

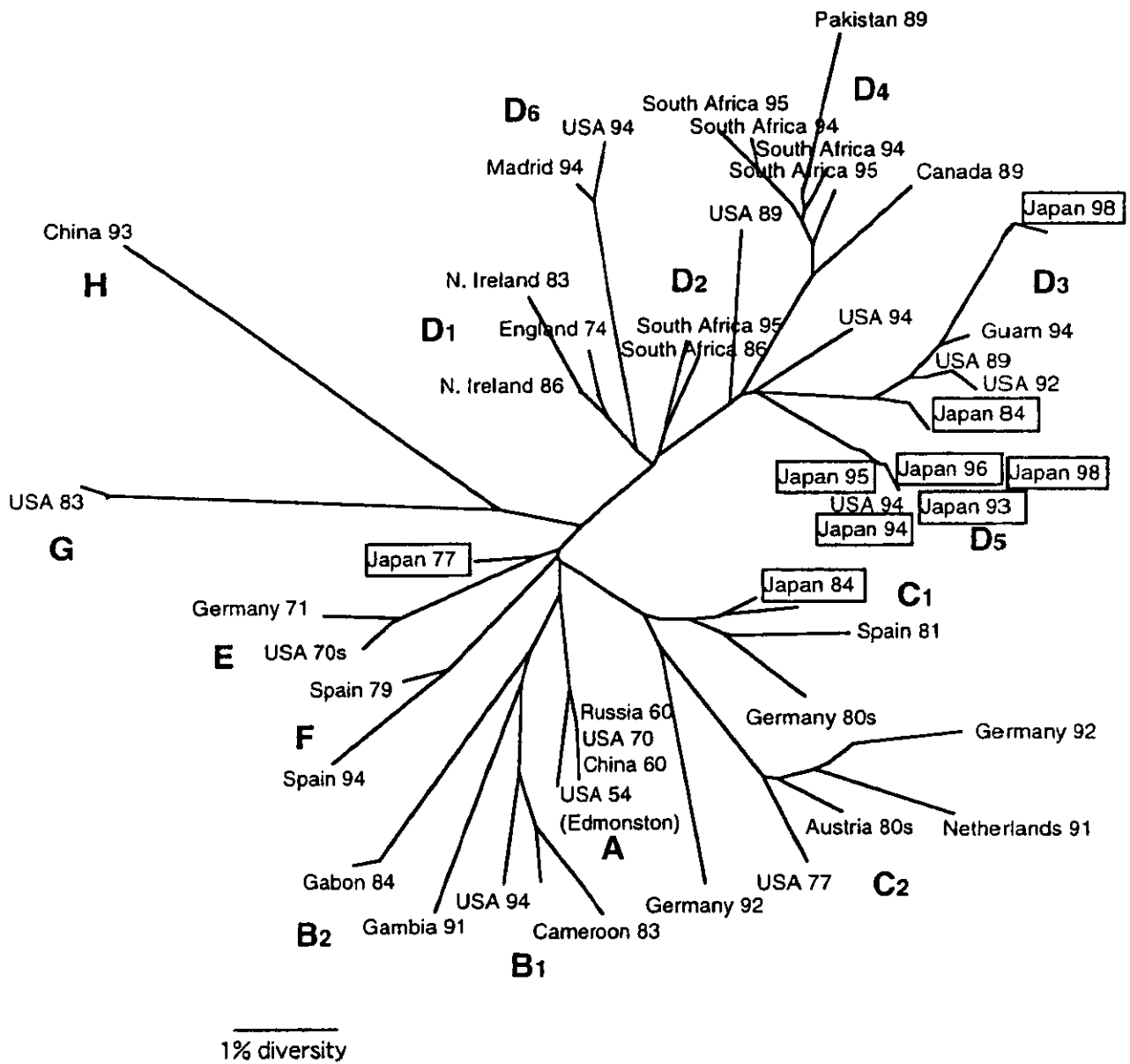
文 献

1. F.Kobune, et.al., Marmoset lymphoblastoid cells as a sensitive host for isolation of measles virus. *J. Virol.*, 64, 700-705, 1990
2. F.Kobune, et. al., ; Characterization of measles viruses isolated after measles vaccination. *Vaccine*,13, 370-372, 1995
- 3.WHO, *Weekly Epidemiologic Record* ; Standardization of the nomenclature for describing the genetic characteristics of wild-type measles virus. 73:265-272, 1998

研究協力者

竹田 誠, 岡田 晴恵, 佐藤 威, 小浜 友昭、
小船 富美夫 (感染研：ウイルス製剤部)

Fig.1. Unrooted tree drawn on basis of a CLUSTAL W analysis of the nucleotide sequences of the MV Bank viruses.



厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

微生物系統株の収集・保存事業（感染症ライブラリー）の構築
に関する調査研究 ～麻疹ウイルス（MV）バンクの構築～

分担研究者 小船 富美夫（国立感染症研究所室長）

研究要旨 国際的な統一手法のもとで近年の野外MV 2 3株の遺伝型を決定した。その結果、わが国では1984年の流行を契機にD 3、D 5遺伝型の野外MVが流行の主役であること、野外MVは変異を蓄積しつつあることが判明した。ワクチンの有効性と関連し今後、その変異動向を監視する必要がある。本研究によりMVバンク構築の基礎条件はほぼ整えられた。

はじめに

地球規模では毎年100万人に及ぶ乳幼児が麻疹罹患により死亡している。かかる状況にあってWHO（世界保健機構）はその制圧、撲滅を目標とする予防接種拡大計画（EPI）を推進している。EPIを効果的に推進するためには麻疹流行の実態を明らかにする必要がある。特に野外流行ウイルスの疫学調査は不可欠であり、特にわが国はアジア地域の中心的役割を果たすことが期待されている。

従来、MVは分離が容易ではなかったが高感度のウイルス分離法、およびPCR法などの普及に伴い世界各国で多数の野外株ウイルスが分離、収集されつつある。分子疫学的解析手法を確立し、流行MVの実態を把握することはEPIの効果的推進に不可欠と考えられる。さらに、近年MVは変異を蓄積しつつあり、変異の蓄積にともなって予想される現行ワクチンの防御効果の劣化対策も必要となっている。

