

# 微生物保健担当

## 1 業務の概要

微生物保健担当は主としてヒトの食中毒及び感染症に関わる細菌、ウイルス、原虫・寄生虫等の病原微生物に関する試験・検査、調査・研究業務を行っている。

### (1) 行政依頼検査及び調査・研究

食中毒及び感染症発生時における原因微生物、感染経路の解明及び感染拡大防止のための行政検査、ならびに貸しおしぼりや食品衛生法による各種食品の微生物規格試験等を大阪市健康福祉局、教育委員会など関連部局より依頼を受け、実施している。

また、食中毒や感染症の予防対策に寄与するために大阪市保健所感染症対策担当及び健康福祉局健康推進部生活衛生担当からの受託研究を実施している。

### (2) 感染症発生動向調査事業

国の感染症発生動向調査事業の一環として、感染症発生時に市内医療機関からの検体を検査し、病原体検出情報を保健所に提供している。

### (3) 一般依頼試験

食品等の微生物検査、食品取り扱い者等の保菌検査、及び消毒薬などの殺菌効力試験等を実施している。

### (4) 行政依頼以外の調査・研究等

文部科学省科学研究費補助金、厚生労働省科学研究費補助金等の助成研究の他、国立感染症研究所、府立公衆衛生研究所をはじめとする地方衛生研究所、大学等との共同研究に参加し、病原微生物の検出法や解析手法の開発、病原性の解明、疾病発生メカニズムの解明等の課題に取り組んでいる。

## 2 試験・検査業務

### (1) 食中毒事例の原因調査

平成20年1月から12月までに食中毒、有症苦情などで当担当に検体が搬入された事件は170事例であった。これらに関連した検体数は、患者及び関係者の検便及び吐物が1,332件、食品・ふきとりなどが542件で、計1,874件であった。170事例のうち75事例

(44.1%)において下痢原性微生物が検出された。図2-2-1に示すように75事例のうちノロウイルスが検出された事件が38事例(51%)、カンピロバクターが20事例(27%)、サルモネラ属菌が9事例、黄色ブドウ球菌4事例、ウェルシュ菌2事例、セレウス菌1事例、腸管出血性大腸菌O157が1事例であった。このうち大阪市内における細菌あるいはウイルス性食中毒事件として厚生労働省に届けられた事件数は26件であった。

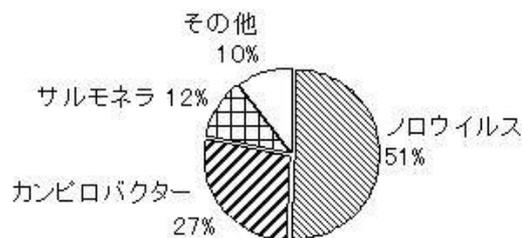


図2-2-1 検出された下痢原性微生物

### (2) 三類感染症菌の検査

平成20年において、大阪市内で届出のあった三類感染症(腸管出血性大腸菌感染症、細菌性赤痢、腸チフス、コレラ、パラチフス)を表2-2-1に示した。

腸管出血性大腸菌感染症は66事例(患者65名、保菌者15名、死者なし)あり、集団事例はなかった。80件中77件で腸管出血性大腸菌が分離され、血清型はO157が71株、O26が3株、O91が1株、O121が2株であった。3件は抗体検査でO157と推定された。発生時期は通年であり、夏季の8月(20件)、9月(14件)にピークがあった。発生件数は平成19年まで5年連続して増加していたが、本年は昨年(188件)に比べ半減した。集団事例発生がなかったのが原因のひとつと考えられる。志賀毒素(Stx)型はO157では、Stx1&2が49件(69.0%)、Stx2が22件(31.0%)であった。O26、O91はStx1産生性、O121はStx2産生性であった。感染源は例年通り、牛肉類、内蔵類の生食が原因と推測される事例が多かった。

他の三類感染症については、細菌性赤痢9件、腸チフス4件、パラチフス1件であった。コレラの発生はなかった。細菌性赤痢はいずれも散发事例で、輸入事例は4、不明5であった。分離赤痢菌の血清型は *S. sonnei* が7株(いずれも phase I)、*S. flexneri* が1株、*S. boydii* (2型) が1株であった。腸チフスは輸入事例4件、不明1件、パラチフスは輸入事例で1件であった。輸入事例の推定感染地域のほとんどはインド、インドネシアなどの東南アジア地域であった。

表2-2-1 平成20年度大阪市における三類感染症の発生状況

類型	感染症名	発生件数
三類感染症	腸管出血性大腸菌感染症	80(0)* <sup>1</sup>
	細菌性赤痢	9(6)* <sup>2</sup>
	腸チフス	4(4)
	パラチフス	1(1)

( )内は輸入症例。

\*1:分離腸管出血性大腸菌(77株)の血清型別株数  
O157:H7, 71株、O26:H11, 1株、O26:H-, 2株  
O91:H-, 1株、O121:H19, 1株、O121:HUT, 1株

