分子生物学的手法を用いた有害微生物の疫学解析に関する研究

貞升 健志³, 向川 純ʰ, 長島 真美°, 森 功次°, 千葉 隆司°, 山本 宣和ʰ, 吉田 勲°, 原田 幸子° 宗村 佳子°, 永野 美由紀°, 木本 佳那°, 高橋 由美¹, 林 志直°, 甲斐 明美¹ 新開 敬行ʰ, 秋場 哲哉°, 平井 昭彦ਖ

東京都健康安全研究センターの重点研究の一つとして平成24年度~平成26年度の3箇年で実施した,「分子生物学的手法を用いた有害微生物の疫学解析に関する研究」の概要を報告する。本研究では様々な遺伝子学的手法を用い、従来より実施されている病原体の血清型や薬剤感受性に基づく型別・同定からさらに踏み込んだ、詳細かつevidence-basedな型別法の検討を主な目的とした。具体的には、結核菌、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)、ノロウイルス(NoV)・サポウイルス(SaV)およびカビ・酵母類を中心に検討し、①有害微生物の遺伝子学的同定、②株レベルでの比較、③広域に渡る感染事例に対応できる精度(データベース化を含む)、④検出感度の向上を主な目標とした。

結果として、結核菌においてはシーケンサーを利用した24領域のVNTR型別とそのデータベース化により広域感染での応用が可能になった。HIVについてはサブタイプ型のみならず、薬剤耐性関連変異を分子マーカーとして使用することで、流行の解析に役立つことが示唆された。さらに、NoVの2ndリアルタイムPCRにおける検出感度の向上には1st PCR産物の希釈が有効であること、平成25年の集団胃腸炎事例から検出されたSaVは多くがGI.2型であることが明らかになった。また、カビ・酵母においても、カビ毒産生株の型別や汚染調査への応用に分子疫学的解析が極めて有用であることが示された。

キーワード: 結核菌、HIV, ノロウイルス、サポウイルス、酵母、カビ、遺伝子解析、塩基配列、PCR、VNTR

はじめに

東京都健康安全研究センターの重点研究として,平成24年度から26年度の3箇年で,「分子生物学的手法を用いた有害微生物の疫学解析に関する研究」を実施した.本研究課題では様々の遺伝子学的手法を用い,従来より実施されている病原体の血清型や薬剤感受性に基づく型別・同定からさらに踏み込んだ,詳細かつevidence-basedな型別法の検討を主な目的とした.具体的には,①有害微生物の遺伝子学的同定,②株レベルでの比較,③広域に渡る感染事例にも対応できる精度(データベース化を含む),④検出感度の向上を主な目標とした.

本研究は4つの個別研究課題で構成され、それぞれの個別研究課題と担当者は以下のとおりである.

- 1. 分子疫学的手法を用いた結核菌の疫学解析に関する研究(向川 純)
- 2. ヒト免疫不全ウイルス (HIV) の分子疫学解析に関す る検討(長島真美)
- 3. ノロウイルス等による食中毒事例の感染経路解明に関する検討(秋場哲哉,森 功次)
- 4. 微生物に起因する食品苦情の分子生物学的手法を用い

た解析 (千葉隆司)

個別研究課題ごとの研究内容と成果の概要

1. 分子疫学的手法を用いた結核菌の疫学解析に関する 研究

日本における結核患者は戦後減少傾向にあるものの,大都市圏における患者数の減少傾向は鈍化している。その原因として,従来型の感染者集団のみならず,大都市ならではの生活環境や習慣,複雑な交通手段等での感染形態の存在が考えられている。このような状況下での結核患者発生時には,従来の接触者調査は十分に機能するとはいえない。そこで,新たな結核菌株レベルでの型別が可能な分子疫学的手法を用い,型別法を検討するとともに,東京都における結核菌のデータベースを構築した。データベースを基にクラスタ解析することにより都内の結核蔓延状況を調査し,感染経路や流行状況解明のための科学的データを保健行政の現場に提供することを本研究の目的とした。

1) 結核菌のVNTR型別

都内で分離され、当センターに搬入された結核菌株について、多重反復配列(Variable Numbers of Tandem Repeat

- a 東京都健康安全研究センター微生物部 169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1
- b 東京都健康安全研究センター微生物部病原細菌研究科
- ^c 東京都健康安全研究センター微生物部ウイルス研究科
- d 東京都健康安全研究センター微生物部食品微生物研究科
- 東京都健康安全研究センター企画調整部健康危機管理情報課

: VNTR) 法での遺伝子型を調べ、菌株レベルでの分類を 給討した

千葉県衛生研究所で設計された蛍光プライマーセット (24種類) を参考に¹⁾, 当センターで改良を加え,都内で 分離された結核菌株を解析・分別するために必要なVNTR 法の検出系を検討した.

菌株を分別するのに必要最少限のVNTR領域24ヶ所を選定し、これらを正確に検出できるPCR反応系を確立した²⁾. 検出されたPCR産物をDNAシークエンサーを用いてフラグメント解析(分子量測定)を行ったところ、従来のアガロースゲル電気泳動法では分子量が大きいため誤差が生じやすい高反復数(高分子量)の領域についても正確な反復数を測定でき、精度の高い検出系が確立できた.