1.目的

上述の状況にあって、本研究でのバンク構築は単なるウイルスの分離、収集、遺伝型決定にとどまることなく、以下について

検討し、えられた知見を麻疹の予防、厚生行政に資することを目的とする。

- 1) ワクチンによる免疫持続期間の検討。
ワクチン既接種者の罹患例からMV分離を試み、ワクチンによる免疫持続期間を明らかにする。その成績をもとにワクチン2回接種の必要性を検討する。
- 2) 臨床ウイルス学的側面から成人麻疹、麻疹肺炎、麻疹脳炎などの重症例から分離されたウイルス性状を解析する。
- 3) ウイルスの変異動向（現行ワクチンウイルスとの相違）の解析、把握。
- 4) ウイルス株の分与、情報の提供。
研究機関相互、研究目的に限る。
- 5) アジア地区のMVバンクとしてWHOの麻疹EPIを支援（技術移転を含む）する。

2.方法

野外MV：1977年に感染研で飼育中のサル群にみられた麻疹の自然感染例のサル咽頭拭い液からVero細胞で分離されたMV-7701（YMT）株および1984～1998年に急性期麻疹患児の咽頭拭い、もしくは末梢血液からB95a細胞を用いて分

離された野外MV 22株 MV-84K, MV-8402, MV-8404, MV-8406, MV-9403, MV-94YT, MV-9538, MV-9549, MV-9629, MV-9812, MV-9830, MV-9832, MV-9833, MV-9835, MV-9836, MV-9845, MV-9850, MV-9860, MV-9881, MV-9884, MV-98105, MV-98107の合計23株を用いた。

塩基配列：ゲノム特異的プライマーペア (sense 1194 AGATTAGGGCAAGAG A T G G T 1213, anti-sense 1726 GAGGGTAGGCGGATGTTGTT 1707) を用いてゲノムRNAよりRT-PCR法にてN遺伝子の5'端の532塩基を増幅した。また、上記についてDye Terminator法にて同部位の塩基配列を決定した。

遺伝型の決定：DDBJ/EMBL/GenBankより利用可能な39株とわれわれの解析した23株の1320位～1686位の385塩基配列をCLUSTAL W program (Thompson et al., 1994) およびTREEVIEW 1.4 program (Page, 1996) を用いて解析し、系統樹を作成した。さらにWHOの報告¹⁾にしたがい遺伝型を決定した。

MV株の命名：新たに国際的に統一されたMV株の命名法¹⁾に従った。

3. 結果

YMT株の遺伝型はEタイプ、1984年に分離された4株(MV-84K, MV-8402, MV-8404, MV-8406)はそれぞれC1、D3、D3、C1タイプであった。1994年以降の分離株 MV-94YT, MV-9538, MV-9549, MV-9629, MV-9812, MV-9830, MV-9832, MV-9833, MV-9835, MV-9836, MV-9845, MV-9850, MV-9860, MV-9881, MV-9884, MV-98105, MV-98107の遺伝型はD3およびD5タイプが混在していることが明らかになった。検索結果は図-1の通りである。また、これら検索ウイルスの命名結果を表-1に示した。

4. 考察

わが国の流行MV株バンクの構築を目的に国際的統一手法にしたがいN遺伝子を指標に遺伝型を決定した。その結果、1970年代の流行MV 7701 (YMT) 株の遺伝型はE、1980年代の4株ではC1 (MV 84 K, MV 84 0 6) およびD3 (MV 84 0 2, MV 84 0 4) であった。MV 84 K株 (遺伝型C1) についてHおよびF遺伝子を1950年代のEdmonston株 (遺伝型A) と比較した結果、H遺伝子には58塩基に置換 (アミノ酸置換13を伴う) を認めた。一方、F遺伝子では35塩基置換に対してアミノ酸置換は認められなかった。しかし、1990年代にはいりF遺伝子にも2～3カ所にアミノ酸置換を認め (未発表)、野外MVの変異動向は新たな段階にはいりつつあるものと推測される。今回の検索成績では1980年代までの流行MVの遺伝子型はE、もしくはC1であり、これらはEdmonston株 (A) に近縁にある。しかし、1990年代の主要流行MVの遺伝型はD3もしくはD5であった。これらの結果から、野外MVは1984年の流行 (MV 84 K株) を契機にF遺伝子に変異を波及していることが明らかにされた。また、近年の野外MVのH蛋白は少なくとも2ヶ所の抗原決定基で変異をしめしている (未発表)。これら感染防御蛋白での変異動向はワクチンの有効性と密接に関連する予防行政上の重要な問題となることが推測される。

麻疹の罹患状況はワクチンの接種率と密接に関連する。ワクチン接種率の高い米国での麻疹はすでに稀な感染症になっており、その患者の分離MVが遺伝型D5であったことから、米国の麻疹は輸入麻疹であり、その輸出国は日本であると断定されている。

激烈な伝播力を示す麻疹の制圧、撲滅にはワクチン接種率96%を実現する必要がある³⁾。しかしながら、わが国のワクチン接種率は75%)にとどまっており、麻疹の制圧は望めない状況にある。事実、1998年後半から東京および近県(茨木、群馬、神奈川)に麻疹の流行があり、これら地域だけでも5,000人以上が罹患し、肺炎の併発による死亡例も報告されている。乳幼児のほかに中学、高校生など年長児の麻疹が増加傾向にある。ワクチン既接種者の罹患も稀ではなくなっている。先進諸国においてこのような状況にあるのはわが国のみであり、麻疹対策の立ち遅れは第三国から指摘されている。ワクチンの接種率を高め、麻疹を制圧することは国際社会の一員としての責務である。MVバンクの構築は麻疹のサーベイランス手法として必須であり、今後、麻疹の制圧に極めて有用な情報を提供するものと考えられる。

文献

1. WHO, Weekly Epidemiologic Record ; Standardization of the nomenclature for describing the genetic characteristics of wild-type measles virus. 73:265-272, 1998
2. F. Kobune, M. Funatu, H. Takahashi, M. Fukushima, A. Kawamoto, S. Iizuka, H. Sakata, S. Yamazaki, M. Arita, Xu Wenbo and Zhang Li-Bi.: Characterization of measles viruses isolated after measles vaccination. Vaccine, 13, 370-372, 1995
3. Anderson, R.M. and R.M. May: Vaccination and herd immunity to infectious disease. Nature, 318, 323-329, 1985