\*2:分離赤痢菌の血清型別株数  
S. sonnei phase I, 7株、S. flexneri, 1株、S. boydii 2型, 1株

### (3) 衛生行政に関する食品細菌検査

この業務は、健康福祉局健康推進部生活衛生担

当からの依頼により、市内保健所管内において取去された試料について、「食品衛生法」に基づいて行われたものである。

検査を実施した食品、件数、検査項目は表2-2-2に示した。検査を実施した食品のうち、食肉加工品2検体から黄色ブドウ球菌を、ゆで麺1検体から黄色ブドウ球菌を、生食用かき1検体からノロウイルスをそれぞれ検出した。

### (4) 学校給食用食品に関する業務

学校給食用食品について細菌検査を委託するに当たり、クロスチェックのために以下の54検体について細菌検査を行った。

鶏肉17件について、サルモネラ属菌、腸管出血性大腸菌O157の検査を行い、4検体からサルモネラ属菌を検出した。牛肉10件、牛挽肉7件、豚肉13件、

表 2-2-2 検査を実施した食品及び検査項目

食品名	件数	検査項目
牛乳・加工乳	6	生菌数、大腸菌群、低温細菌
乳飲料・乳等を主原料とする食品	3	生菌数、大腸菌群
育児用粉乳	3	生菌数、大腸菌群、黄色ブドウ球菌、セレウス菌
アイスクリーム類・氷菓	10	生菌数、大腸菌群
ゆで麺	4	生菌数、大腸菌群、黄色ブドウ球菌(1検体陽性)
生めん等	4	生菌数、大腸菌、黄色ブドウ球菌
非加熱食肉製品	8	生菌数、大腸菌、黄色ブドウ球菌、クロストリジウム属菌、サルモネラ属菌、リステリア菌、腸管出血性大腸菌 O157
食肉加工品	8	生菌数、大腸菌、黄色ブドウ球菌(2検体陽性)、クロストリジウム属菌、サルモネラ属菌、リステリア菌、腸管出血性大腸菌 O157
特定加熱食肉製品	4	生菌数、大腸菌、黄色ブドウ球菌、クロストリジウム属菌、サルモネラ属菌、リステリア菌、腸管出血性大腸菌 O157
加熱後包装食肉食品	19	生菌数、大腸菌、黄色ブドウ球菌、クロストリジウム属菌、サルモネラ属菌
包装後加熱食肉製品	3	生菌数、大腸菌群、黄色ブドウ球菌、クロストリジウム属菌、サルモネラ属菌
液卵・鶏卵・うずら卵	10	生菌数、大腸菌群、黄色ブドウ球菌、サルモネラ属菌、カンピロバクター
生食用鮮魚介類	12	生菌数、腸炎ビブリオ(最確数)、腸管出血性大腸菌 O157
ゆでだこ	1	生菌数、腸炎ビブリオ、腸管出血性大腸菌 O157
発酵乳・乳酸菌飲料	10	乳酸菌数、大腸菌群
魚肉練り製品	15	生菌数、大腸菌群、黄色ブドウ球菌
気密性容器包装食品	3	クロストリジウム属菌
加熱後摂取(直前加熱)冷凍食品	6	生菌数、大腸菌群、黄色ブドウ球菌、腸球菌
加熱後摂取(直前未加熱)冷凍食品	3	生菌数、大腸菌、黄色ブドウ球菌、腸球菌
無加熱摂取冷凍食品	1	生菌数、大腸菌群、黄色ブドウ球菌、腸球菌
バター・マーガリン・プロセスチーズ	11	生菌数、大腸菌群
ナチュラルチーズ	12	生菌数、大腸菌群、リステリア菌
生食用かき	11	生菌数、大腸菌最確数、腸炎ビブリオ最確数、腸管出血性大腸菌 O157、ノロウイルス(1検体陽性)、A型肝炎ウイルス

豚挽肉7件について、腸管出血性大腸菌O157の検査を行った(表2-2-3)。また教育委員会の依頼により中学校昼食用弁当19件について生菌数、大腸菌群及び黄色ブドウ球菌、粉チーズ1件についてリステリアの検査を行った。

表2-2-3 学校給食用食品の細菌検査(クロスチェック)

食品名	件数	検査項目	陽性件数
鶏肉	17	腸管出血性大腸菌O157	0
		サルモネラ属菌	4
牛肉	17	腸管出血性大腸菌O157	0
豚肉	20	腸管出血性大腸菌O157	0
計	54		

### (5) 貸しおしぼりの衛生基準試験

健康福祉局健康推進部生活衛生担当からの依頼により、市内25施設を対象に11月、2月の2回にわたって計154件について貸しおしぼりの衛生基準に関する試験を行った。1回目(11月)の検査については、6施設16検体が指導基準不適合品であった。1回目の成績に基づいて指導を受けた6施設について2回目(2月)の検査を行い、全施設の製品が適合となった。