行政検査において,金曜日の夕方搬入され従来法

(RFLP法)では菌数が少なく検査できなかった検体の遺伝子型別検査が、VNTR検査を実施することで、月曜日の朝には結果報告が可能であったことなど、従来法では対応できなかった緊急検査依頼に応じることが可能となった.

平成24年9月からこの蛍光プライマーセットを使用したPCR法とシークエンサーを用いたVNTR法を日常の行政検査に応用し、平成27年3月までに800株以上を解析し、結果を保健所並びに感染症対策課に報告した。また遺伝子解析データ並びに分離地域、患者発生状況、薬剤感受性等の菌情報をデータベース(Excelファイル)に登録した。以前のアガロースゲル電気泳動法での結果と合わせると844株以上のデータがデータベースに蓄積された(平成26年度末)。

2) データベース化と疫学解析への応用

新たに発生した感染事例由来の分離株について、その遺伝子情報をデータベースと照合し、過去の株との近縁度を比較した. さらに、データベースに蓄積された各株の遺伝子のクラスタ形成を解析することで、クラスタ形成集団の属性とクラスタの規模から都内における結核菌蔓延状況の調査に使用した.

解析ソフトを用いてVNTR24領域が95%以上一致する菌株集団 (クラスタ) の解析を実施したところ,図1に示すように注目すべきクラスタが5つ明らかになった.

最大クラスタ1はストレプトマイシン耐性のいわゆるM株と呼ばれる株である(60株以上:解析した総菌株の7.3%). これらの株は毎年都内各地から分離され,同じ遺伝子型にもかかわらず,異なる感染事例であり患者接触歴は認められない. そのため,これらの株は遺伝子構造が安定で昔から都内各地に定着し小規模感染を起こしてきたことが推定された.

次に大きなクラスタ2は31株(3.7%)で、平成14年の集団感染事例から5株分離され、その後都内各地から様々な場所で分離されている。これと同一の遺伝子型株が15株、それらと1領域のみ異なる株が16株あった。

クラスタ3は24株 (2.8%) で,集団感染事例として平成 22年から25年にかけて分離された株20株と,これらとまっ たく同じ遺伝子型の株で近接地域で平成17年に分離された 2株、平成25年に分離された2株が含まれる.

クラスタ4は20株(2.3%)で、平成17年から18年にかけて都内各地で8株分離され、平成21年には多摩地区の集団感染事例として9株分離された株である.

クラスタ5は20株(2.3%)で、薬剤感受性試験を実施した株はすべてINHとSMの両薬剤に耐性であり、毎年のように都内各地から検出されている.

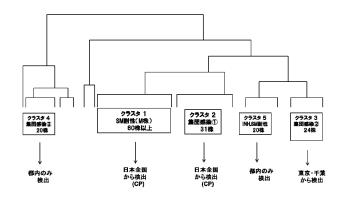


図1. 都内結核菌株のクラスタ解析 (VNTR)

3) 首都圏における結核菌株の蔓延状況

首都圏における当該結核菌株の蔓延状況を明らかにする 目的で、他の地方衛生研究所(千葉県)と連携し、東京都 並びに各地で分離された株について各クラスタの比較を行った.

クラスタ1については日本各地から多数の同一遺伝子型の株が分離されており、まったく接触関係がない場合でも同一の遺伝子型の株が各地域で小規模感染を起こしていることが推定された。クラスタ2についても、都内各地や他の地域からも分離され、各地に共通に存在する遺伝子型の株であると推定された。

クラスタ3は集団感染事例より分離され、同じ遺伝子型の株が首都圏では千葉県でも検出されているが、他の地域からは検出されていない。クラスタ4は都内のみ、クラスタ5はINHとSMの両剤耐性株であるが、都内のみから分離されている。

日本各地で共通に検出されるcommon profile (以下CP) という遺伝子型の株が存在することが推定され、このCP は出現しやすい遺伝子型の株であり、このCPが含まれる クラスタは疫学的関連性が証明されないと同一菌による感染かどうか判断できない. 一方で、都内と千葉共通に分離されCPではないクラスタも複数存在し、このようなクラスタの存在が明らかになった場合については、関連地域が疫学情報を持ち寄って検討していくことが必要と考えられた.

これまで結核の分子疫学としてVNTRを用いる報告は数 多いが^{3,4)},共通に出現するCPを除外して本当に疑わしい ものだけを選別して検討・情報交換することで、首都圏で 発生した結核感染の真の蔓延状況が把握できるものと考え られる.

2. ヒト免疫不全ウイルス (HIV) の分子疫学解析に関する検討

東京都における新規のヒト免疫不全ウイルス(HIV)感染者数およびエイズ患者数は効果的な解決策が見出させぬまま、都内におけるHIVのさらなる感染拡大が懸念されている.

