 1 検体とし、県内で流通量の多い 3 GP センター A、B、C のウズラ卵 (A:42 検体、B:28 検体、C:39 検体、計 112 検体) を破碎し、直接培養及び増菌後分離培養を行い、分離菌株について菌種の同定を行った。

ii) 肉眼や実体顕微鏡では観察できないウズラ卵殻のヒビが、暗所で可視光を照射することで確認できることが判明した。ヒビはサルモネラの侵入性に関連があると考えられることから、この方法によりウズラ卵殻のヒビの有無を調査した (A:390 検体、B:320 検体、C:389 検体、計 1099 検体)。

iii) 以下の方法で 3 回繰り返して実施した。i) の結果からサルモネラ汚染の可能性が低いと考えられる B のウズラ卵殻のヒビの有無を確認し、ヒビの認められたウズラ卵、認められなかったウズラ卵、それぞれ 10 個を 10^7 個/ml オーダーのサルモネラ菌液 (平成 22 年度の食中毒事例で分離されたサルモネラ: *Salmonella enterica* 4 : i : -) に浸漬後、乾燥させ、8℃で、一定期間保管した後にヒビの認められたウズラ卵、認められなかったウズラ卵各 2 個ずつを試験に供した。検体はウズラ卵を生理食塩水で洗浄した洗浄液、洗浄後の卵を 200ppm 次亜塩素酸 Na で殺菌した後無菌的に吸い出した中身、残った殺菌済みのウズラ卵殻に生理食塩水を加え破碎したもの 3 種類とし、直接培養及び増菌後分離培養を行い、サルモネラと思われるコロニーが認められた場合には 04 群であることを確認した。

【結果・考察】今回の調査で 30% 近くのウズラ卵殻にヒビが確認され、光で確認できない微小なヒビがある場合、サルモネラは卵殻、更に卵内部にまで侵入し、一度ヒビに侵入すると次亜塩素酸 Na での殺菌は困難であることが分かった。またウズラ卵はサルモネラを始め、数種の細菌に汚染されており、8 度程度の冷蔵保管をしても、サルモネラが生残したことから、ウズラ卵にはサルモネラ食中毒となるリスクが一定程度あると考えられ、サルモネラは $10^1 \sim 10^4$ 個の摂取でも発症する可能性がある¹⁾ ため、幼児や高齢者等抵抗力の低い人は生での喫食は避けるべきである。

1) 食品由来感染症と食品微生物, 中西寿男・丸山務監修, 中央法規, p154-17 (2009)