表2-2-4 おしぼりの細菌検査

	1回目(平成20年11月実施)	
	指導基準適合	指導基準不適合
施設数	19	6
	2回目(平成21年2月実施)	
	指導基準適合	指導基準不適合
施設数	6	0

### (6) 浴槽水、噴水などのレジオネラ属菌検査

患者発生時の感染源調査などのために、健康福祉局などからの依頼を受け、レジオネラ属菌検査を行った。市内の公衆浴場施設など8施設より採取した浴槽水、温泉水など29検体についてレジオネラ属菌検査を行った結果、浴槽水4検体から*Legionella pneumophila* SG1、SG6、*Legionella micdadei* が検出された。

### (7) 一般依頼による試験・検査業務

#### ア 糞便検査

赤痢菌 193件、腸チフス・パラチフス菌 88件、腸管出血性大腸菌O157 201件、サルモネラ 196件、コレラ菌 9件、計687件の糞便検査を行った。また、菌株

のペロ毒素遺伝子検査(PCR)1件を行った。

#### イ 殺菌効力試験

消毒薬の殺菌効力試験の依頼はなかった。

#### ウ その他の検査

食品等の細菌検査15件を行った。

表2-2-5 一般依頼検査の検査項目と検査数

検査項目	検査数(件)
糞便検査	687
赤痢	193
腸チフス・パラチフス菌	88
腸管出血性大腸菌O157	201
サルモネラ	196
カンピロバクター	0
コレラ菌	9
腸炎ビブリオ	0
寄生虫卵	0
ペロ毒素遺伝子検査	1
殺菌効力試験	0
その他の検査	15
食品等の細菌検査	15
おしぼりの衛生基準試験	0

### (8) 感染症サーベイランス事業にもとづくウイルス検査

平成20年1月から12月の間に、検査を行った検体総数は868件であった。ウイルス陽性数は415件で、陽性率は47.8%であった。陽性率は昨年の41.1%から6.7%上がった。分離・検出されたウイルスは226株であり、29件から複数のウイルスが分離・検出された(表2-2-6)。分離・検出されたウイルスの中で、ノロウイルスが最も多く、103株(G I 型17株、G II 型86株)で全体の45.6%を占めた。次いでインフルエンザウイルスが、60株(AH1型34株、AH3型22株、B型4株)で全体の26.5%を占めた。当研究所と大阪府立公衆衛生研究所並びに堺市衛生研究所で検出された結果を併せて解析し、大阪府内のウイルスの動向を感染症発生動向調査事業報告書にまとめているが、検出ウイルスからみた大阪府内の流行の特徴は以下に示す。

月別・疾患別検体数とウイルス陽性例数を昨年と比較すると、検体総数は229件(35.2%)増加し、ウイルス検出陽性率も2.0%増加した。検体数の増加は、感染性胃腸炎、下気道炎、無菌性髄膜炎等の検体数

が増加したことによる。一方、昨年度大きな流行のみられた麻疹の今年度の検体数は減少した。

疾患別検体数は感染性胃腸炎(478件、全体の23.6%)が最も多く、以下、下気道炎(316件、15.6%)、インフルエンザ(232件、11.4%)、無菌性髄膜炎(231件、11.4%)の順であった。感染性胃腸炎の月別検体数は、11月と12月の2カ月間で全体の28.2%、1月と2月の2ヶ月間で26.8%を占め、この時期の原因ウイルスはノロウイルスがほとんど(11、12月は、82.8%、1、2月は、86.9%)であった。なお、その他の原因ウイルスは、検出数の少ない7、8月を除いてロタウイルス、アデノウイルス、サポウイルス、アストロウイルスなど多彩なウイルスが検出された。下気道炎の検体数は、4月から6月の3ヶ月間で全体の35.8%を占めた。下気道炎の主な原因ウイルスとしては、パラインフルエンザウイルス3型、RSウイルスなどが検出された。インフルエンザの検体数は、12月(92件)が最も多く、次いで1月(57件)、11月(37件)の順であった。

2007/2008年シーズンは流行が小さく、1月は57件であった。2008/2009シーズンは、流行が早く、12月の検体数が多かった。検出ウイルスは、1月から4月まではAH1 亜型(Aソ連型)が32件、B型が8件、とAH1亜型の流行であった。9月から12月はAH3亜型が50件、B型が19件、AH1亜型が14件で、AH3亜型を主とする流行であった。

無菌性髄膜炎は7月が42件、8月が37件、6月が34件と夏季に多く見られた。その原因ウイルスとしては、コクサッキーウイルスB5型が24件、エコーウイルス30型が23件と、それぞれ全体の陽性数の29.1%を占めた。麻しんは5月が16件、6月が17件、7月が15件と初夏に多く見られ、遺伝子型別をされたものではD5型が13件、D4型が2件検出された。

検出ウイルス数はノロウイルスが最も多く、183件であった。そのうち G II 型が157を占めた。次に多かったのはエンテロウイルスで136件検出され、コクサッキーウイルス B5型が33例、エコーウイルス30型が31例