都内におけるHIV感染者数を減少に転じさせるためには、 従来のサブタイプ型だけではなく、株レベルでの型別方法 を新たに検討し、薬剤耐性変異の解析や検討した型別方法 を用いた、HIVの流行状況等の疫学解析が重要となる.

そこで、主として系統樹解析を用いたHIVの解析法を改良・開発し、都内におけるHIVの遺伝子学的特徴および浸淫状況を明らかにすることを本研究の目的とした.

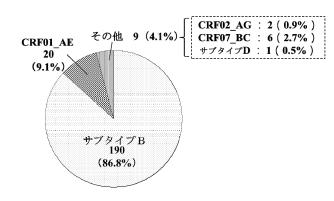


図2. HIVのサブタイプ解析(東京都)

1) HIV検査陽性例のサブタイプおよび薬剤耐性関連変 異の解析

平成24年度から平成26年度までに東京都南新宿検査・相談室等を受診し、東京都健康安全研究センターにて行った HIV検査陽性例219件を対象とした.

分子系統樹解析を実施しサブタイプ型別をおこなったところ,190例(86.8%)がサブタイプB,20例(9.1%)がCRF01_AE,2例(0.9%)がCRF02_AG,6例(2.7%)がCRF07_BC,1例(0.5%)がサブタイプDに分類された(図2).

プロテアーゼ (PR) 領域, 逆転写酵素 (RT) 領域およびインテグラーゼ (IN) 領域について遺伝子解析を実施し, 薬剤耐性関連変異の有無を調べた.

PR領域では、PR阻害剤の変異であるM46Lのアミノ酸変 異が3例、D30DN、M46I、M46IM、M46V、Q58Eの変異が 1例ずつ単独で認められ、1例でM46LとQ58Eのアミノ酸変 異を同時に持つ例が認められた(4.1%).

RT領域では、核酸系RT阻害剤のアミノ酸変異である M41Lのアミノ酸変異が1例、複数のアミノ酸変異を同時 に持つ例(M41L+L210W+T215D)が1例認められた (0.9%). また、非核酸系RT阻害剤のアミノ酸変異である V108IV、V108I、K103N、G190AGのアミノ酸変異が1例 ずつ単独で認められ、複数のアミノ酸変異を同時に持つ例

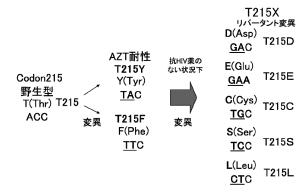


図3. リバータント変異 (T215X) のメカニズム

(K103N+V108IV) が1例認められた (3.2%).

2) 分子マーカーを用いたHIV識別法

T215-revertant (T215X) は、過去に使用されていた抗 HIV薬のAZT等の特有の変異である215番目のアミノ酸変 異 (T215Y, T215F) が薬剤の非存在下で、T以外のアミノ酸に変化した変異を総称しており (図3)、T215-revertant そのものはAZT耐性に作用しない.

今回の調査では、複数のアミノ酸変異を持っていた1例のほかに、4例でT215Xが認められた(T215C:1例、T215I:1例、T215L:1例、T215S:1例). また、調査以来はじめてIN阻害剤のアミノ酸変異が認められた(T66I:1例).

M41L+L210W+T215Dの変異を持った株の遺伝子配列を,一般公開されているデータベースを用いて解析したところ,平成23年に神奈川県および都内の医療機関から報告された株と99.9%一致した.

過去に検出されたT215X (RT領域)を対象に系統樹解析をおこなった結果,系統樹上で大きく3つのクラスタに分類された. T215Xを含む感染集団は様々な形で存在しており,T215X等の薬剤関連変異を足ががりにした調査が有効な場合があることが示唆された.

(倫理面の配慮)

本研究は遺伝子解析研究に関する倫理指針等の倫理規定に準拠して実施した.本研究は個人が特定できるようなデータを含まない病原体の解析を目的とした研究であり、東京都健康安全研究センター倫理審査委員会において承認を受けている(24健研健第1014号,27健研健第511号決定)

3. ノロウイルス等による食中毒事例の感染経路解明に 関する検討

近年多発するノロウイルス(Norovirus:NoV)やサポウイルス(Sapovirus:SaV)等による食中毒事例では、感染源(原因施設)を特定するために、調理従事者や患者に由来するウイルスの遺伝子解析(塩基配列の比較)が行われている。しかしながら、異なる食中毒事例であっても解析領域によっては塩基配列が一致する場合も多い。また、食品

や拭き取り材料のノロウイルス汚染量は微量のため、検体からの検出率は非常に低く、また検出された場合においてもウイルスが微量であるため遺伝子解析できないものも多い。そこで、本研究ではNoVおよびSaVの食中毒事例における感染経路及び感染源の解明に資するために、食品や拭き取り検体から検出された微量なウイルスの遺伝子検出の向上やウイルスの感染経路解明に使用される遺伝子領域の変異の傾向(経年変化)を検討した。