研究協力者

竹田 誠, 岡田 晴恵, 佐藤 威,
小浜 友昭, 田代 真人

図-1 野外MV株の系統樹

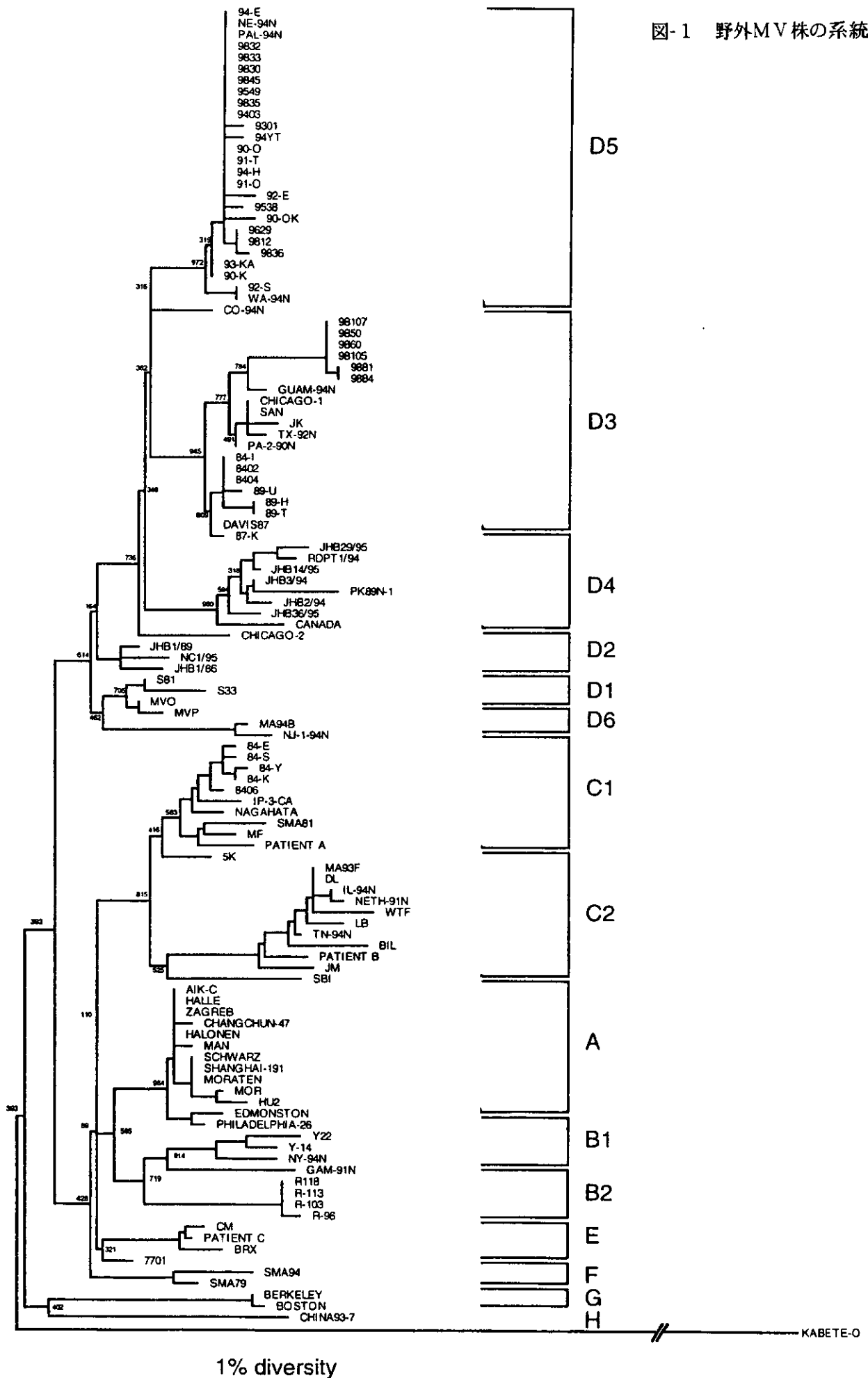


表-1

新命名法による野外MV株名

旧株名	新株名 (統一名)
MV-YMT	MVi/Tokyo.JP/39 -77* / 7701(YMT)** (E)***
MV-84-K	MVi/Kanagawa.JP /04 -84 / 8401(84-K)(C1)
MV-8402	MVi/Kanagawa.JP/03 -84 / 8402 (D3)
MV-8404	MVi/Kanagawa.JP/07-84 / 8404 (D3)
MV-8406	MVi/Kanagawa.JP/16 -84 / 8406 (C1)
MV-94YT	MVi/Chiba.JP/29-94/ 94YT (D5)
MV-9538	MVi/Mie.JP/15-95 / 9538(D5)
MV-9549	MVi/Saga.JP/14 -95 / 9549 (D5)
MV-9629	MVi/Yamaguchi.JP/10 -96 / 9629 (D5)
MV-9812	MVi/Ibargi.JP/15 -98 / 9812 (D5)
MV-9830	MVi/Saitama.JP/29 -98 / 9830 (D5)
MV-9832	MVi/Gunma.JP/14 -98 / 9832 (D5)
MV-9833	MVi/Gunma.JP/15 -98 / 9833 (D5)
MV-9835	MVi/Gunma.JP/09 -98 / 9835 (D5)
MV-9836	MVi/Gunma.JP/12-98 / 9836 (D5)
MV-9845	MVi/SaitamaJP/32-98 / 9845(D5)
MV-9850	MVi/Kanagawa.JP/39 -98 / 9850 (D3)
MV-9860	MVi/Kanagawa.JP/40 -98 / 9860 (D3)
MV-9881	MVi/Kanagawa.JP/48 -98 / 9881 (D3)
MV-9884	MVi/Kanagawa.JP/47 -98 / 9884 (D3)
MV-98105	MVi/Kanagawa.JP/50 -98 / 98105 (D3)
MV-98107	MVi/Kanagawa.JP/50 -98 / 98107 (D3)

MVi : Measles virus isolate * : Week-Year

** : Laboratory code ***Genetic type

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書
微生物系統株の収集・保存事業（感染症ライブラリー）の構築
麻疹ウイルス株の命名法と遺伝子型分類に関する研究
分担研究者 小浜友昭（国立感染症研究所室長）

研究要旨

WHO（世界保健機関）は21世紀の早い時期における麻疹根絶の達成を目指して予防接種拡大計画（EPI）を推進している。近年、世界中で患者から麻疹ウイルス株が多数分離されるようになり、その分子疫学的解析のためにウイルス株の命名法を統一する必要が指摘されるようになった。1998年5月に開催されたWHO麻疹専門家会議 "Standardization of the Nomenclature for Genetic Characteristics of Wild-type Measles Viruses" において、麻疹ウイルス株の命名法の統一およびウイルスバンクの構築が提案された。日本では国立感染症研究所ウイルス製剤部麻疹室がウイルスバンクを準備中である。WHOの分子疫学的な型分類によると、国内で分離されたウイルスのタイプはD3タイプ、もしくはD5タイプに分類されることがわかった。