表2-2-6 平成20年に大阪市内で分離されたウイルス

ウイルス	分離 検出数	型
ノロウイルス	103	GII-86、GI-17
インフルエンザウイルス	60	AH1 型-34、AH3 型-22、B 型-4
パラインフルエンザウイルス	56	3 型-40、1 型-9、2 型-7、
RS ウイルス	45	
ライノウイルス	21	
アデノウイルス	20	2 型-6、1 型-3、7 型-2、31 型-2、40/41 型-2、 未同定-2、5 型、6 型、8 型
エコーウイルス	16	30 型-8、6 型-2、9 型-2、5 型、11 型、18 型、71 型
ヒトボカウイルス	17	
コクサッキーB 群ウイルス	15	5 型-8、3 型-3、2 型-2、4 型-2、
ヒトメタニューモウイルス	15	
ロタウイルス	9	A 群-9
コクサッキーA 群ウイルス	5	16 型-3、4 型-2
デングウイルス	5	3 型-2、1 型、2 型、4 型、
単純ヘルペスウイルス	5	
アストロウイルス	4	
ポリオウイルス	3	2 型-2、3 型
サポウイルス	3	
ムンプスウイルス	1	
HHV6	1	
ヒトパレコウイルス	1	

と多かった。インフルエンザウイルスは125例検出され、AH3亜型が最も多く52例で、AH1亜型46例、B型27例であった。RSウイルスも108例検出された。

年齢別ウイルス陽性数において、最も多くウイルスが検出されたのは0歳で222例であり、RSウイルスが58例と最も多く検出された。次いでエンテロウイルスの48例であった。ポリオウイルスは、1型3例、3型2例と5例検出されたが、ワクチン接種の影響と考えられた。年齢別で次に多かったのは1歳の175例であった。1歳からの検出ウイルスで最も多かったのはノロウイルス51例で、このうちGⅡ型が48例であった。その他の年齢では、ノロウイルス、インフルエンザウイルス、エンテロウイルスなどが主に検出された。平成20年度は平成19年度にみられた麻疹の大きな流行はなく、各年齢の麻疹ウイルスの検出例も少なかった。

検体の種類とウイルス陽性例数については、検体数が最も多かったのは糞便(664件、全体の32.8%)、以下、鼻汁・鼻腔拭い液(393件、19.4%)、咽頭拭い液(391件、19.3%)、髄液(238件、11.7%)が多かった。検体数の多かった糞便、鼻汁・鼻腔拭い液、咽頭拭い液、髄液のウイルス検出率の50.0%(332/664)、咽頭拭い液が33.0%(129/391)であった。一方髄液は16.0%(38/238)であり、陽性率は低かった。なお、喀痰・気管吸引液、陽性率78.7%(78/99)、うがい液40.8%(51/125)などの検体も陽性率が高かった

### (9) 抗HIV抗体確認試験

平成20年1月から12月までに保健衛生検査所にて一次スクリーニング試験で HIV 抗体陽性と判定された血清61検体について、HIV 抗体の確認試験を行った結果、51検体から HIV-1抗体が認められた。

## 3 調査・研究業務

### (1) 結核菌の分子型別とそれを用いた分子疫学

#### ア 広域分子疫学の試み

大阪市内分離菌株('01年一般患者由来株:253株、'02-'04年ホームレス患者由来株:284株)、及び神戸市内分離菌株('02-'04年一般患者由来株:235株)の解析結果から、全母集団で共通して見られた菌株によって構成された VNTR(23)クラスターは9種類(A-I)あり、クラスターサイズは3から13であった(表2-2-7)。JATA(12)-VNTR解析で見られた巨大クラスター(クラスターサイズ:30~40)は消え、実際の結核菌伝播による患者群が検出されているものと推察される。いずれのクラスターも大阪市一般患者、大

阪市ホームレス患者、神戸市一般患者を含むため、何らかの感染経路が存在するものと考えられ、それぞれの地域での患者情報の交換も含めた調査が必要と考えられる。

表 2-2-7 大阪市、神戸市で見られた共通クラスター

クラスター	クラスターサイズ	菌株由来		
		大阪市一般	大阪市ホームレス	神戸市一般
A	3	1	1	1
B	4	1	2	1
C	4	2	1	1
D	4	1	2	1
E	6	1	4	1
F	6	1	2	3
G	8	2	3	3
H	9	1	7	1
I	13	1	9	3

### イ 結核集団感染事例における結核菌DNA解析

感染源及び感染経路解明のために、保健所感染症対策担当より依頼のあった28事例、65菌株について、JATA(12)-VNTR解析を行った。一部の菌株については、関連地研あるいは医療機関から VNTR 解析データが提供された。解析結果は事例ごとに保健所感染症対策担当に報告し、感染源及び感染経路の解明に役立てた。