1) NoV 2ndリアルタイムPCRにおける検出感度の向上

NoV検査においては、リアルタイムPCRを用いた検査手法が広く利用されている。同検査で弱陽性反応を示した試料については、より高感度な2ndリアルタイムPCR等で確認検査を実施しているが、増幅せず判定保留とせざるを得ない場合がある。その理由として、プライマーの不適合以外に、1回目のPCR産物量が過多となり、リアルタイムPCR反応が阻害されている事が考えられた。そこで、1回目のPCRの反応回数を減少させること、PCR産物を滅菌蒸留水で10倍に希釈させたものを試料とすることで、検出感度の向上が認められた。

2) SaVに起因する胃腸炎に関する検討

SaVはNoVと比較すると発生件数は少ないものの食中毒事例を含め集団胃腸炎の起因ウイルスである。平成22年~24年には年間15~20事例と一定数の集団胃腸炎事例からSaVが検出されていた。平成25年は2~5月にかけ東京都では例年の同時期より多い17事例からSaVが検出されたことから検出株について解析を行った。

(1) SaVの検出および遺伝子型の解析 集団胃腸炎事例の病原検索を目的として搬入された糞便試料を供試した. SaVの検索はViral RNA mini kit (QIAGEN) によるRNA抽出後,逆転写反応ののちにOkaら⁵⁾のreal-time PCR法により検出を試みた. SaVが検出された試料についてはOkadaら⁶⁾のconventionalなPCR法を用いた増幅および塩基配列解析による型別を行った.

塩基配列解析の結果,平成25年2~5月にかけて集団胃腸炎事例から検出されたSaVはGII.1の1事例を除き,16事例がGI.2に型別された.検出されたSaVGI.2はいずれも Kecskemet/HUN3739/2008株(FJ844411)と近縁であった.検出株に近縁なSaVGI.2は、すでに平成21年2月に東京都で検出されていたが、2009~12年にかけての検出事例数はそれぞれ3、2、18、9事例であった.増加傾向のみられた平成23年~平成25年に検出されたSaVで、Katayamaら 7 の方法により増幅可能であった7株のVP1、VP2領域について既知の株の塩基配列解析を実施したところ、Aichi2010株 (AB607855)と比較して抗原構造に関わるVP1領域に共通して1ヶ所のアミノ酸変異がみられた.

- (2) 不顕性感染者におけるSaV SaVの不顕性感染者が 検出された2事例について発症者16件,不顕性感染者12件 の糞便中のウイルス遺伝子量を比較したところ, p=0.808 で両群に有意差はみられなかった.
 - (3) SaV集団胃腸炎の感染経路と今後のSaV対策 表1に

示すように平成25年2月~5月にかけて検出された集団胃腸 炎において推定される感染経路は生カキの喫食のほか、調 理従事者の関与が推定される事例、施設内や家庭内での感 染症的な集団胃腸炎の発生などNoVと同様の感染経路によ り発生していることが示唆された. また前述のようにSaV の不顕性感染者が糞便中に排出しているウイルスの量は発 症者と有意差がなく、これまでに報告してきた⁸⁾NoVと同 様の傾向を示した.これらの結果によりSaVの感染様式は NoVと同一であることが確認できた. そのためSaV胃腸炎 の予防および拡大防止対策にはNoVに対する対策が適用で きると考えられる. ただし、現状としては民間検査機関で のSaV検査実施状況や簡易キットの市販状況から、NoV以 上に調理従事者対策を重視する必要があると考えられた. 実際に調理従事者由来の大規模SaV食中毒も発生しており 9), 体調不良時の従事制限などについての認識をこれまで 以上に周知をはかる必要があると思われた.

表1 SaVが検出された集団胃腸炎事例 (東京都,平成25年2月~5月)

	()(0)(1)(1)	1 /9/225 27 3	5/1/
事例	発生時期	発生場所	推定感染源
A	2 月	保育園	施設内流行
В		高齢者施設	施設内流行
C		家庭内	生カキ
D		飲食店	不明
Е	3 月	家庭内	生カキ
F		高齢者施設	施設内流行
G		中学校	不明
Н		家庭内	不明
I		家庭内	不明
J	4 月	飲食店	生カキ
K		飲食店	調理従事者
L		仕出し	調理従事者
M		飲食店	生カキ
N		高齢者施設	施設内流行
О		仕出し	不明
P	5 月	家庭内	不明
Q		保育園	施設内流行
		•	

3) 胃腸炎ウイルス高感度検出法に関する検討

ウイルス性胃腸炎の検査において、食品材料における高感度化は推定原因食品や感染経路の検索において重要である。食品材料においてはカキ等二枚貝類に対しamylase処理など試料に応じた有効な前処理方法が示されている。さらに高感度なウイルス検出目的として、逆転写反応に続いてcDNAを増幅するSPIA(Single Primer Isothermal Amplification)法について検討を行った。