A. 研究目的

弱毒生麻疹ワクチンの普及に伴って麻疹患者は著明に減少した。しかし地球規模では毎年100万人に及ぶ乳幼児が麻疹で死亡している。このような状況にあってWHO（世界保健機関）はその撲滅を目標とする予防接種拡大計画（EPI）を推進している。近年、野外麻疹ウイルス（MV）の高感受性細胞（B95a）とPCR法の普及に伴い、世界中で分離される多数のMV株の分子疫学的解析にウイルス株の命名法を統一する必要が指摘されていた。1998年5月に開催されたWHO麻疹専門家会議 "Standardization of the Nomenclature for Genetic Characteristics of Wild-type Measles Viruses" において、MV株の命名法の統一およびウイルスバンクの構築が提案された。

B. 研究方法

1. 野外MV株の命名法

MVi/City.Country/Weeks-Year/Strain number[Genotype] と表示する。Weeksは1年52週で表す。Strain numberは各施設での整理番号。[Genotype]については後述。PCRで遺伝子検出の場合には、MVと表記する。

例：1998年2月22日に茨城県で採取された患児検体から分離されたウイルスでは、MVi/Ibaraki.JP/8-98/9805[D4]と表記する。

2. 麻疹ウイルスバンク

米国CDCを中心に各地域にウイルスバンクを構築する。わが国はアジア地域のバンクの構築を要請されている。その主要な目的は分子疫学的解析にある。またバンクでは流行ウイルスの性状解析の他に株の維持、保存および分与を行う。わが国においては国

立感染症研究所ウイルス製剤部麻疹室がバンクを準備中である。当研究室ではこれまで医療機関、地方衛生研究所などの協力により1980年代以降の国内の野外MV350株以上を分離、保存している。

C. 研究結果

遺伝子型分類とわが国の分離株 [Genotype] はNP遺伝子のC末端（1,230-1,685）の塩基配列から "Standardization of the nomenclature for describing the genetic characteristics of wild-type measles viruses". WHO, Weekly Epidemiological Record, 1998; 73: 265-269 を参照してタイプを決定する。現在、わが国での流行ウイルスはD3タイプ、もしくはD5タイプに分類される（表参照）。

D. 考察

1980年代の流行から始まったH遺伝子の変異は1990年代になってF遺伝子に及んでいる。最近の流行ウイルスは1950年代の流行ウイルスとの間にH遺伝子で50-60塩基（アミノ酸では16-18カ所）、F遺伝子では30-33塩基（アミノ酸で2-3カ所）に置換が起こっている。H蛋白、F蛋白は感染防御抗体を作らせる蛋白なので、これらの部位での変異を注視する必要がある。幸い、現在までのところ現行ワクチンによる感染防御効果には変化は見られない。

F. 研究発表

Katayama, Y., Shibahara, K., Kohama, T., Homma, M., Hotta, H.: Molecular epidemiology and changing distribution of genotypes of measles virus field strains in Japan. J. Clin. Microbiol. 35: 2651-2653, 1997.

協力研究者 小船富美夫、田代真人

遺伝子型分類とわが国の分離株

遺伝子型	分離株
A	(Edmonston), USA 54, Russia 60, China 60, USA 70
B1	Cameroon 83, USA 94
B2	Gabon 84, Gambia 91
C1	Germany 80s, Spain 81, Japan 84
C2	USA 77, Austria 80s, Netherlands 91, Germany 92, Germany 92
D1	England 74, N. Ireland 83, N. Ireland 86
D2	South Africa 86, USA 89, South Africa 95
D3	Japan 84, USA 89, USA 92, Guam 94, USA 94, Japan 98
D4	Canada 89, Pakistan 89, South Africa 94, South Africa 94, South Africa 95, South Africa 95
D5	Japan 93, USA 94, Japan 94, Japan 95, Japan 96, Japan 98
D6	USA 94, Madrid 94
E	USA 70s, Germany 71, Japan 77
F	Spain 79, Spain 94
G	USA 83
H	China 93

ヒトカリシウイルスの系統株収集・保存に関する研究

分担研究者 宮村達男 国立感染症研究所ウイルス第二部 部長
共同研究者 武田直和 国立感染症研究所ウイルス第二部 室長
名取克郎 国立感染症研究所ウイルス第二部 主任研究官

研究要旨

小型球形ウイルス (SRSV) を迅速に分類するため構造蛋白領域の5'末端(300bp)を増幅し、その遺伝子の塩基配列を解析した。GenBankに登録されているSRSVを含むヒトカリシウイルスの構造蛋白領域の配列を抽出し構造蛋白のデータベースを作成した。新たにGenogroup Iの1種類を加え、Genogroup Iの5種類とGenogroup IIの7種類、合計12種類のSRSV RNA 遺伝子を収集・保存した。7種類のウイルスについてウイルス様中空粒子を作製して保存した遺伝子の正確度を確認した。

A. 研究目的

ヒトカリシウイルスは遺伝学的に大きくGenogroup I (GI)、Genogroup II (GII) およびGenogroup III (GIII) の3群に分類される。GIとGIIを構成するヒトカリシウイルスはわが国では小型球形ウイルス (Small Round Structural Virus : SRSV) と呼ばれているウイルスであるが、これらは小児の急性胃腸炎、大人の嘔吐下痢症および急性胃腸炎の原因ウイルスである。わが国において冬季に頻発するウイルス性集団食中毒の原因ウイルスでもある。GIIIは小児の急性胃腸炎の病因ウイルスとされている。SRSVが原因と見られる患者は先進国、発展途上国を問わず毎年多数発生し、SRSVは広範に浸潤していることが血清疫学調査から明らかになっている。またカキ関連集団食中毒の原因ウイルスとして食品衛生行政上重要視されている。SRSVは1972年にその実体が電子顕微鏡下でとらえられたが、その後多くの研究者によって培養細胞、器官培養及び実験動物で培養が試みられたにもかかわらず現在においてもなお増殖ができないウイルスである。したがってSRSVに関してはウイルスとしての収集・保存が不可能な現状にある。患者糞便材料を凍結保存することも可能であるが、超低温庫のスペースにも

限度がある。また、凍結であっても長期間のうちにウイルス粒子が壊れ、その結果遺伝子RNAが分解してしまうことが明らかになっている。本研究では、将来SRSVが増殖可能である培養細胞が確立された場合を想定し、かつ現時点で可能と考えられるSRSV感染性cDNAのクローニングを目指し、患者糞便材料から抽出したSRSV RNAを超低温で遺伝子の状態で保存することを目的とする。また、ウイルス様中空粒子を作出することによって保存した遺伝子の正確度を評価することを目的とした。

B. 研究方法

遺伝子解析ソフトウェアパッケージGCGのFastaプログラムによってGenBankおよびEMBLに登録されているSRSV遺伝子を検索し、SRSV ORF2の構造蛋白領域のデータベースを作成した。Pileupプログラムによってこの領域のアラインメントならびに系統解析を行った。同様にSRSV構造蛋白領域ORF2を検索し、Prettyプログラムでconsensus sequenceを抽出してこの領域を増幅するプライマーを設計した。増幅した遺伝子の塩基配列を解析してGIとGIIのSRSV RNA遺伝子を超低温庫に保存した。構造蛋白を発現する組換えバキュロウイルスを作出し、ウイルス様中空粒子産生の

有無を生化学的、免疫化学的に解析した。

C. 研究結果

平成11年2月現在GenBank、EMBL、DDBJに登録されているSRSVのポリメラーゼ領域を抽出し、昨年作成したポリメラーゼ領域のデータベースに追加しこれらを統合した。ポリメラーゼ領域の解析からSRSVは遺伝子型からGI (Norwalk-like)、GII (Snowmountain-like)、GIIIあるいはClassical human calicivirus (Sapporo-like) の3種のグループに分類されることを確認した。GI、GIIは全塩基配列から典型的なカリシウイルスの遺伝子構造をもつことが確認され、一方Classical human calicivirusの遺伝子構造はGI、IIとは異なり、ORF1とORF2が一つの連続したORFを構成するRabbit haemorrhagic disease virusの構造に似ている。

本年度は新たに構造蛋白全領域の塩基配列データ (1,600 bp) を収集・解析してデータベースを作成した。また、SRSVを迅速に分類するために構造蛋白領域の5'末端 (300bp) を増幅して遺伝子の塩基配列を解析し、GenBank、EMBL、DDBJに登録されている配列と統合してデータベースを作成した。これらSRSV構造蛋白 (ORF2) の塩基配列を解析すると、塩基のホモロジーはGIとGIIの間で約50%、同グループ間でも70%程度であった。約30株の国内のSRSVの構造蛋白遺伝子を増幅してその塩基配列を解読した結果、塩基配列からGI、GIIにはそれぞれ少なくとも5種類と7種類の血清型が存在すると予想された。これらのRNAを超低温庫に保存した。

一方、SRSVは培養できないために抗原および免疫原として用いるウイルス粒子を得ることができなかったが、1993年米国のJiangらによってバキュロウイルス発現系で形態的にも抗原的にもネイティブなウイルスと変わらないNorwalk virusの中空ウイルス粒子 (VLPs) が作られた。その後、米国および英国で計8株のSRSV VLPsが発現されている。本年度は日本で流行した株の中から遺伝子型の異なる7株のSRSVで組換えバキュロウイルスを用いてVLPsの発現に成功した (GIの3

株、GIIの4株)。したがってこれらの7株に関しては正確な遺伝子をクローン化したことが証明された。各発現VLPsは血清学的にも異なり、それら7株についてSRSV抗体測定が可能となった。現在、抗体測定のためのELISA抗原を分与できる体制にある。またこれまでのものとは血清型の異なるVLPsの発現と、抗VLPs免疫血清を用いた高感度ウイルス検出系の確立を試みている。

D. 考察

ヒトカリシウイルスはプラス一本鎖RNA遺伝子を芯に、このまわりに分子量約60,000ダルトンの構造蛋白が180分子集合して形成される正二十面体構造を有している。1993年に米国のJiangらがノーウォークウイルス (GI) を、ほぼ同時期に英国のLambdenらはサザンプトンウイルス (GI) の全塩基配列を解読して以来、1995年にはローズデールウイルス (GII) とマンチェスターウイルス (GIII) の全一次配列が明らかになった。マンチェスターウイルスはおよそ7.2kの、それ以外のウイルスは7.6kの長さの遺伝子である。ウイルス蛋白のアミノ酸配列には他のRNAウイルスに共通に見いだされるヘリカーゼ、プロテアーゼ、RNAポリメラーゼ等の機能モチーフが並び、その配列順序もほぼ明らかになっている。その後、患者の糞便から効率良くSRSV RNAを抽出する手法、およびプライマーの開発に伴い、この数年は世界各国でPCRによるSRSV遺伝子の増幅、解析が行われている。ただ現在ORF1ポリメラーゼ領域の塩基配列が勢力的に解析されてきているが、解析の領域によっては本来GIIであるべきウイルスがGIに分類されることもあり多少の混乱が生じてきた。ヒトカリシウイルスは遺伝学的にあるいは血清学的に新種のウイルスが同定されてくる可能性が多分に考えられるウイルスであるから、今後構造蛋白領域ORF2の5'末端 (300bp) の塩基配列データを収集・解析することによってデータベースの充実をはかり、より有効なプライマーの開発を進めてゆく必要がある。

E. 結論

SRSVは現時点で培養細胞、器官培養及び実験動物で培養ができないウイルスで、ウイルス株の収集・保存が不可能である。本年度は患者糞便材料から抽出した30株のSRSV RNAを超低温で遺伝子として保存した。このうちの7株は構造遺伝子を組換えバキュロウイルスで発現することによってウイルス様中空粒子を産出し、収集遺伝子の正確度を確認した。

F. 研究発表

1. 論文発表

Natori, K., Suzuki, K., Yamakawa, Y., Tatsumi, M., Sakurai, N., Sakae, K., Kobayashi, S., Shinozaki, K., Ishiko, H., Miyamura, T., and Takeda, N.
Expression and self-assembly of capsid proteins of Chiba virus, a genetically distinct Norwalk-like virus. *J. Clin. Microbiol.* (submitted).

下痢原性細菌の菌株バンクに関する研究

分担研究者 渡辺治雄 国立感染症研究所 細菌部 部長
共同研究者 寺嶋 淳 国立感染症研究所 細菌部 主任研究官
泉谷秀昌 国立感染症研究所 細菌部 研究員

研究要旨 近年、腸管出血性大腸菌 O157、サルモネラ、赤痢等による腸管感染症の集団及び散発事例が増加傾向にある。これらの腸管感染症は、食品を介して広域に発生することがしばしばみられ、時に多くの被害をもたらす。被害の拡大を未然に防止するため、疫学的調査および菌の分子疫学的解析が功を奏する場合が多い。菌の分子疫学的解析、特に DNA 解析の促進を目指すため菌株バンクの構築が望まれる。

はじめに：

1996 年における腸管出血性大腸菌 O157 による集団発生事件においては、患者総数が 1 万人、集発事例も 20 件を越える惨事になってしまった。その後も、集団事例数は減ってきているものの、散発事例は依然として変わらぬ数で発生している。特に、離れた地域で一見関連性がないように見えるが、実は同じ原因で発生しているという“散在的集団発生 diffuse outbreak”が見出されるようになってきている。腸管出血性大腸菌以外のサルモネラ、腸炎ビブリオ等による広域にわたる集団事例も以前にまして発生してきており、それらの発生をどのように迅速に感知し、被害の拡大を防止するかが検討課題になってきている。そのためのひとつの方法として、食中毒情報のオン・ライン化 (food-net) ……つまり、発生した事件の初発情報を 24 時間以内にオン・ラインで厚生省一感染症研究所に電送し、

地理的および時間的解析を GIS を用いて行い、異常発生が特定の地域にみられるかどうかを迅速に感知するシステム……が進められている。その疫学情報の科学的サポートとして菌学的解析が必要になる。本研究は、その菌学的データの作成のため、バンク機能がどうあるべきかを検討することにある。

研究目的：

いわゆる diffuse outbreak の迅速なる感知とそれに基づく迅速なる行政対応を通し、被害及び犠牲者の未然および拡大防止を目指した、菌株バンク機能の構築を目的とする。

対象となる菌株：

当面の菌株対象は、代表的腸管感染症を引き起こし、重篤な場合には死者を出す可能性のある疾患として、腸管感染症大腸菌およびサルモネラを対象とする。

収集方法：

広域の可能性がある食中毒及び腸管感染症の事件が発生した場合、厚生省から各都道府県に依頼し、国立感染症研究所細菌部への菌株の収集を行う。

解析方法：
菌株の解析は、疫学的マーカーとして信頼性があり、感受性が高い方法が望まれる。表現形質、及び遺伝形質についていくつかの方法を試みた。

表現形質による型別として、血清型、ファージ型別（腸管出血性大腸菌を溶菌できる20種類のバクテリオファージを用い、溶菌パターンを解析し分類する方法）

遺伝型型別として、ribotyping（菌体染色体上の ribosomal RNA 遺伝子の分布状態を調べる）、パルスフィールド電気泳動法（pulsed-field gel electrophoresis；PFGE、菌染色体上の制限酵素による切断パターンを識別する）、RAPD-PCR（random-amplified primed DNA PCR；ランダムプライマーを用いた PCR により増幅される DNA 断片を識別する）を用いた。

疫学的背景がはっきりしている事例から分離された菌を用いて、各方法により得られたデータがどれくらい正確にその事例を反映しているかを調べた。その結果、表現形質としてはファージ型別が事例間の差を最もよく反映していた。

遺伝型解析としては、PFGE が最もよく事例間の差を反映していた。問題点としては、ファージ型が同一のものの中に PFGE 型で更に分かれるもの、

あるいは逆に PFGE 型がほぼ同一であるにもかかわらずファージ型が異なるものが見られた。お互いに見ている現象が異なるため、そのような差が見られるのは仕方がないと思われる。

近年分離された腸管出血性大腸菌 O157 の PFGE 型の解析結果を、 dendrogram にしたものを図に示した。各集団事例内で分離される菌株はほぼ同一のパターンを示したが、事例が異なるとそのパターンはそれぞれ異なる傾向が見られた。この事は、腸管出血性大腸菌のゲノム構造はかなり多様性に富んでいる事を示唆した。そのひとつの原因として、挿入配列やバクテリオファージ等の外来性遺伝体の挿入あるいは欠失がかなり頻繁に起こっていることが推察される。この性質を利用すると、もし PFGE パターンが同一のものが一見因果関連がないと思われる事例間から分離された場合には、diffuse outbreak を考える必要があることになる。その一番よい例が、1998 年度に発生した“イクラ”の汚染事例であった。当該事例においては、散在的にいくつかの地域で O157 の異常発生が認められ、その疫学的解析および PFGE による遺伝学的解析により原因食品として汚染イクラが同定された結果、1000 トン以上の汚染イクラの回収が行われ、更なる被害の未然防止ができた貴重な事例であった。

サルモネラについても同様な方法を検討し、試行中である。

収集方法：

異常発生が見られ、広域的集団発生が予想される場合に、厚生省を通し、地方衛生研究所に菌株分与の依頼を行う。その結果収集された菌株の解析結果については、厚生省を通し報告を行う。

保存施設：

国立感染症研究所および地方衛生研究所に菌株を保存し情報交換を行う。

保存株の情報保存：

保存株の患者情報、菌株情報（表現型、遺伝型）、疫学情報をエクセル等のファイルに保存し、その結果を地方衛生研究所及び国立感染症研究所で共有できる形にする。

菌株分与：

地方衛生研究所間および国立感染症研究所との間での菌株分与を自由にし、研究および疫学的解析の促進を図る。その結果を公表する場合には、菌株を分離した施設に対する謝辞について配慮をする。

まとめ：

菌株の収集・解析を通し、その結果を感染症対策に効果的に利用できるようにするための菌株バンクの構築を促進する必要がある。疫学的解析結果の科学的補強のためにも不可欠な作業である。

文献：

1. Izumiya,H., Kasuda,T., Ahmed,R., Khakhria,R., Wada,A., Itoh,K.,Johnson,M.W.,

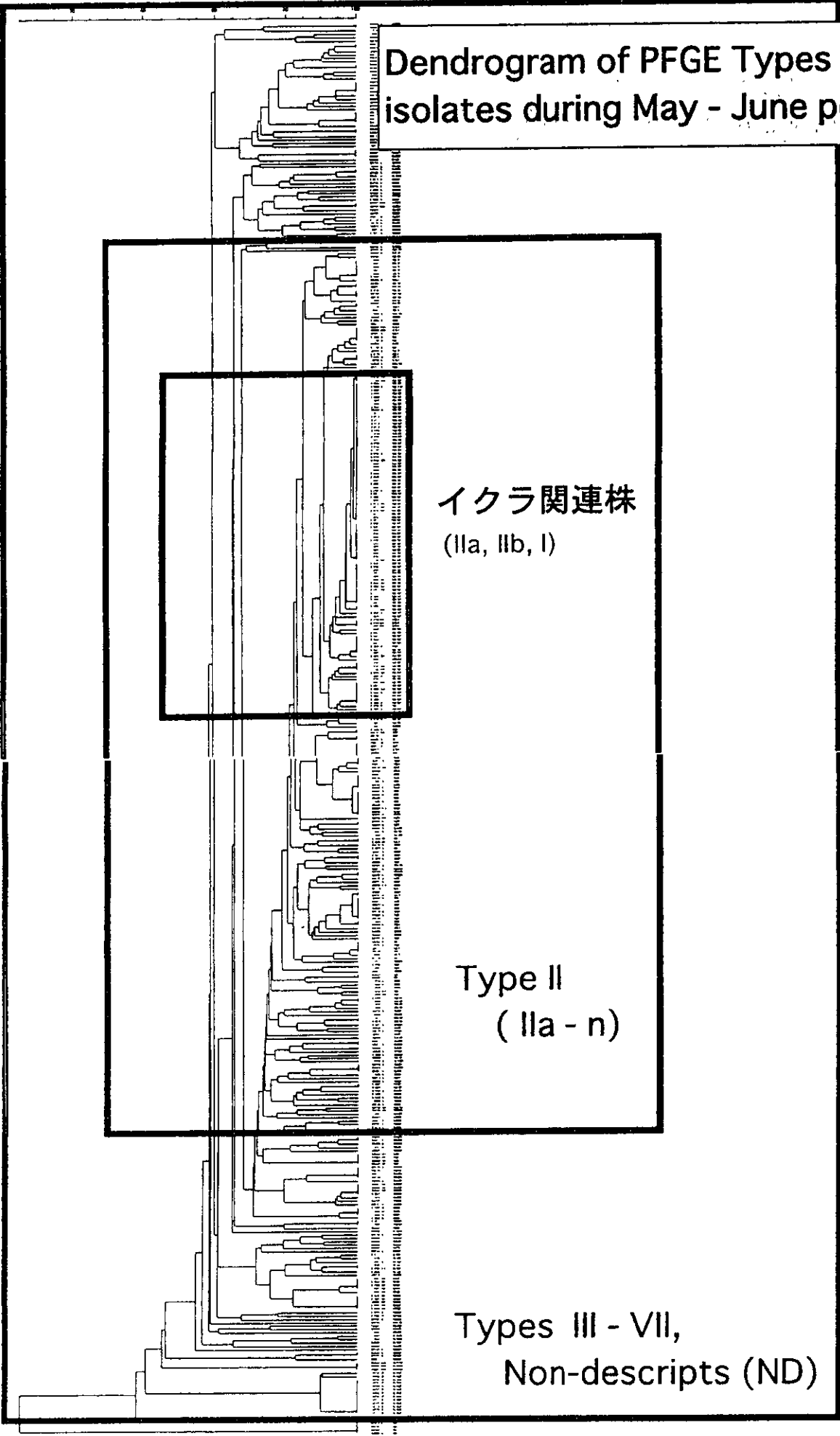
Konuma,H., Shinagawa,K., and Watanabe,H.Availability of combinatorial use of bacteriophage typing and pulsed-field electrophoresis in the epidemiological analysis of japanese isolates of enterohemorrhagic *Escherichia coli* serotype O157. Microbial Immunol. 42 : 515-519.1998

2. Watanabe,H., J. Terajima., Izumiya,J., Wada A., Iyoda, S., and Tamura, K. Molecular epidemiological analysis of enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections in Japan. J.J.M.S.B. 51:S115-S123.1998.

3. Murase,T. Yamai. S., and Watanabe,H. Changes in pulsed field gel electrophoresis patterns observed in cllical isolates of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 associated with loss of shiga toxin genes. Current Microbiol. 38: 48-50.1999

4. Jun Terajima, Hidemasa Izumiya, Akihito Wada , Kazumichi Tamura, and Haruo Watanabe. A higher rate of the asymptomatic Shiga-toxin producing *Escherichia coli* O157:H7 shedding in adults in Japan . Emerg. Inf. Diseas. 1999. (in press)

Dendrogram of PFGE Types of EHEC O157
isolates during May - June period in 1998



イクラ関連株
(IIa, IIb, I)

The dendrogram shows the genetic relationships between various EHEC O157 isolates. The tree is rooted at the bottom and branches upwards. A large rectangular box encompasses the central portion of the tree, highlighting a specific cluster. Within this box, a smaller rectangular box highlights a sub-cluster of isolates. The labels on the right side of the tree identify these clusters: 'イクラ関連株 (IIa, IIb, I)' for the innermost cluster, 'Type II (IIa - n)' for the larger cluster, and 'Types III - VII, Non-descriptors (ND)' for the remaining isolates.

Type II
(IIa - n)

Types III - VII,
Non-descriptors (ND)

各部で収集している病原体等について

国立感染症研究所 H11.8

収集している病原体等	収集している目的	提供元	経費(研究費等)
【ウイルス第1部】 インフルエンザウイルス	1①又② 2 3③ 6	地方衛生研究所及び 世界各国のナショナルセンター	厚生科学研究費 (新興・再興)
ライノウイルス及びRSウイルス	1①又② 3③	" "	経常研究費
水痘ウイルス	3③ 4 6	医療機関	経常研究費
クラミジア	1① 5	地方衛生研究所	経常研究費
コクシエラ	1① 5	地方衛生研究所	経常研究費
リケッチア(オリエンチラを含む)	1① 5	地方衛生研究所	経常研究費
リッサウイルス	1①	大学	経常研究費
デングウイルス	1① 4	地方衛生研究所、医療機関	厚生科学研究費、感染症研究費
日本脳炎ウイルス	1①又② 4	地方衛生研究所	厚生科学研究費、経常研究費
単核ヘルペスウイルス1型	1 ② 3③ 4 5 6 7	地方衛生研究所、医療機関、大学等	特になし
単核ヘルペスウイルス2型	1 ② 3③ 4 5 6 7	医療機関、大学等	特になし
ヒトヘルペスウイルス6型	1 ② 3③ 4 5 6 7	医療機関	特になし
エプスタイン・バーウイルス1型及び2型	1 ② 3③ 4 5 6 7	医療機関、大学等	特になし
その他のヒトヘルペスウイルスの実験室株(樹状細胞ウイルス、サイトメガロウイルス、ヒトヘルペスウイルス7型)	5 6	国外の専門の施設	経常研究費
【ウイルス第2部】 小型球形ウイルス	1① 3③ 4	地方衛生研究所	厚生科学研究費
E型肝炎ウイルス	4	インド、中国	厚生科学研究費
エンテロウイルス	4 5 6	地方衛生研究所、世界各国	経常研究費
アストロウイルス	1① 4	医療機関	経常研究費
BKV ウイルス、JCV ウイルス	1①又② 4	大学、医療機関等	経常研究費
ヒトパピローマウイルス	1①又②		
モンスターボックスウイルス、ワクチニアウイルス	1①又② 4	大学、医療機関等	厚生科学研究費 (新興・再興)
【ウイルス製剤部】	行政検査		
ムンプスウイルス	1①又② 3③ 4	地方衛生研究所、医療機関、大学等	経常研究費
A型肝炎ウイルス	1① 3③ 4	地方衛生研究所、医療機関、大学等	経常研究費、厚生科学研究費
B型肝炎HBs 抗原陽性血漿	1①又② 7	日赤	経常研究費
インフルエンザウイルス	2 4	金沢大学	文部省科学研究費
麻疹ウイルス野外株	3 ④ 4 5 6	地方衛生研究所 医療機関(複数機体)	厚生科学研究費(新興・再興)(予防接種研究費)(国際医療協力研究費)、経常研究費
風疹ウイルス野外株 高橋株、T-0336株、松浦株、M33	1① 4	北里研究所、武田薬品、阪大微研	厚生科学研究費(ワクチン評価研究費)、経常研究費
【細菌部】 腸管出血性大腸菌	3③	地方衛生研究所	厚生省・地方衛生研究所・産研のネットワーク(費用の一部は厚生科学研究費(新興・再興)の一部から)
サルモネラ(SE)and(STY)	3③	地方衛生研究所	経常研究費
腸チフス菌	3③	地方衛生研究所	感染症レファレンス費(実行予算)
コレラ菌	3③	地方衛生研究所、検疫所	経常研究費
劇症型A群レンサ球菌(TSLS)	1 ② 3③	地方衛生研究所、医療機関	感染研・感染症研究費
ボレリア菌(ライム病)	1 ② 3③	地方衛生研究所、医療機関	厚生科学研究費(新興・再興)
レジオネラ属菌	1 ② 6	地方衛生研究所、医療機関、大学	経常研究費
ベスト菌	2 6	CDC等	経常研究費
赤痢菌	3③ 6	地方衛生研究所	経常研究費
ピブリオ科	4 6	世界のセンター、地方衛生研究所	経常研究費
類鼻疽菌	6	タイ等	経常研究費
レプトスピラ	6	地方衛生研究所、フィリピン	経常研究費
ボツリヌス菌	6	地方衛生研究所	経常研究費

- 収集して～1. 検査診断 ①抗原(抗体)作製のため ②レファレンス株供与のため。
 いる目的 2. ワクチン株選定のため。
 3. 分子疫学のため地方衛生研究所等に結果を ①戻している。②戻していない。
 4. 感染研での研究、開発のため。 5. 分与のため。 6. 標準株維持。 7. その他

収集している病原体等	収集している目的	提供元	経費(研究費等)
トリポネーマ(梅毒)	6	医療機関	経常研究費
肺炎球菌	6	医療機関	経常研究費
髄膜炎菌(N.mening)	6	地方衛生研究所、医療機関	経常研究費
ボレリア(回帰熱)	6	医療機関	経常研究費
【細菌・血液製剤部】 薬剤耐性菌 VRE、MRSA、多剤耐性緑膿菌、ESBL産生肺炎桿菌、ESBL産生大腸菌、セラチア、その他	30 4 5	医療機関、防衛医科大学	厚生科学研究費
ジフテリア菌	1 ④ 4 5	医療機関、保健所、地方衛生研究所等	稀少感染症研究費
百日咳菌	1 ④ 4 5	医療機関、保健所、地方衛生研究所等	経常研究費
【感染病理部】 インフルエンザウイルス	4	北里研究所	厚生科学研究費、HS事業研究費 経常研究費
麻疹ウイルス	1 ④ 4	大学、医療機関	経常研究費
肝炎ウイルス(B、C、D、E、G型)	1 ④ 4	大学、医療機関	厚生科学研究費、文部省科学研究費
TTウイルス	1 ④ 4	大学、医療機関	厚生科学研究費、文部省科学研究費
ウッドチャック肝炎ウイルス	1 ④ 4	大学	厚生科学研究費、文部省科学研究費
HIV-1	4	大学、医療機関	厚生科学研究費、経常研究費
HTLV-I、II	1 ④ 4	大学	経常研究費
ワクチニアウイルス等	4	大学等	厚生科学研究費、経常研究費
ヒトヘルペスウイルス 6・7・8	1 ④ 4	大学、医療機関	厚生科学研究費
ヒトサイトメガロウイルス	1 ④ 4	大学、医療機関	経常研究費
EBウイルス	1 ④ 4	大学、医療機関	経常研究費
水痘帯状疱疹ウイルス	1 ④ 4	大学、医療機関	厚生科学研究費、文部省科学研究費 経常研究費
単純ヘルペスウイルス	1 ④ 4	大学、医療機関	経常研究費
アデノウイルス	1 ④ 4	大学、医療機関	経常研究費
パピローマウイルス	1 ④ 4	大学、医療機関	経常研究費
ヒトポリオマウイルス(BK、JC)	1 ④ 4	大学、医療機関	経常研究費
パルボウイルス感染組織	1 ④ 4	大学、医療機関	厚生科学研究費、経常研究費
Creutzfeld-Jakob病の脳組織	1 ④ 4	大学、医療機関	厚生科学研究費(新薬・再興)
【エイズ研究センター】 <第一室> ヒト免疫不全ウイルス1型(HIV-1)(およそ50株)	3 ④ 4 5 6	世界各国のナショナルセンター WHO、UNAIDS、医療機関	厚生科学研究費 文部省科学研究費、科学庁研究費
<第二室> レトロウイルス HIV-1, 2 HTLV-1	1 ④又は⑤ 4	大学、医療機関等	特になし
ヘルペスウイルス EBV	1 ④ 4	大学、医療機関等	特になし
<第1研究グループ> HIV-1(およそ800株)	1 ④ 30 4	医療機関	厚生科学研究費
HIV-2	4	国内外の専門の研究者	厚生科学研究費
HTLV-1	4	国内外の専門の研究者	厚生科学研究費
HTLV-2	4	国内外の専門の研究者	厚生科学研究費
<第2研究グループ> HIV-1	1 4	大学、医療機関 ガンビアMRC 研究所	医薬品試験、経常研究費
HIV-2	4	ガンビアMRC 研究所	HS財団、経常研究費

- 収集して～1. 検査診断 ①抗原(抗体)作製のため ②レファレンス株供与のため。
 いる目的 2. ワクチン株選定のため。
 3. 分子疫学のため地方衛生研究所等に結果を ①戻している。②戻していない。
 4. 感染研での研究、開発のため。 5. 分与のため。 6. 標準株維持。 7. その他