### ウ 市内で分離された外国人患者由来結核菌株のDNA解析

本年度に市内で分離された外国人由来菌株15株についてJATA(12)-VNTR解析を実施した。中国籍患者由来の4菌株中3株が中国国内で多く見られるタイプ(新興型北京株)であった。一方、韓国、東南アジア国籍患者由来菌株は非北京型が多く、また北京型も祖先型の菌株が多かった。しかしながら、まだ対象株数が少なく、さらにデータを蓄積することと、詳細な患者情報を付加させることにより、市内における外国人結核感染実情を菌株レベルから解析できるものと考えられる。

### (2) 大阪市内のホームレスを中心とした結核蔓延状況の分子疫学的解析

複数の医療機関との連携により、大阪市在住の結核患者由来菌株を当研究所に回収し、VNTR型別を

行った。本年度は主に3医療機関から集められた平成18年度結核患者株(計369株)についてゲノムDNAを抽出し、JATA(12)－VNTR解析に基づいたデータの集積を行った。この株数は、同年度における結核菌陽性患者(PCR陽性含む)のおよそ40%にあたり、協力医療機関・保健所との連携拡張によってより網羅的に菌株の回収を行う必要がある。VNTR型別データは今後継続的に蓄積され、複数年度にわたる結核菌株の分布パターン、伝播ルートの推定、危険株の抽出などに供される予定である。

### (3) 感染症発生時における病原菌の分子疫学的調査

平成20年度に保健所感染症対策担当からの依頼で実施した解析事例は3事例で、解析菌株は赤痢菌が6株、腸管出血性大腸菌O157が3株、レジオネラ菌が10株、計19株であった(表2-2-8)。解析結果は保健所感染症対策担当に報告し、感染源及び感染経路の解明に役立てられた。

表2-2-8 分離菌株のPFGE解析事例

解析事例	解析菌株数
事例1	赤痢、6株
事例2	O157、3株
事例3	レジオネラ、10株

### (4) 既製食品の汚染源追跡調査：一乳児用調製粉乳中でのエンテロバクター・サカザキの生残－

エンテロバクター・サカザキ(*Enterobacter sakazakii*, 以下Esと略す)は、通性嫌気性のグラム陰性桿菌で、ヒトや動物の腸管内、環境中に広く存在している。本菌は新生児や乳幼児に重篤な敗血症、壊死性腸炎や脳潰瘍、髄膜炎を引き起こす。乳児用調製粉乳(Powdered Infant Formula、以下PIFとする)は、菌数は低レベルであるものの広くEsに汚染されており、PIFを介したEsの感染例が実際に報告されている。そこで本研究では、市販のPIFにEsを添加し、厚生労働省のガイドラインに示されている70℃、電気ポットの調乳モードである60℃と37℃、90℃の水でミルクを調整し、PIF中のEsの生残について調べた。その結果、10<sup>6</sup>cfu(ミルク100mlあたり)のEsは90℃の温水を使用した場合、速やかに検出限界以下になった。70℃では4.3～9.3×10<sup>2</sup>、60℃では2.4×10<sup>4</sup>～2.4×10<sup>5</sup>(ミルク100mlあたりのMPN値)のEsが生残した。37℃では菌数の減少は認められなかった。わが国のガイドラインで示されている70℃での調乳ではEsは完全に死滅し

ないことがわかった。免疫不全児などリスクの高い乳児を対象とする場合は商業的滅菌済みのミルクを使用するか、90℃以上の温水で調乳することが望ましい。

### (5) マルチプレックスPCR法による食中毒由来ウエルシュ菌の解析

ウエルシュ菌食中毒は、本菌が腸管内で産生するエンテロトキシンによって引き起こされる。近年、エンテロトキシン遺伝子(*cpe*)周辺領域についての詳細な解析が行われ、マルチプレックスPCR法によって*cpe*の型別(染色体型、プラスミド*cpe-IS1470*型、プラスミド*cpe-IS1151*型)を行うことが可能となった。そこで、平成8年～20年の間に大阪市内の食中毒原因調査で*cpe*保有ウエルシュ菌が検出された15事例について疫学状況の調査を行うとともに、95株の患者由来菌株についてマルチプレックスPCR法を用いた型別及びPFGE法による系統解析を行った。その結果、大阪市内においてもプラスミド型の*cpe*保有ウエルシュ菌による食中毒の発生が確認され、近年プラスミド型がその主流であることがわかった。染色体型とプラスミド型で食中毒の発生状況や患者の症状に違いは認められなかった。プラスミド*cpe-IS1151*型はウエルシュ菌の保菌率が高い高齢者が入居する老人ホーム等の施設での事例が多く、健康保菌との関わりが示唆された。またマルチプレックスPCR法による分類は、PFGE法の系統解析と相関が認められた。