(1) 培養上清を用いた検討 Murine Norovirus(MNV) S7 株の培養上清について希釈列を作製し、各希釈段階におけるSPIA法の効果について比較した。 すなわち、High Pure Viral RNA kit (Roche)を用いてRNAを抽出し、Ovation Pico WTA System V2 (Takara/NuGEN)添付の試薬および指定の温度条件を用いて逆転写反応によるcDNA合成, 二本鎖 cDNA合成, SPIA反応によるcDNA増幅をそれぞれ実施した. 得られたcDNAはUltrafree-DA (Merck-Millipore)により精製し, random primerによる逆転写試薬であるHigh Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Life Technologies)を用いて合成したcDNAとともにreal-time PCR法により定量し, 増幅効率を比較した.

random primerにより合成したMNV培養上清由来のcDNA 希釈列の定量値 $1.8\times10\sim9.1\times10^5$ (copies/ μ L)に対し,SPIA 反応を用いたcDNAは $3.3\times10^2\sim1.9\times10^7$ (copies/ μ L)と検出値が向上した。反応に用いたRNA1 μ Lあたりの計算値は random primer法が $7.3\times10\sim3.6\times10^5$ (copies),SPIA法が $1.6\times10^3\sim9.4\times10^7$ (copies)であった.

- (2) **糞便乳剤を用いた検討** NoV GIおよびGIIを含む糞便乳剤をMNV培養上清同様に希釈列を作製し、SPIA法による効果の比較を試みたところ、1000倍希釈以降で検出値の向上がみられた. それ以前の希釈段階においてはSPIA 法を用いないrandom primerを用いた系の方か高い検出値であった. 試料が希釈されていく1000倍以降で両法の検出値が逆転していることから、糞便中に含まれる物質によりSPIA反応と一連の反応が阻害されたものと考えられた.
- (3) カキ乳剤を用いた検討 カキ中腸腺の乳剤からウイルスを検出するための前処理方法としてamylaseによる消化法が知られている. そこで,カキ中腸腺乳剤にMNV培養上清を添加したのちに希釈列を作製し,両法の比較を試みた.最も検出値が高値となったのは,amylase処理後にSPIA法によるcDNA増幅を組み合わせた場合であった.amylase処理なしにSPIA法で増幅を試みた場合,前処理なしの測定値より低値となった.

以上の結果から、SPIA法は微量なウイルス遺伝子を増幅できる有効な方法と考えられた.しかし、糞便乳剤やカキ乳剤の検討結果にみられるように、反応には阻害物質の存在が大きく影響すると思われた.本法は試薬単価が高価ではあるが、試料に適した前処理を実施することで本反応系を有効に作用することが可能になると推定される.

4. 微生物に起因する食品苦情の分子生物学的手法を用 いた解析

食品の安全性を微生物学的な側面から確保するには、食品苦情の原因となる微生物(危害菌)を特定した上で、それぞれの特性を踏まえた対策が必要となる.しかし、従来の方法は危害菌の特定において長期間の培養や煩雑な操作が必要であり、特性解析に必要な株レベルの識別では高い専門的な知識・技術が要求されていた.このような問題を解決するため、近年、客観性や再現性、迅速性等の面で優れている分子生物学的な手法が用いられるようになり、従来の方法では対応が難しかった死滅菌等や難培養菌への応用も期待されている.

そこで、微生物に起因する食品苦情について、塩基配列

解析法等の分子生物学的手法を利用した危害菌(主に真菌)の検出・同定方法を検討するとともに,抗菌剤への抵抗性や毒素産生性の有無等,株レベルでの識別方法や特性解析への利用を検討した.また,検討した手法について,客観性や再現性,迅速性等の観点から,既存の試験法(形態観察,発育温度等の生理学的特性等)と比較を行った.さらに,クラスタ分析等を用いて汚染経路の推定や危害菌の分布等,食品汚染事例の解析に利用し,実用性を確認した.

1) 分子系統樹を用いたPenicillium属菌の解析

Penicillium属(アオカビ)は、食品苦情事例からの分離 頻度が高く、カビ毒産生菌等、ヒトや動物へ危害を示す菌種が多く含まれている。今回、特に形態鑑別が難しい Glabra系とCoronata節のPenicillium属菌を対象に、真菌の解析に広く用いられているrRNA遺伝子の2領域(D1/D2及びITS:約550~600bp)と β -チューブリン遺伝子の部分領域(Bt2:約450bp)を対象に分子系統樹を作成し、比較した。その結果、

①Bt2領域を用いた解析において、それぞれの菌群の識別に適度な進化距離が得られた。この結果に基づき、 Penicillium属菌に汚染された食品苦情事例にBt2の解析を利用することができた。

②ミネラルウォーターの事例では、優勢菌種として分離された真菌が*Glabra*系の*P. glabrum*であることが判明し、本菌が苦情起因菌と推定された.

③輸入チョコレートの事例では、複数のCoronata節菌に汚染されていることが判明し、汚染菌はP. brevicompactum eventoral <math>eventoral eventoral eventoral

2) 特異PCRによる酢酸エチル産生酵母の迅速検出

酵母は既存の同定方法では培養に要する時間がかかるうえ、死滅菌には対応できない。そこで、酢酸エチル産生酵母Pichia anomalaを対象に、迅速検出に資する分子マーカーの検索を行った。その結果、

- ①P. anomalaの塩基配列解析を行い、ピルビン酸脱炭酸酵素1遺伝子(PDC1)とITS1 領域に設計したプライマーによるマルチプレックスPCRを検討し、良好な結果を得た.
- ②P. anomalaを含む53株の酵母を対象に集落から直接PCRを行うコロニーPCR法による迅速検出を行った結果、供試したP. anomala全株を特異的に検出することが可能であった.