### (6) 食品のリステリア汚染防除のための基礎的研究

近年、微生物の存在形態の一つとして、バイオフィルムが注目されている。バイオフィルムとは、微生物が様々な物質表面に付着・増殖して菌体外多糖類(EPS)を分泌し、それらに取り囲まれて存在する微生物の集合体のことを指す。バイオフィルムを形成した細菌は、遊離状態で存在する細菌に比べて乾燥に対する耐性や薬剤への抵抗性を示すことが知られている。食品媒介感染症の原因細菌である*Listeria monocytogenes*(リステリア)もこのようなバイオフィルム形成細菌の一種であり、ステンレスやプラスチック表面にバイオフィルムを形成する。食品の製造施設においては、リステリアがバイオフィルムを形成して乾燥への耐性や薬剤に抵抗性を示すことにより、製品のリステリア汚染を引き起こすとされている。本研究は、バイオフィルムの形態や機能及び物理化学的、生物学的な性質の鍵を担うEPSの解析を行うことによって、

施設環境のリステリア防除に有効な方法の確立に資することを目的としている。これまでの研究で、施設由来リステリアには、施設内に定着しやすいタイプとそうでないタイプの存在が示唆されており、現在、これらの菌株を用いて、バイオフィーム形成時のEPS量やステンレスクーポン上で形成するバイオフィーム量について比較検討を行っている。

### (7) A型及びB型ボツリヌス菌の分子疫学

ボツリヌス菌は偏性嫌気性菌であり、強力な神経毒素を産生する。ボツリヌス症は、食品内に産生されたボツリヌス毒素を経口的に摂取することで発症するボツリヌス食中毒及び生後1歳未満の乳児がボツリヌス芽胞を摂取後、腸管内で発芽、増殖することにより産生された毒素を吸収することで発症する乳児ボツリヌス症に大分される。昨年度までに、大阪市内で発生した乳児ボツリヌス症患者から当研究所で分離したB型ボツリヌス菌株(Osaka05株)が産生する毒素の遺伝子塩基配列は、データベース上に報告されている配列とは異なっており、分子系統解析から新たな毒素サブタイプに分類されることを明らかにしてきた。今年度は、B型ボツリヌス菌のより簡便な分子型別法として、Multiplex PCR法を用いた毒素サブタイプング法を確立した。また、A型ボツリヌス菌についても同様に、Multiplex PCR法を用いた毒素サブタイプング法を確立した。今後、本法をボツリヌス症検査へ応用する予定である。

### (8) PCR法を用いた黄色ブドウ球菌エンテロトキシン遺伝子の検出

黄色ブドウ球菌食中毒は、食品内で増殖した黄色ブドウ球菌が産生した嘔吐毒素(エンテロトキシン)を摂取することによって発症し、大阪市内では毎年5件程度の発生が見られる。エンテロトキシンは、従来型(A-E型)に加えて、近年新型エンテロトキシンが次々と報告されている。中でもG、H及びI型は遺伝子検査法も確立しているため、本年度より黄色ブドウ球菌食中毒検査時に、PCR法による従来型及び新型エンテロトキシン遺伝子検査法を導入した。その結果、本年度に発生した黄色ブドウ球菌食中毒事例5事例中3事例で、従来型及び新型エンテロトキシン遺伝子が検出された。

### (9) ノロウイルスの分子疫学

ノロウイルス(NV)は、冬季に多発するウイルス性

食中毒の主要な病原である。また最近では、保育園、小学校、特別養護老人施設、病院などの施設内において、食品を介さずに直接ヒトからヒト感染が広がる集団胃腸炎事例の発生が目立ってきている。

平成20年度に大阪市内で発生届出のあった非細菌性胃腸炎111事例、患者糞便材料467検体、調理従事者糞便材料129検体についてリアルタイムPCR法を用いてNV遺伝子の検出を行った。またリアルタイムPCR法でNV陽性となった検体は遺伝子型別した。

患者からNVが検出されたのは73事例(65.8%)、患者糞便検体269検体(57.6%)であり、調理従事者糞便検体は12検体(9.3%)がNV陽性であった(表2-2-9)。2008/09シーズンのNV胃腸炎事例の発生は10月から認められるようになり、1月の発生が最も多かった。NV陽性73事例のうち、解析可能であった63事例において、ヒトからヒトへ感染が広がった事例は、少なくとも42事例(66.7%)認められ、主な原因施設は保育園、小学校、特別養護老人施設であった。カキ以外の食品が原因であった事例は7事例(11.1%)であり、カキの喫食が関連していた事例は3事例(4.8%)と少なかった。解析可能であった63事例について遺伝子型別を行ったところ、少なくとも10種類(GI:4種類、GII:6種類)認められ、GII.4型 NVが検出された事例が最も多かった(54.0%)。平成20年度は、NVが大流行した平成18年度に次いでNV胃腸炎事例が多く発生していた。検出されたNV事例の半分以上がGII.4型であったが、同時期に複数の遺伝子型のNVも認められる流行であった。

表2-2-9 平成20年度胃腸炎事例におけるノロウイルス検査状況

	検査数	NV陽性数	(%)
事例	111	73	(65.8)
患者糞便	467	269	(57.6)
患者嘔吐物	19	2	(10.5)
調理従事者糞便	129	12	(9.3)
食品	4	0	

### (10) 集団胃腸炎事例からのサポウイルスの検出

サポウイルスはヒトに胃腸炎を引き起こすウイルスである。最近では、これまで報告例のなかった遺伝子型による食中毒や集団胃腸炎が報告されるようになっており、ノロウイルスと同様に胃腸炎の原因として注意すべきウイルスの一つである。

平成20年11月に、大阪市内の保育所において嘔吐・下痢を主症状とする集団胃腸炎事例が発生し、

患者便からサポウイルスを検出した。今回、サポウイルス検査に高感度で特異性が高く、簡便なりアルタイムRT-PCR法を導入し、本検査法の有用性が確認できた。サポウイルスにはノロウイルスと同様に、多くの遺伝子型が存在することが報告されており、今後、原因究明や流行実態解明のために解析方法の検討が必要であると考えられた。

### (11) 乳幼児呼吸器疾患におけるヒトライノウイルス感染症

ヒトライノウイルス (human rhinovirus: HRV) は、ピコルナウイルス科ライノウイルス属に分類される RNAウイルスである。春季、秋季に流行し、ヒトに感染後、上気道炎、気管支炎、肺炎など幅広い呼吸器疾患を引き起こす。

本調査では、乳幼児呼吸器疾患における HRV 感染症の実態把握を目的とし、平成20年8月から21年3月までの期間に得られた呼吸器感染症由来検体を用いて、RT-PCR法による HRV 遺伝子検査を実施した。その結果、34検体が HRV 陽性であった。月別検出状況を図2-2-2に示す。春季を含まない本調査期間における検出のピークは、11月であった。Vero、RD-18S細胞を用いたウイルス分離検査では、HRV は検出されなかった。呼吸器感染症の原因ウイルスであるRSウイルス(RSV)、ヒトメタニューモウイルス(hMPV)、ヒトパラインフルエンザウイルス(HPIV) 1、2、3型の遺伝子検査を併せて実施した結果、23検体がHRV単独検出であり、残りの11検体は、他の呼吸器ウイルスとの共検出であった(RSV、6; HPIV-1、1; HPIV-2、2; hMPV、2)。本調査を通して、臨床検体中のHRV検出におけるRT-PCR法の有用性が示された。

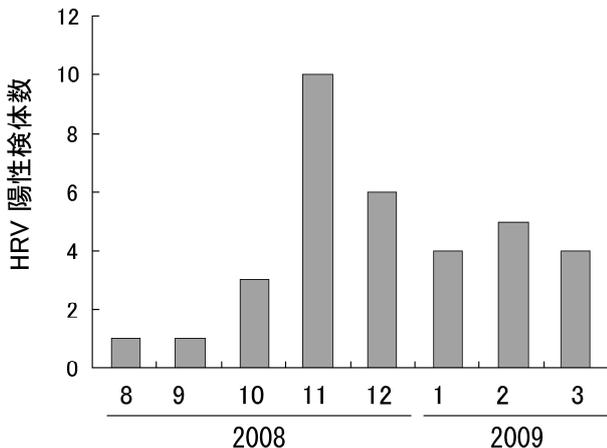


図2-2-2 HRV 月別検出状況

### (12) インフルエンザウイルスA/H1N1分離株のオセルタミビル耐性化に関する検索

平成20年度にインフルエンザ様疾患患者検体から分離されたインフルエンザウイルスのうち、A/H1N1型を示した33株のノイラミニダーゼタンパク質(NA)遺伝子の塩基配列の一部を解読し、さらにNAの推定アミノ酸番号275に、インフルエンザ治療薬(NA阻害薬)であるオセルタミビルに対する耐性化出現の指標となる、ヒスチジンからチロシンへの変異が、存在するか否かの検索を行った。当担当で分離されたインフルエンザウイルスA/H1N1全33株のうち、NAの推定アミノ酸番号275がオセルタミビルに感受性を示すヒスチジンであったものは2株、また、同薬剤に耐性を示すチロシンであったものは31株であった。昨年度と同検索では、検査した全26株がオセルタミビル感受性を示したが、今年度は94%の株(33株中31株)がオセルタミビル耐性を示した。本情報の還元化は、国立感染症研究所等を経由して、全国の情報と共に迅速に行われた。本市のインフルエンザ様疾患対策においても、本検索は重要であると思われることから、今後も本ウイルスのオセルタミビル耐性化についての検索を継続して実施する必要があると考えている。