③検討した方法をP. anomalaが原因と疑われる食品苦情に利用したところ、死滅している状態でも本菌を検出することが可能であった.

3) 分子系統解析を利用した食品苦情汚染源の推定

未開封の市販生うどんで発生した異物事例(死滅菌)について、rRNA遺伝子の2領域(D1/D2 及びITS)を用いた塩基配列解析法による原因菌の同定と分子系統樹解析を利用した株識別による汚染源推定を試みた。その結果、

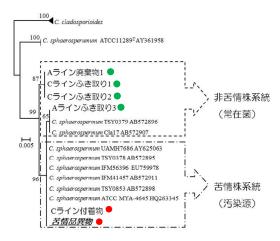


図4. 分子系統樹解析を利用した食品汚染事例の解析

①異物から直接DNAを抽出し、塩基配列解析法を用いた同定を行った.この結果、異物はクロカビの一種である Cladosporium sphaerospermumの菌塊であることが判明した.

②苦情起因菌の汚染源を特定するために工場内のふき取り調査を実施した結果、異物と同菌種の真菌が多数分離された.しかし、本菌は自然界に広く分布する菌種であるため、本事例の汚染源推定には、苦情原因菌と常在菌を株レベルで識別する必要があった.そこで、分子系統樹解析による株識別を行った結果、工場内のC. sphaerospermumは苦情原因株が含まれる系統とそれ以外の常在菌の2系統に区別された(図4).また、苦情原因株と同系統のC. sphaerospermumが製造ライン最上流部に認められ、本部位が汚染源の1つである可能性が示唆された.

4) PCRを利用した苦情起因酵母の迅速検出

和菓子で発生した異味・異臭の苦情事例について,原因 究明のために検討したPCRによる酢酸エチル(シンナー 臭)産生酵母*P. anomala*の迅速検出を試みた.その結果,

- ①培養検査により、苦情品、参考品とも多数かつ複数種 の酵母が分離された.
- ②検討したコロニーPCR法を用いた結果,分離された酵母の中から効率的に*P. anomala*を検出した.
- ③同店舗の別ロット品について再度,真菌検査を実施した結果,同様に*P. anomala*が検出された.また,この製品について保存試験を行った結果,シンナー臭の生成が確認され,本菌が苦情原因であると推定された.

5) オクラトキシンA (OTA) 産生菌に関する検討

OTAは、ヒトや家畜の腎臓・肝臓などに毒性を示すカビ毒であるため、OTA産生菌の検出や分布・動態の把握は食の安全確保に重要である.しかし近年、これまで主要なOTA産生菌とされてきたA. ochraceusグループが再編され、新たな検出系の開発が望まれている.そこで当センターで保存していた25株のA. ochraceusグループについて分子生物学的な解析を行い、表現性状と合わせた簡易識別を検討した.

その結果, ① β -tubulin 領域の分子系統樹解析では, 供 試株はA. westerdijkiae (19株) , A. ochraceus (4株), A.





従来法 (ディスク拡散法)

F200Y アミノ酸変異の確認

図5. 防カビ剤 (TBZ) 抵抗性の確認 (表現性状を用いた従来法と分子生物学的な解析)

melleus (2株) の3グループに識別され, *A. westerdijkiae* グループの株のみOTAを産生した.

②表現性状として37℃での発育を確認した結果, A. westerdijkiae グループの全株は発育せず, 他の2グループの全株は発育した.

③OTAを産生するA. westerdijkiaeを識別するには, β -tubulin 領域の分子系統解析と37℃での発育を確認する方法が有用であることが示唆された.

6) チアベンダゾール (TBZ) 抵抗性Penicillium digitatum の解析

都内で発生する食品苦情のうち、市場に流通している青果物で発生する市場病害への対策が重要になっている。その対策の一つとして、TBZなどの防カビ剤が収穫後の農産物に使用されているが、諸外国を始め、本剤に抵抗性を示す株の出現が指摘されている。そこで、東京都内の青果市場を対象にTBZ 抵抗性株の分布を調査した。その結果、

①青果市場内の真菌汚染調査ではカンキツ緑カビ病菌 (P. digitatum) が落下真菌検体,かんきつ類検体,清掃用タオル検体から高頻度に検出され,本菌が市場内を広く汚染していることが判明した.

②P. digitatumを対象にTBZへの抵抗性を確認した結果,ディスク拡散法では供試22株中16株が抵抗性を示した(図5). また,これらの株について β -tubulin領域を解析した結果,全てのTBZ抵抗性株で200番目にTミノ酸の変異(F200Y)が見られた.