### (13) PCR法による腸管寄生微胞子虫陽性例の検出

腸管寄生微胞子虫 *Enterocytozoon bieneusii* は、HIV感染に伴う免疫不全患者などでの慢性下痢症の原因として海外で注目され、動物にも見出されていることから人獣共通の病原体として認識されている。しかし、国内ではその存在は全く不明であった。今回、遺伝子検査法を用いて臨床検体と動物由来検体(糞便材料から抽出したDNA160検体)を検査したところ、ネコ1検体とイヌ2検体に陽性を見出し、腸管寄生微胞子虫が国内にも分布することを初めて明らかにした。イヌ由来株の遺伝子型はともにイヌに特異的なタイプで、ネコのそれは人獣共通寄生性のタイプであった。また、本病原体の保虫宿主として重要な豚について、その糞便30検体を調査したところ、海外と同様高い感染率(33%)であることを確認し、その遺伝子型は宿主特異なタイプのみならず人獣共通寄生性のタイプも存在していることを明らかにした。国内では、1985年～2007年までに、1万人を超えるHIV陽性者と約5,000人のエイズ患者が報告され、現在もその報告数は増加傾向にある。海外では、このような患者における *E. bieneusii* の感染率は数%～50%と報告されていることから、国内において同患者の原因不明下痢

症例では、*E. bieneusi*の感染が見逃されているものと考えられる。

#### (14) アカントアメーバの分子疫学とアメーバ性角膜炎の診断・予防に関する研究

**ア アカントアメーバに特異的なPCR法の有効性**  
今回検討したPCRでは、検体中に1個のアメーバが存在していれば遺伝子レベルでもその存在を確認することが可能であった。また、大阪市内患者の角膜擦過物由来株とそのコンタクトレンズ保存ケースや保存液由来株の増幅産物のシーケンス解析を行ったところ、同一の遺伝子型であったことから、患者の感染源・感染経路を明らかにすることができた。このように、今回のPCRは単にアメーバの存在を確認するだけでなく、症例の疫学的背景などを解明する上でも有効な手法であると考えられた。

#### イ 保存液のアカントアメーバに対する殺滅効果の検討

3種類の保存液のアカントアメーバの栄養体と嚢子に対する殺滅効果を検討したところ、保存液の一部は栄養体に対して若干の殺滅効果が認められたが、他種保存液には効果が認められなかった。また、嚢子に対する効果では、3種類の保存液とも殺滅効果を認めなかった。以上のことから、今回用いた3種類の保存液は検討した実験系においてアカントアメーバを完全に殺滅できないことが明らかとなった。

#### (15) 動物由来感染症に関する病原体調査

ウエストナイルウイルス(WNV)は、野鳥に感染し、その野鳥を吸血した蚊の媒介によりヒトが感染することが知られている。ヒトに感染しても多くの場合は不顕性感染であるが、ウエストナイル脳炎を発症した場合、3～15%の致死率を示す。

現在までのところ、日本国内における報告は、米国からの帰国者の発症1例のみであり、国内での患者発生、蚊及び野鳥からのWNV検出の報告はない。しかしながら、一旦、国内の蚊や鳥類にウイルスが侵入すると、急速な感染の拡大が危惧される。したがって、WNV早期発見のサーベイランスは、その蔓延防

止に大きな役割を果たすことが期待される。

#### ア 大阪市内における蚊の分布及びウエストナイルウイルス保有状況の調査

平成17年度から19年度に引き続き、20年度も6月から10月にかけて大阪市内の公共施設・公園等の10ヶ所において、蚊の分布調査を行うとともに蚊のWNV遺伝子及びフラビウイルス遺伝子保有状況の調査をおこなった。

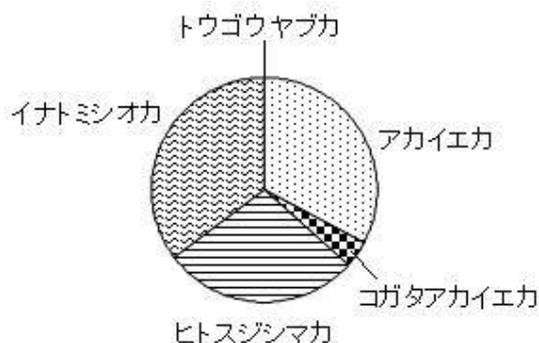


図 2-2-3 捕獲した蚊の種別割合

今回調査期間中に捕集された雌蚊は、5種類で合計1,818頭であった。種別では、イナトミシオカが638頭(35.1%)と最も多く、次いでアカイエカ595頭(32.7%)、ヒトスジシマカ512頭(28.2%)、コガタアカイエカ72頭(4.0%)、トウゴウヤブカ1頭(0.1%)であった。トウゴウヤブカは、平成17年度捕獲された後、平成18年度、19年度と捕獲されなかったが、今年度捕獲され、市内に生息することが確認された。

#### イ 大阪市内で斃死した野鳥類のウエストナイルウイルス保有状況の調査

今年度、市内において斃死し、採集された事例は4事例であった。これらについて死後24時間以内と考えられる腐敗していない死亡野鳥個体をウエストナイルウイルス保有調査対象とした。調査した野鳥類は、ミゾゴイ1事例、ハト1事例、カラス2事例、各1検体であった。今年度、WNVは調査した全ての雌蚊及び斃死した野鳥において検出されなかった。現在までのところ、日本の他の地域と同様、大阪市においてもWNVは検出されていない。