③市場内で分離されたP. digitatumのF200Y変異からTBZ抵抗性を推定した結果,分離株の70.4%がTBZに抵抗性を有すると考えられた.

総 括

今回、3年間の研究期間内で、「分子生物学的手法を用いた有害微生物の疫学解析に関する研究」を実施した。本研究では様々の遺伝子学的手法を用い、結核菌、HIV、腸管系ウイルス(NoV、SaV)およびカビ・酵母類について検討した。

結核菌においてはシーケンサーを利用した24領域の VNTR型別を行政検査に導入し、800株以上のデータベー スを作成している.これらの解析によって、一部のプロフ ァイル型を除き、型別が可能であり、東京都特有のクラス タも存在していることが明らかになった. HIVについてはサブタイプ型のみならず、薬剤耐性関連変異を分子マーカーとして使用することで、地域を超えた流行の解析に役立つことが示唆された.

NoV, SaVは都内の感染性胃腸炎事例の多くを占めており、検査法については希釈法、SPIA法を含めてさらに改善の余地があることが示された.

カビ・酵母においては、カビ毒産生株の型別、汚染調査に分子疫学的解析が極めて有用であり、マルチプレックスPCRや塩基配列解析を使い分けることで行政検査での活用が示された.

4課題を中心に、細菌、ウイルス、真菌で検討を行ったが、当初の目的は概ね達成できたと言える。既に行政検査に活用している部分、全国的な研究に応用している部分もある。行政ニーズに対応した検査体制の基盤としての活用に向けて、今後もさらに研究を継続していく予定である。

文 献

- 1) Yokoyama, E., Kishida, K., Uchimura, M., et al.: Infect.. Genet.Evol.7,499-5087, 2007.
- 2) 向川 純, 山本宣和, 平井昭彦他: 東京健安研セ年報, **65**, 41-46, 2014.
- 3) 和田崇之, 長谷 篤:結核, 85,845-852,2010.
- 4) 岩本朋忠, 藤山理世, 白井千香, 他:結核, **85**, 411, 2010.
- 5) Oka T., Katayama K, Hansman G.S., *et al.*: *J med Virol.* **78**, 1347-1353, 2006.
- 6) Okada M., Yamashita Y., Oseto M., et al.: Arch Virol. **151**, 2503-2509, 2006.
- 7) Katayama K., Shirato-Horikoshi H., Kojima S., *et al.* : *Virology*. **259**, 225-239, 2002.
- 8)森 功次,林 志直,佐々木由紀子,他:感染症誌, 79,521-526,2005.
- 9) 小林慎一,藤原範子,水谷恵美,他: *IASR*, **31**, 322-323, 2010.

発表 実績

- ・三宅啓文,向川 純,貞升健志,他:結核疑い患者に おけるクォンティフェロンTBゴールドとELISPOT法の 比較検討,第87回日本結核病学会総会(広島),2012.
- ・ 貞升健志,向川 純,山本宣和,他:大都市圏における分子疫学調査の有効性に関する研究,地域における 効果的な結核対策の強化に関する研究班報告書,223-227,2014.
- ・ 向川 純,山本宣和,平井昭彦,他:平成23年度から 25年度に搬入された薬剤耐性結核菌の遺伝子型解析と 薬剤感受性パターン,東京健安研セ年報,**61**,41-46, 2014.
- ・ 長島真美,宮川明子,新開敬行,他:東京都におけるHIV検査数と陽性例の解析,病原微生物検出情報, 34,254-255,2013.

- ・ 川畑拓也, 長島真美, 貞升健志, 他: HIV急性感染期の診断における第4世代迅速検査試薬の性能評価, 感染症誌, 87, 431-434, 2013.
- 長島真美,新開敬行,貞升健志,他:東京都内の公 的検査機関におけるHIV検査数の解析(2007-2011年), 第26回日本エイズ学会学術集会・総会(横浜),2012.
- 長島真美,新開敬行,貞升健志,他:2007年~2011年 の東京都内におけるHIV陽性例の解析,第26回日本エイズ学会学術集会・総会(横浜),2012.
- ・ 椎野禎一郎,服部純子,長島真美,他:国内感染者 集団の大規模塩基配列解析3:希少サブタイプとサブ タイプ間組み換え体の動向,第26回日本エイズ学会 学術集会・総会(横浜),2012.
- ・ 長島真美, 宮川明子, 新開敬行, 他:東京都における HIV検査陽性例より検出されたT215X-revertantの解析, 第27回日本エイズ学会学術集会・総会(熊本), 2013.
- ・ 重見 麗, 長島真美, 杉浦 亙, 他:新規HIV/AIDS 診断症例における薬剤耐性HIVの動向, 第27回日本エ イズ学会学術集会・総会(熊本), 2013.
- ・ 川畑拓也,長島真美,貞升健志,他:HIV急性感染期の診断における第4世代HIV迅速検査試薬エスプラインHIV Ag/Abの性能評価,第27回日本エイズ学会学術集会・総会(熊本),2013.
- ・ 椎野禎一郎,服部純子,貞升健志,他:国内感染者集団の大規模塩基配列解析4:サブタイプと感染リスクによる伝播効率の差異,第27回日本エイズ学会学術集会・総会(熊本),2013.
- ・ 長島真美,新開敬行,貞升健志,他:東京都内公的検査機関におけるHIV検査数および陽性例の解析(2008年と2013年の比較),第28回日本エイズ学会学術集会・総会(大阪),2014.
- ・ 岡﨑玲子,長島真美,杉浦 亙,他:新規HIV/AIDS 診断症例における薬剤耐性HIVの動向,第28回日本エ イズ学会学術集会・総会(大阪),2014.
- ・ 椎野禎一郎,服部純子,貞升健志,他:国内感染者集団の大規模塩基配列解析5:MSMコミュニティへのサブタイプB感染の動態,第28回日本エイズ学会学術集会・総会(大阪),2014.
- 永野美由紀, 秋場哲哉, 森 功次, 他: 2ndリアルタ イムPCRを用いたノロウイルス陽性確認方法に関する 検討, 東京健安研セ年報, 65, 47-51, 2014.
- ・ 森 功次,宗村佳子,林 志直,他:東京都において 集団胃腸炎事例から検出されたSapovirusについて,第 61回日本ウイルス学会学術集会(神戸市),2013.
- ・ 森 功次, 宗村佳子, 林 志直, 他: サポウイルスに よる集団胃腸炎事例について, 第107回日本食品衛生 学会学術講演会(東京), 2014.
- 森 功次,宗村佳子,林 志直,他:ウイルス性胃腸 炎検査におけるSPIA(Single primer isothermal amplification)法導入に関する検討,第35回日本食品微

- 生物学会学術総会(堺市), 2014.
- ・ 高橋由美, 千葉隆司, 上原さとみ, 他: 市販輸入チョコレートの微生物検査とチョコレートから分離した Penicillium brevicompactumについて, 日本防菌防黴学会第39回年次大会(東京), 2012.
- ・ 千葉隆司,高橋由美,仲真晶子,他:コロニーダイレクトPCR法を用いた酢酸エチル産生酵母Pichia anomala検出法の検討,第103回日本食品衛生学会学術講演会(東京),2012.
- 高橋由美,千葉隆司,仲真晶子,他:和菓子から分離 した酵母に関する検討,日本防菌防黴学会第40回年次 大会(大阪),2013.
- ・ 高橋由美,千葉隆司,仲真晶子,他: Aspergillus ochraceusグループの分子生物学的解析とオクラトキシンA産生に関する検討,日本防菌防黴学会第41回年次大会(東京),2014.
- ・ 千葉隆司,高橋由美,仲真晶子,他:かんきつ類から 分離したPenicillium digitatumとP. italicumの防カビ剤 抵抗性と分子生物学的解析,第107回日本食品衛生学 会学術講演会(東京),2014.
- ・ 千葉隆司,高橋由美,高野伊知郎,他:東京都内青果市場での真菌汚染とチアベンダゾール抵抗性 Penicillium digitatum の解析,日食微誌,32,54-59, 2014.
- 千葉隆司,高橋由美,木下輝昭,他:分子生物学的手法を用いた真菌による食品苦情原因の解析,東京健安研セ年報,65,107-112,2014.

Epidemiological Analysis of Pathogenic Microorganisms Using Molecular Biological Techniques

Kenji SADAMASU^a, Jun MUKAIGAWA^a, Mami NAGASHIMA^a, Kohji MORI^a, Takashi CHIBA^a, Nobukazu YAMAMOTO^a Isao YOSHIDA^a, Sachiko HARADA^a, Yoshiko SOMURA^a, Miyuki NAGANO^a, Kana KIMOTO^a, Yumi TAKAHASHI^a Yukinao HAYASHI^a, Akemi KAI^a, Takayuki SHINKAI^a, Tetsuya AKIBA^a and Akihiko HIRAI^a

The present study was a project performed at the Tokyo Metropolitan Institute of Public Health for three years (from 2012 to 2014). In these studies, for in-depth analysis, evidence-based classification was preferred over current classifications to distinguish bacterial serotypes, specifically of *Mycobacterium tuberculosis*, human immunodeficiency virus (HIV), norovirus (NoV), sapovirus (SaV), fungi, and yeast. The main goals were to establish methods to distinguish pathogenic microorganisms based on comparisons at the strain level and improve the precision (using databases) and sensitivity of detection. VNTR analysis based on 24 loci in *M. tuberculosis*, sequence-based drug resistant mutation and subtyping of HIV subtyping, and sequence analysis of fungi and yeast were found to be suitable for molecular epidemiological analysis. For NoV, detection by a second round of real-time PCR using dilutions of the first round PCR products was important for the sensitivity of detection. SaV isolates detected from gastrointestinal cases in 2013 were classified by GI.2.

Keywords: molecular biological technique, mycobacterium tuberculosis, human immunodeficiency virus, norovirus, sapovirus, fungi, yeast, VNTR, sequence analysis

Tokyo Metropolitan Institute of Public Health,
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan