

第39週の小児感染性胃腸炎患者便からNV (G2)が検出された。第42週以降は小児感染性胃腸炎患者便から連続的にNVが検出されたが、いずれも核酸配列では95%以上の相同性が認められた。佐渡島検出株と県内検出株の間に核酸配列の相違は見られたが、アミノ酸配列では100%一致し(図2)、Maryland 6タイプ(G2)類似株であった(新潟株)。調査14地域中、検査定点がない地域が10地域あったが、4地域で連続的に検出されたジェノタイプは同一であり、この新潟株が主流として県内で流行していたことが示唆された。

### 3. 感染性胃腸炎集団発生事例検出株の検討

調査期間中、16件の集団発生事例があり、感染源に食品が疑われたものが4件、病院、保育所、学校、養護施設、介護老人施設等における集団発生が12件あり、これらで検出されたNVは4つのジェノタイプに分けられた。病院、保育所等の施設での集団感染事例で検出したNVのジェノタイプは先に述べた新潟株であり、集団代表株間の相同性は最大99%、アミノ酸配列で100%一致した(図2)。感染源が食品と推定された事例ではそれぞれ異なるジェノタイプが検出されたが、食中毒を疑った事例検出株と、病院、保育所等集団発生事例検出株間の遺伝子相同性は代表株間で最大87%であった。

### 4. 小児感染性胃腸炎原因ウイルスと感染性胃腸炎集団発生原因ウイルスの関連

食中毒事件として調査した1件は家族内事例であり、有症の幼児2人からのみNVが検出された。この事例では飲食店での食事と幼稚園への体験入園があったが、当該幼稚園では患者発生はなかった。ウイルス学的には、同地域の同時期の小児感染性胃腸炎患者検出株と99%の相同性を示す新潟株が多数検出された。

佐渡島内では10月16日に小学校で感染性

胃腸炎の集団発生があり、検出したNVは、第39週(10月1日)に採取した父母を含む家庭内発生による小児感染性胃腸炎検出株と同一の新潟株であった。同小学校での発生はその後、家庭内感染を引き起こし、同町の中学生や保育園でも患者発生が確認され、さらには隣接市町村の保育所でも集団発生がみられた。この時期、41週の佐渡島内定点あたりの報告数は第41週6.5と急増し、その後隣接町村の保育所でも集団発生が確認された43週での報告数は9.5と県内で最高の数値となった(図1)。

介護老人施設で集団発生した6件中3件では、入院先の病院で医療スタッフへの二次感染が認められ、今期流行のNVの新潟株は感染性が非常に強いことが推定された。また、嘔吐、下痢等の臨床症状はこれまでのより少し強く、持続期間も多少長い様であった。このことより、新潟株はMaryland 6タイプ(G2)類似株ではあるが、これまでの報告がない新しい型の可能性が示唆され、ウイルス学的検討は現在進行中である。なお、類似の国内の報告はまだ無い。欧州での2002年にGH4のバリエーションによる流行が報告され、患者数の増加、時期的にも春や初夏とこれまでとは異なる疫学形態を示し、新型ではないかともされ、我々の株との異同の検討が必要と思われた。

### 5. サーベイランスデータと感染性胃腸炎集団発生時期との関連

各地域の感染性胃腸炎発生動向と感染性胃腸炎集団発生の両疾患の関連性について、GISを用い時系列、空間的に検討した(図3)。施設内での集団発生はサーベイランス定点報告が始まると同時に起こり、その後は報告数の急増に伴い、集団発生が見られている。

従って、感染性胃腸炎の集団発生防止には、サーベイランスの動向より報告数が増加に転じた時点で、速やかに注意喚起を促す必要があると思われる。また、汚染食品による食

中毒は、保菌者を介して次なる集団発生につながる可能性があるため、検出株の遺伝子解析データを県内のみならず全国規模で共有できることが重要と考えられる。

#### D. 結論

1. 感染源に食品が疑われる感染性胃腸炎集団発生事例では、種々のジェノタイプのNVが検出された。

2. 県内各地の小児感染性胃腸炎患者と病院、保育所、学校、養護施設、介護老人施設等における感染性胃腸炎集団事例の糞便からアミノ酸配列で100%一致するNVのG2に属するMaryland 6タイプ類似株（新潟株）が主流として県内で流行していたことが示唆された。

3. 患者入院先で医療スタッフへの二次感染が多数見られ、伝染力、臨床症状の強さ、県内での流行規模から、新潟株はMaryland 6タイプ(G2)類似株ではあるが、これまでの国内で見られたのとは異なる新型である可能性が示唆された。

4. サーベイランス定点での感染性胃腸炎患者報告数の増加が見られると、その直後に同地域で感染性胃腸炎の集団発生が見られ、同じジェノタイプのNVが検出された。

以上から、感染性胃腸炎の集団発生防止には、サーベイランスの動向より報告数が増加に転じた時点で、速やかに注意喚起を促す必要があると思われる。また、汚染食品による食中毒は、保菌者を介して次なる集団発生につながる可能性があり、検出株の遺伝子解析データを県内のみならず全国規模で共有できることが重要と考えられた。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) 鈴木宏。感染性胃腸炎（ロタウイルスについて）。Infectious Diseases Report. 6:2003.

2) 西川眞。ノーウオークウイルスによる急性非細菌性流行性胃腸炎と小児急性胃腸炎の分子疫学的研究。新潟医学会誌。117:251-264, 2003.

##### 2. 学会発表

日本小児科学会。福岡（4月、2004）分野別シンポジウム5. 集団食中毒、ウイルス性感染。－Norovirusを中心として－

感染性胃腸炎患者報告数が5を超えたときに、集団発生が相次いで報告された

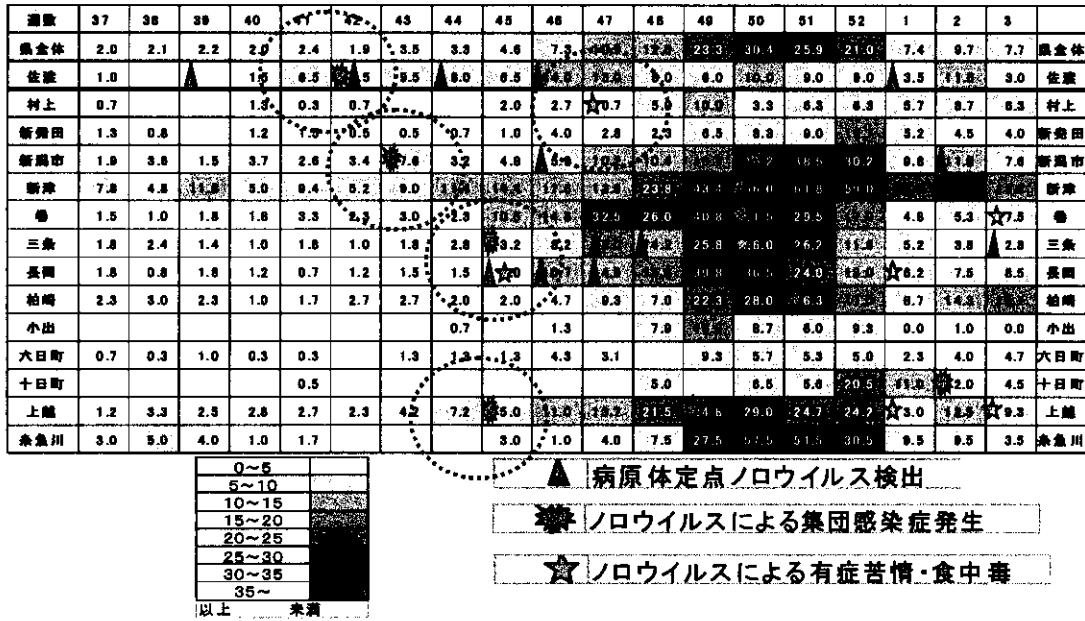


図1. 県内の感染性胃腸炎の発生動向とノロウイルスの検出状況

S03-1514_10-01_Su_Sado	1	AGAGCCGTGTTAGCAGCGAGCCTTAGAAATCATGGTCAAGTTCTCCCCAGAGCCGCATCTG	60
S03-1546_10-24_Ou_Sado	1	AGAGCCGTGTTAGCAGCGAGCCTTAGAAATCATGGTCAAGTTCTCCCCAGAGCCGCATCTG	60
S03-1583_11-07_Ou_Sanj	1	AGAGCCGTGTTAGCAGCGGGCCTTAGAAATCATGGTCAAGTTCTCCCCAGAGCCGCATCTG	60
S03-1628_11-13_Ou_Jyou	1	AGAGCCGTGTTAGCAGCGGGCCTTAGAAATCATGGTCAAGTTCTCCCCAGAGCCGCATCTG	60
S03-1644_11-21_Ot_Nagao	1	AGAGCCGTGTTAGCAGCGGGCCTTAGAAATCATGGTCAAGTTCTCCCCAGAGCCGCATCTG	60
S03-1674_12-09_Ou_Jyou	1	AGAGCCGTGTTAGCAGCGGGCCTTAGAAATCATGGTCAAGTTCTCCCCAGAGCCGCATCTG	60
S03-1695_12-10_Ot_Sanj	1	AGAGCCGTGTTAGCAGCGGGCCTTAGAAATCATGGTCAAGTTCTCCCCAGAGCCGCATCTG	60
S03-1697_12-10_Su_Sanj	1	AGAGCCGTGTTAGCAGCGGGCCTTAGAAATCATGGTCAAGTTCTCCCCAGAGCCGCATCTG	60
S03-1747_12-15_Ou_Niit	1	AGAGCCGTGTTAGCAGCGGGCCTTAGAAATCATGGTCAAGTTCTCCCCAGAGCCGCATCTG	60
S03-1775_12-22_Ou_Maki	1	AGAGCCGTGTTAGCAGCGGGCCTTAGAAATCATGGTCAAGTTCTCCCCAGAGCCGCATCTG	60
S03-1801_12-24_Ou_Kashi	1	AGAGCCGTGTTAGCAGCGGGCCTTAGAAATCATGGTCAAGTTCTCCCCAGAGCCGCATCTG	60
N5_01-05_Ou_Niiga	1	AGAGCCGTGTTAGCAGCGGGCCTTAGAAATCATGGTCAAGTTCTCCCCAGAGCCGCATCTG	60
S04-26_01-05_Ot_Nagao	1	AGAGCCGTGTTAGCAGCGGGCCTTAGAAATCATGGTCAAGTTCTCCCCAGAGCCGCATCTG	60
S04-69_01-13_Ou_Toka	1	AGAGCCGTGTTAGCAGCGGGCCTTAGAAATCATGGTCAAGTTCTCCCCAGAGCCGCATCTG	60
S03-1514_10-01_Su_Sado	61	GCCCAAAAGGTTGCAGAAGACCTTCTTTCTCCAGCGGTGATGGACGTGGGTGATTTCAAA	120
S03-1546_10-24_Ou_Sado	61	GCCCAAAAGGTTGCAGAAGACCTTCTTTCTCCAGCGGTGATGGACGTGGGTGATTTCAAA	120
S03-1583_11-07_Ou_Sanj	61	GCCCAAAAGGTTGCAGAAGACCTTCTTTCTCCAGCGGTGATGGACGTGGGTGATTTCAAA	120
S03-1628_11-13_Ou_Jyou	61	GCCCAAAAGGTTGCAGAAGACCTTCTTTCTCCAGCGGTGATGGACGTGGGTGATTTCAAA	120
S03-1644_11-21_Ot_Nagao	61	GCCCAAAAGGTTGCAGAAGACCTTCTTTCTCCAGCGGTGATGGACGTGGGTGATTTCAAA	120
S03-1674_12-09_Ou_Jyou	61	GCCCAAAAGGTTGCAGAAGACCTTCTTTCTCCAGCGGTGATGGACGTGGGTGATTTCAAA	120
S03-1695_12-10_Ot_Sanj	61	GCCCAAAAGGTTGCAGAAGACCTTCTTTCTCCAGCGGTGATGGACGTGGGTGATTTCAAA	120
S03-1697_12-10_Su_Sanj	61	GCCCAAAAGGTTGCAGAAGACCTTCTTTCTCCAGCGGTGATGGACGTGGGTGATTTCAAA	120
S03-1747_12-15_Ou_Niit	61	GCCCAAAAGGTTGCAGAAGACCTTCTTTCTCCAGCGGTGATGGACGTGGGTGATTTCAAA	120
S03-1775_12-22_Ou_Maki	61	GCCCAAAAGGTTGCAGAAGACCTTCTTTCTCCAGCGGTGATGGACGTGGGTGATTTCAAA	120
S03-1801_12-24_Ou_Kashi	61	GCCCAAAAGGTTGCAGAAGACCTTCTTTCTCCAGCGGTGATGGACGTGGGTGATTTCAAA	120
N5_01-05_Ou_Niiga	61	GCCCAAAAGGTTGCAGAAGACCTTCTTTCTCCAGCGGTGATGGACGTGGGTGATTTCAAA	120
S04-26_01-05_Ot_Nagao	61	GCCCAAAAGGTTGCAGAAGACCTTCTTTCTCCAGCGGTGATGGACGTGGGTGATTTCAAA	120
S04-69_01-13_Ou_Toka	61	GCCCAAAAGGTTGCAGAAGACCTTCTTTCTCCAGCGGTGATGGACGTGGGTGATTTCAAA	120
S03-1514_10-01_Su_Sado	121	GTATCAATCAATGAGGGTCTCCCTCCGGGGTGCCTTGACCTCCCAATGGAATTCATC	180
S03-1546_10-24_Ou_Sado	121	GTATCAATCAATGAGGGTCTCCCTCCGGGGTGCCTTGACCTCCCAATGGAATTCATC	180
S03-1583_11-07_Ou_Sanj	121	ATATCAATCAATGAGGGTCTCCCTCCGGGGTGCCTTGACCTCCCAATGGAATTCATC	180
S03-1628_11-13_Ou_Jyou	121	ATATCAATCAATGAGGGTCTCCCTCCGGGGTGCCTTGACCTCCCAATGGAATTCATC	180
S03-1644_11-21_Ot_Nagao	121	ATATCAATCAATGAGGGTCTCCCTCCGGGGTGCCTTGACCTCCCAATGGAATTCATC	180
S03-1674_12-09_Ou_Jyou	121	ATATCAATCAATGAGGGTCTCCCTCCGGGGTGCCTTGACCTCCCAATGGAATTCATC	180
S03-1695_12-10_Ot_Sanj	121	ATATCAATCAATGAGGGTCTCCCTCCGGGGTGCCTTGACCTCCCAATGGAATTCATC	180
S03-1697_12-10_Su_Sanj	121	ATATCAATCAATGAGGGTCTCCCTCCGGGGTGCCTTGACCTCCCAATGGAATTCATC	180
S03-1747_12-15_Ou_Niit	121	ATATCAATCAATGAGGGTCTCCCTCCGGGGTGCCTTGACCTCCCAATGGAATTCATC	180
S03-1775_12-22_Ou_Maki	121	ATATCAATCAATGAGGGTCTCCCTCCGGGGTGCCTTGACCTCCCAATGGAATTCATC	180
S03-1801_12-24_Ou_Kashi	121	ATATCAATCAATGAGGGTCTCCCTCCGGGGTGCCTTGACCTCCCAATGGAATTCATC	180
N5_01-05_Ou_Niiga	121	ATATCAATCAATGAGGGTCTCCCTCCGGGGTGCCTTGACCTCCCAATGGAATTCATC	180
S04-26_01-05_Ot_Nagao	121	ATATCAATCAATGAGGGTCTCCCTCCGGGGTGCCTTGACCTCCCAATGGAATTCATC	180
S04-69_01-13_Ou_Toka	121	ATATCAATCAATGAGGGTCTCCCTCCGGGGTGCCTTGACCTCCCAATGGAATTCATC	180

図2 病院・保育所・老人保健施設等で検出したノロウイルス各株の核酸配列

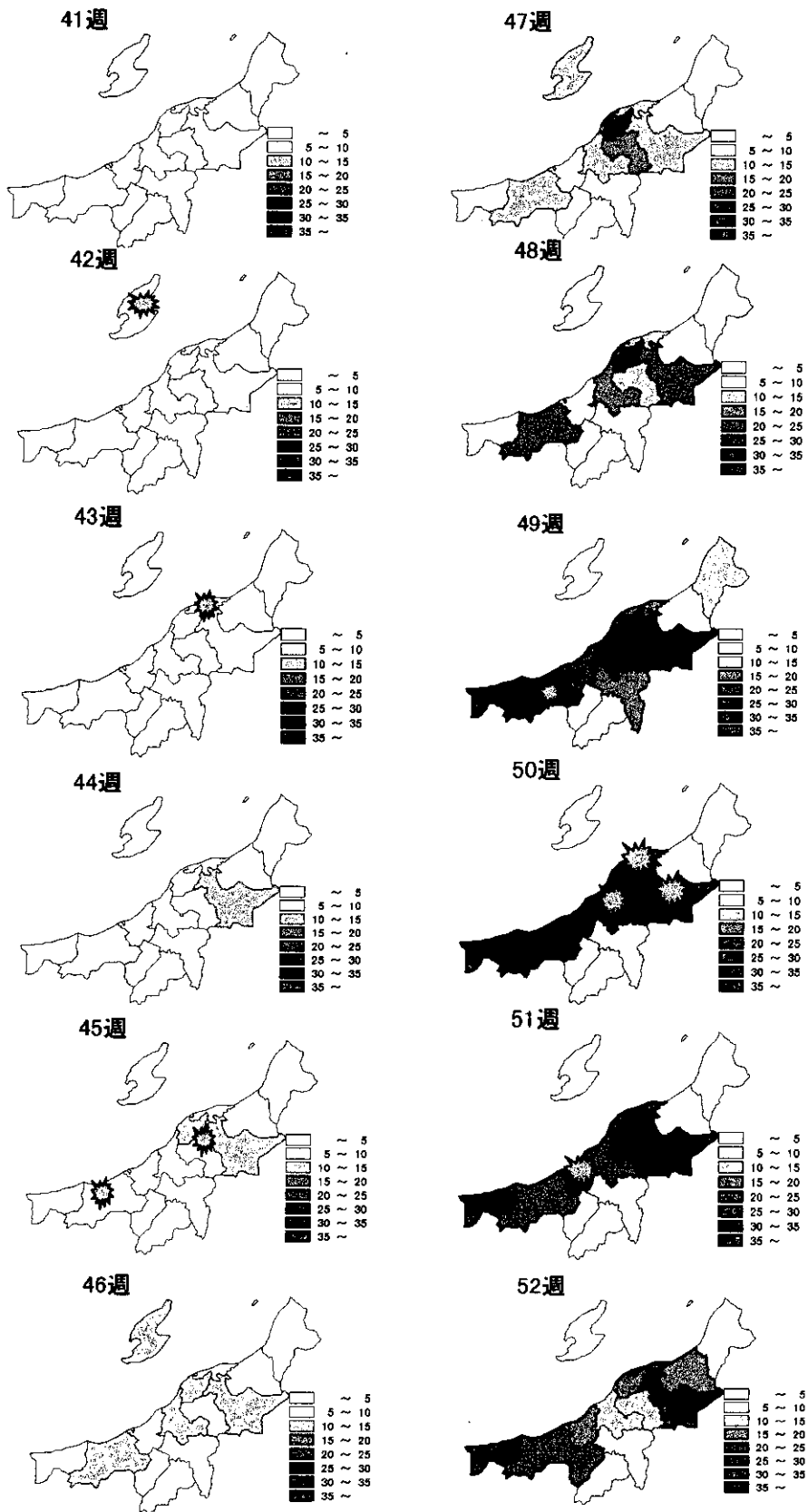


図3 サーベイランス報告数階層の推移と集団発生との関連

平成 15 年度 厚生労働科学研究費補助金（食品安全確保研究事業）

分担研究報告書

食品中の微生物汚染状況の把握と安全性の評価に関する研究

分担研究項目「食品中の細菌汚染状況の把握と安全性の評価に関する研究」

分担研究者 国立感染症研究所感染症情報センター 伊藤 健一郎

研究協力者 佐賀県衛生薬業センター微生物課 森屋 一雄

栃木県保健環境センター微生物部 岡本 その子

概要

下痢原性大腸菌の新しいカテゴリーとして提唱されている付着性大腸菌の病原性はまだ明快ではない。また、食品の本菌による汚染状況の調査もほとんどされていない。今年度は下痢原性大腸菌の検査法と、食品における細菌汚染状況の調査を行った。

局在性付着大腸菌では、（１）同じ *eae* 遺伝子型（ $\gamma$ ）に含まれる 055:H7 と 0157:H7 の *espA* 遺伝子は、0157:H7 の配列から設計したプライマーで検出された。データベースでは配列はかなり異なっているが、少なくとも日本の分離株はよく似た型と推測される。（２）EPEC の病原性試験として標準的な FAS 法は判定が困難であるが、アクチンの蓄積を FITC-ファロイジンで、菌を DAPI で染色することで判定が容易となった。（３）H 抗原検査は何度も運動性強化を行う必要があり、時間と手間がかかる。PCR による検査法を検討した。EPEC カテゴリーを多く含む H2、H6、H8 及び H11、H21 を 2 回の Multiplex PCR で検出することができる。

食品の汚染状況調査の対象に漬物以外に茹で麺、生カキを加えた。セレウス菌分離を目的に、浅漬け 37 検体と麺類 19 検体を調査した。陽性がそれぞれ 8 件（21.6%）と 6 件（31.6%）で、分離されたセレウス菌はほとんどがエンテロトキシンが陽性であった。また、下痢原性大腸菌分離を目的に、生カキ 36 検体を調査した。19 検体（52.8%）が陽性であった。3 検体が基準（食品衛生法、生食用生カキの規格基準：最確数 230/100g 以下）をオーバーしていた。市販血清で型別できた株の血清型は O153（3 株）、O8（2 株）、O126（1 株）であった。既知病原因子（LT,ST,VT,侵入性）は検出されなかった。O153 が分離された生カキの加工場の周辺海域の環境調査を実施したところ、海水から O153 を分離した。

## A 研究目的

ヒトに下痢を起こす大腸菌は、下痢原性大腸菌と総称され、いろいろな病原機序を持っている。また、1979年に Cravioto らが「培養細胞に付着する大腸菌群が疫学的に下痢原性菌と関連している」ことを報告してから、細胞付着性が注目されている。付着型の異なる2種類の大腸菌が下痢原性とされ、従来の病原血清型大腸菌 (EPEC) を「腸管粘膜上皮細胞に細胞骨格障害を生じる志賀毒素非産生性の下痢原性大腸菌」、腸管凝集性大腸菌 (EAggEC) を「凝集型で接着し、既知の腸管毒素を産生しない大腸菌」と定義して、既知の3つのカテゴリーの大腸菌、(1) 腸管毒素原性大腸菌、EPEC、病原因子は腸管毒素と定着因子、(2) 腸管侵入性大腸菌、EIEC、病原因子は細胞侵入性、(3) 腸管出血性大腸菌、EHEC、病原因子はベロ毒素、に加え5つのカテゴリーとする成書が多い。

しかし、付着性大腸菌には病原性を持たない菌も含まれている。海外の患者対照研究では、両菌群ともその病原的有意性を否定する結果が報告されている。我々の佐賀県、埼玉県及び愛知県の患者及び健常人の比較調査においても、大腸菌の付着に関連する遺伝子、*eae* (インチミン)、*aggR* (凝集性付着発現因子)、*astA* (凝集性大腸菌の耐熱性腸管毒素) の保有状況には有意性が見られなかった。他の必須な遺伝子が脱落・変異している可能性や遺伝子の発現がなく生物活性を持たない可能性が考えられる。引き続き、生物活性検査法の検討を行った。平成13年度の調査において、EPECの病原関連遺伝子 *espA* が *eae* 遺伝子型 ( $\gamma$ ) 保有大腸菌では検出されなかったが、PCR検査法を再検討した。

また、平成13年にはキムチによる O157 の全国的な流行が見られた。野菜は感染源としては2次的なものと考えられていたが、さまざまな食品が大腸菌感染症の原因となることが確認、または推定されているが、汚染度調査は十分ではない。今年度は、漬物に加え、麺類や生カキの汚染状況の予備調査を行った。

## B 研究方法

### 1. 遺伝子検査法の検討

#### A) *espA* 検出用 primer

*espA* 遺伝子には DNA 多型が知られている。前回 primer 設計時には同じ *eae* 遺伝子型 ( $\gamma$ ) に属するため設計の対象としなかった O157:H7 由来の *espA* を加え、CLUSTALW (<http://clustalw.genome.ad.jp/>) で多重アラインメントを行い、相同性の高い部分を primer の位置とした。O119 の *espA* は相同性が低いため、それ以外の配列の共通 primer に加え、特異的に増幅する antisense primer を加えた。primer の融解温度 ( $T_m$ ) を 55°C に設定した。primer 設計支援プログラムは Primer3 ([http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3\\_www.cgi](http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi)) を使用した。

#### B) H抗原検出用 PCR

付着性大腸菌に多い H 抗原として、H2, H6 を対象とした。また、O26 群の H 抗原検査用に、H8, H11, H21 を対象とした。primer 設計支援プログラムは Molecular Beacon 2 (バイオラッド) を使用した。

#### C) PCR

寒天平板上に一夜培養した菌体を 100  $\mu$ l の蒸留水に懸濁し、100°C で 10 分加熱したものをテンプレートとした。反応液は最終 25  $\mu$ l

で、0.2 μM primer 溶液、0.1mM dNTP 混液、1.5mM MgCl<sub>2</sub> 溶液、0.5U Taq DNA ポリメラーゼ(プロメガ)、テンプレート 2.4 μl である。GeneAmp9600 システム(パーキンエーラー)を使用し、5 分間の熱変性を行い、熱変性 94°C、30 秒、アニーリング 55°C、1 分、伸長反応 72°C、1 分 30 秒を 25 回繰り返す、最後に 72°C、10 分間の最終伸長反応を行った。産物は電気泳動で分離し、エチジウムブロミド染色後、トランスイルミネータのもとで写真を撮った。プライマーの合成はグライナー ジャパンに依頼した。

## 2. 生物活性検査法の検討

アクチンの重合を観察する FAS 試験は局在付着性大腸菌の生物活性測定の標準法であるが、大腸菌による重合の他に細胞自身が持つ重合があり判定が難しい。大腸菌の核酸染色を組み合わせて改良した。

24 ウエルプレートに直径 12mm のカバーガラスを入れ、10%FBS 加 Eagle's MEM で  $2 \times 10^5$ /ml に調整した HEP-2 細胞を 1 ml/ウエル接種し、37°C、5%CO<sub>2</sub> 下で 48 時間培養した。上清を吸引して PBS で洗浄後、HEPES-Eagle's MEM を 1ml/ウエル接種した。

被検菌は、非選択分離培地上のコロニーから Antibiotic Medium No.3、1ml に接種し 30°C、一夜静置培養後、10 μl を Antibiotic Medium No.3、1ml に加え、37°C 2 時間振とう培養した。この培養液を準備した細胞のプレートに 10 μl/ウエル加え 37°C、5%CO<sub>2</sub> 下に 3 時間置いた後、上清を吸引して PBS で 3 回洗浄後 3%ホルマリンで 20 分固定した。0.1%Triton X-100 加 PBS で 5 分処理後、PBS で 3 回洗浄して 5 μg/ml FITC-phalloidin

(シグマ) 加 PBS で 20 分染色した。PBS で 3 回洗浄し DAPI 染色して封入した。

鏡検は、微分干渉顕微鏡で大腸菌が細胞に付着しているのを確認後、BV 励起、UV 励起 (400 倍) で観察した。

## 3. 食品の細菌汚染状況調査

今年度は、対象食品として漬物以外に茹で麺、生カキを加えた。佐賀県の K 保健所で行った。検査項目としては、一般生菌数、大腸菌群、腸管出血性大腸菌 O157、下痢原性大腸菌検査を行った。大腸菌群は、デスオキシコレート法による集落の計測を行った。大腸菌は公定法の糞便系大腸菌推定試験 (44.5°C 培養) に加え、EC 培地(37°C) 及び O157 免疫ビーズ法とクロモアガー-O157 培地により検査し、分離株について性状検査及び血清型の検査を行って同定した。同時にサルモネラ属菌・セレウス菌の定性試験を行った。

## 4. 細菌検査法

セレウス菌の下痢毒素産生性はデンカ生研の RPLA を用いた。

大腸菌の血清型別はデンカ生研の診断用免疫血清 (1 号セット、2 号セット) を用いた。O 抗原血清型はスライド凝集試験で行った。H 抗原血清型は試験管凝集法で行った。

## C 結果・考察

### 1. 遺伝子検査法の検討

#### A) *espA* 検出用 primer

平成 15 年 6 月現在にデータベースに登録されている大腸菌の *espA* を全て検出できるとされる primer を設計した。Primer は表 1 に、結果は表 2 に示した。*eae* 陽性の大腸菌からは調べた限り検出された。O157:H7 特異的な PCR の結果から、今回調べた O55:H7 株



は、データベースに載っている配列 (AJ225020) ではなく、同じ *eae* 遺伝子型 ( $\gamma$ ) に属する O157:H7 に似ていると推定された。

#### B) H抗原検出用PCR

H 抗原の検査は、何度も運動性強化を繰り返す必要がある場合が多く、時間と手間がかかる。現在 H1~H54 まで登録されている。産物の特定が簡単に行えるように、増幅断片の大きさを変えて設計した。結果は図 1 に示した。各 H 型を特異的に検出できる。5 対の primer を混合し、Multiplex PCR を試みたところ、ほとんどの H 型は予期したとおりの結果であったが、H40 の株では H8 と同じサイズの断片が増幅された。これは *EcofliCH11ks* と *EcofliCH8kas* の組み合わせで増幅されていた (結果未記載)。この組み合わせを含まない Multiplex PCR は可能である。しかし、H 抗原では番号が与えられていないものもあり、最終的に凝集反応で決定する必要がある、PCR は参考にはなるが、まだ検討の余地がある。

#### 2. 生物活性検査法の検討

FAS 法の条件を検討した。大腸菌の核酸を DAPI 染色で、重合したアクチンを FITC-phalloidin で染色した。結果は図 2 に示した。大腸菌の直下に起きるアクチン重合は 2 重に染色され、細胞の形態維持などのために細胞自身が持つ重合アクチンは単染色されるだけなので判定が簡単になる。

#### 3. 食品の細菌汚染状況調査

まとめを表 3 に示した。

漬物ではセレウス菌分離を目的に白菜、野沢菜、きゅうりを原材料とした浅漬け 37 検体を NGKG 培地で分離培養した。結果は 8 件

(21.6%) が、陽性であった。分離された 8 株中 7 株 (87.5%) が、セレウス菌エンテロトキシンが陽性であった。

ゆで麺類ではセレウス菌分離を目的にうどん、そば、ちゃんぽん等の麺類を 19 検体行った。6 件 (31.6%) が、陽性であったが 4 件は同一製造施設であった。分離された 6 株中 4 株 (66.7%) が、セレウス菌エンテロトキシンが陽性であった。

生カキでは、下痢原性大腸菌分離を目的に、36 検体を、EC 培地増菌培養後、クロモカルト培地にて大腸菌を分離し、血清型別、既知病原遺伝子検査 (LT、ST、VT、侵入性; PCR 法) を行なった。大腸菌は、19 検体 (52.8%) が陽性であった。菌数としては、3 検体が最確数 230/100g 以下の基準 (食品衛生法: 生食用生カキの規格基準) をオーバーしていた。市販血清型に凝集を示した株は、6 検体あり、その血清型は O153 3 株、O8 2 株、O126 1 株であった。既知病原因子は、検出されなかった。

O153 が分離された生カキは、加工場 (いかだ) が、河川流入水、周辺海域の影響を受けていると思われたため環境調査 (河川流入水、海水) を実施した。その結果、海水から O153 を分離した。

#### D 結論

平成 15 年 6 月現在にデータベースに登録されている大腸菌の *espA* を全て検出できる primer を設計した。O55:H7 株は、データベースに載っている配列 (AJ225020) ではなく、同じ *eae* 遺伝子型 ( $\gamma$ ) に属する O157:H7 に似ていると推定された。

H 抗原の検査は、何度も運動性強化を繰り返

返す必要がある場合が多く、時間と手間がかかる。H2、H6、H8、H11、H21を特異的に検出できた。一方、EcofliCH11ks と EcofliCH8kas の組み合わせにより H40 の株では H8 と同じサイズの断片が増幅された。H抗原は最終的に凝集反応で決定する必要があり、PCR は参考にはなるが、まだ検討の必要がある。

生物活性測定の標準法である FAS 法を改良した。大腸菌の直下に起きるアクチン重合は 2 重に染色され、細胞自身が持つ重合アクチンは単染色されるだけなので判定が簡単になる。

食品の細菌汚染状況調査は、セレウス菌分離を目的に、浅漬け 37 検体とゆで麺類 19 検体行った。結果は陽性がそれぞれ 8 件 (21.6%) と 6 件 (31.6%) で、分離されたセレウス菌はほとんどがエンテロトキシンが陽性であった。生カキでは、下痢原性大腸菌分離を目的に、36 検体行った。大腸菌は、19 検体 (52.8%) が陽性であった。

セレウス菌については、正確な菌種同定方法の検討が必要だと思われた。

## E. 発表業績

### 1. 論文発表

1) Hirose K, Ito K, Arakawa E, Tamura K, Watanabe H: DNA-based diagnosis method for typhoid fever and paratyphoid fever, and the screening method for *Salmonella enterica* serovar Typhi and serovar Paratyphi A with decreased susceptibility

to fluoroquinolones by PCR-restriction fragment length polymorphism(RFLP). Res Adv Microbiology 3:109-121, 2003.

2) Young-Hee L, Hirose K, Izumiya H, Arakawa E, Takahashi H, Terajima J, Ito K, Tamura K, Sung-Il K, Watanabe H: Multiplex polymerase chain reaction assay for selective detection of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Jpn J Infect Dis 56:151-155, 2003.

### 2. 学会発表

1) 古川友子、伊藤健一郎他：下痢原性大腸菌の *cesT* 遺伝子多型は *tir* 遺伝子型と一致する. 第 77 回日本細菌学会総会. 大阪、2004. 4.

2) 山崎貢、伊藤健一郎他：腸炎ビブリオの耐熱性溶血毒素類似毒 (TDH-related hemolysin:TRH) 陽性株の分布及び TRH 遺伝子の塩基配列解析について. 第 78 回日本感染症学会総会. 東京、2004. 4.

3) 松下秀、伊藤健一郎他：腸管出血性大腸菌ベロ毒素遺伝子の LAMP 法を利用したタイピング試薬キットの検討. 第 78 回日本感染症学会総会. 東京、2004. 4.

4) 古川友子、伊藤健一郎他：病原血清型大腸菌の *eae*、*tir*、*cesT* 遺伝子多型. 第 76 回日本細菌学会総会. 奈良、2003. 4.

5) 伊豫田淳、伊藤健一郎他：LEE 遺伝子群非保有型志賀毒素産生性大腸菌に存在する病原性遺伝子の解析型. 第 76 回日本細菌学会総会. 奈良、2003. 4.

表 1. 本研究で使用したプライマー

primer	位置	5' - 配列 - 3'	長さ	Tm	産物長	
EPEC 分泌タンパク質 ( <i>espA</i> )						
espA_EDL933ks	148-	TCTTATATGTATCAGGCACAAAGTA	25	54.8		
espA_EDL933kas2	500-	AATGTATTCGACATTTGCTG	20	53.3	353bp	
espAcomks1	194-	CTGATATGAATGAGGCATCTAA	22	54.3		
espAcomkas1	530-	AYATCAGAACGTGCACTCG	19		337bp	
espA119kas	526-	GCATATCTGAACGAGCATT	20	55.1	333bp	
大腸菌 H 抗原 ( <i>fliC</i> )						
H-2	EcofliCH2ks	685-	TATTATGAAGTTACTGTGGAGGATG	25	54.2	172bp
	EcofliCH2ks	856-	TAGAAGCGGTTGCGGTATC	19	54.1	
H-6	EcofliCH6ks	774-	ATATTCCGCCGCTTCTGATG	20	55.2	417bp
	EcofliCH6kas	1190-	CCTGTTGTTACGCTATAAGTCTTAG	25	55.4	
H-8	EcofliCH8ks	556-	ACTTATACCGTGAATGTGGAGAG	23	55.4	213bp
	EcofliCH8kas	768-	GCCAGTGTTGTTAGTAAATGTAATG	25	55.1	
H-11	EcofliCH11ks	546-	TGGCGGTGATGCTTATACTG	20	54.7	120bp
	EcofliCH11kas	665-	GCTATGTTTGTGTCAGATTTAGTTG	25	55.1	
H-21	EcofliCH21ks	625-	ACTGCGGATGGTTCACTTAC	20	54.9	271bp
	EcofliCH21kas	895-	GCGTTCAGATCAAGATCAGATAG	20	54.9	

表2. インチミン型及び血清型における espA 遺伝子の検出

KI No.	O	H	HMA type	espAcom	espA_O119	espA_EDL933
1582	63	NM	a1	+		
1228	127	6	a1	+		
1469	142	6	a1	+		
1223	157	45	a1	-	+	
1458	55	51	a2	-	+	
1434	UT	NM	a3	-	+	
1220	128	2	b1	+		
1235	153	7	b1	+		
1237	UT	NM	b1	+		
1748	26	8	b1	+		
1221	26	11	b2	+		
1392	26	11	b3	+		
1513	26	NM	bNew	+		
1231	55	7	c1	+		
1517	55	7	c1	+		+
1553	55	7	c1	+		+
1518	55	NM	c1	+		+
1316	111	19	c1	-	+	-
1423	157	NM	c1	+		+
1286	UT	NM	c1	+		+
1699	63	6	c2	+		-
1700	63	6	c2	+		
1314	78	19	c2	-	+	-
1531	115	19	c2	-	+	-
1701	126	6	c2	+		
1232	153	19	c2	-	+	-
1492	124	40	c3	+		+
1218	153	21	d1	+		
1440	UT	7	d2	+		

表3. 食品中の細菌汚染調査

		検体数	陽性数	毒素産生
セレウス菌	漬物	37	8(22%)	7(19%)
	茹で麺	19	6(32%)	4(21%)
大腸菌	生カキ	36	19(53%)	0

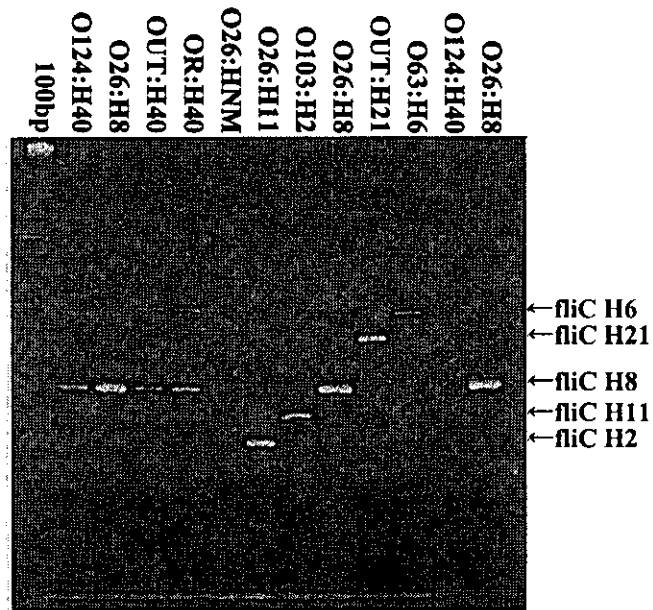


図 1. H 抗原検出用 PCR 産物の電気泳動像

レーン 1 は分子量マーカー(100bp ラダー)。レーン 2~11 は Multiplex PCR の産物を、レーン 12、13 は H8 の Monoplex PCR の産物を電気泳動した。

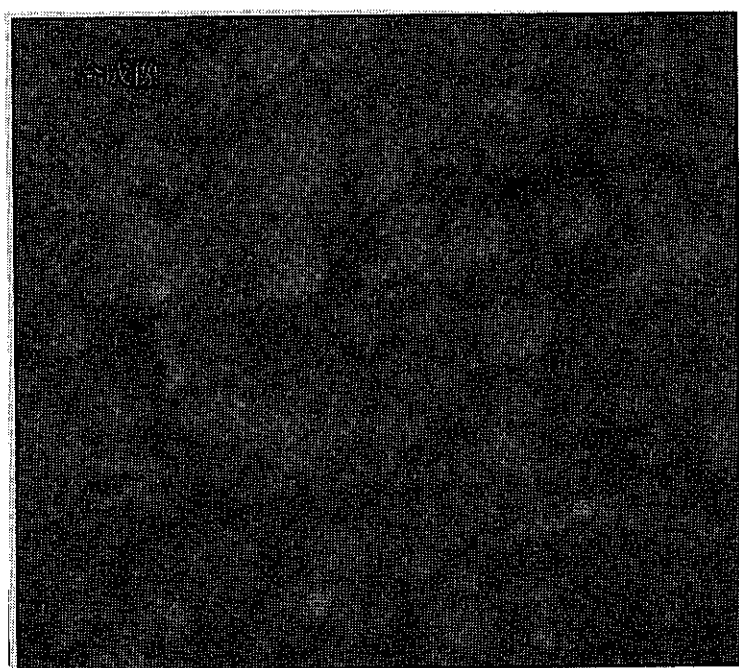
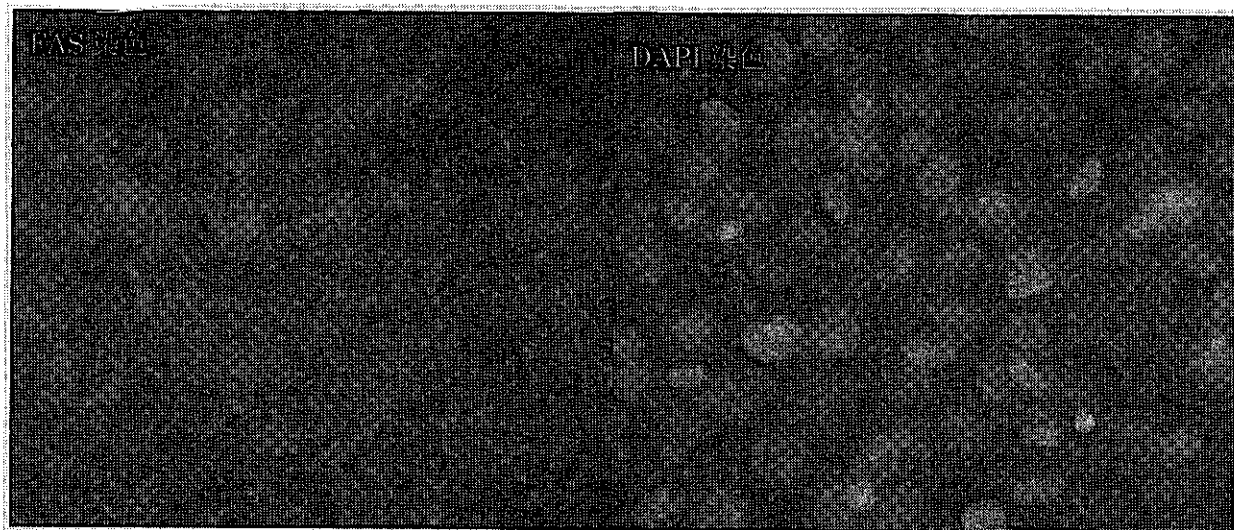


図 2. 生物活性試験の検討

FAS 試験の際に、同時に大腸菌の核酸を DAPI 染色することにより判定が簡単になった。

# IV

研究成果の刊行物・別冊



## 研究成果の刊行物・別冊

### 平成 13 年度

1. 藤本嗣人、近平雅嗣、増田邦義、長谷川斐子、西尾治：兵庫県における過去 8 年間（1993～2000 年）のエンテロウイルス検出・同定状況、兵庫衛研年報、36：75-81、2001
2. 鈴木宏：SRSV(小型球形ウイルス)、化学療法の領域、17:1897-1902、2001
3. 藤本嗣人、近平雅嗣、増田邦義、吉田茂、籠ひとみ、今井恵介、三舛信一郎、長谷川斐子、西尾治：エンテロウイルス 71 型による脳炎死亡例を含む手足口病の流行—兵庫県、病原微生物検出情報、22:144-145、2001
4. 新川奈緒美、伊東祐治、西尾治：ウチムラサキ貝が原因で夏季に発生したノーウォーク様ウイルスによる食中毒事例—鹿児島県—、病原微生物検出情報、22:222-223、2001
5. 入谷展弘、勢戸祥介、久保英幸、小笠原準、春木孝祐：保育所で発生したノーウォーク様ウイルスによる集団胃腸炎事件 - 大阪市-、病原微生物検出情報、22：317、2001
6. Fukuda S, Takao S, Shimazu Y, Miyazaki K : Prevalence of Norwalk viruses in Southern and Northern parts of Hiroshima Prefecture, Japan in 2000/2001 season. *Jpn J Infect Dis.* 54:153-154, 2001
7. Belliot G, Noel J, Li J, Seto Y, Humphrey C, Ando T, Glass RI, Monroe SS: Characterization of capsid genes, expressed in the baculovirus system, of three new genetically distinct strains of “Norwalk-like viruses”. *J Clin Microbiol.* 39:4288-4295, 2001
8. Wang QH, Nishio O, Ushijima H, et al. : Genetic analysis of the capsid region of astrovirus. *J Med Virol.* 64:245-255, 2001
9. Kadoi K, Suzuki H, Nishio O : Isolation of Cosackievirus B5 from Pigs. *Microbiologica.* 24:217-222, 2001
10. Kudo S, Ushijima H, et al. : Molecular characterization in the VP7, VP4 and NSP4 genes of human rotavirus serotype 4(G4) isolated in Japan. *Microbiol Immunol.* 45: 167-171, 2001

11. Zhou Y, Ushijima H, et al.: Characterization of human rotavirus serotype G9 isolated in Japan and Thailand from 1995 to 1997. *J Med Virol.* 65:619-628, 2001
12. Jonassen CM, Ushijima H, Grinde B, et al.: Comparison of capsid sequences from human and animal astroviruses. *J Gen Virol.* 82:1061-1067, 2001
13. Ono K, Rai SK, Chikahira M, Fuzimoto T, Shibata H, et al.: Seasonal distribution of enteropathogens detected from diarrheal stool and water samples collected in Kathmandu, Nepal. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 32(3):520-526, 2001
14. 福田伸治、高尾信一、河崎智彦、山本一夫、住井賢一、正岡亮太、片平尚貴、島津幸枝、宮崎佳都夫:感染経路が解明された Norwalk virus 食中毒事例、広島県保健環境センター研究報告、10:15-18、2002
15. Adah M. I, Wade A, Oseto M, Kuzuya M, Taniguchi K: Detection of Human Group C Rotaviruses in Nigeria and Sequence Analysis of Their Genes Encoding VP4, VP6, VP7 Proteins. *J Med Virol.* 66:269-275, 2002

#### 平成 14 年度

16. 福田伸治:アストロウイルス、総合臨床、51:2971-2975、2002
17. 久保英幸、入谷展弘、勢戸祥介、村上司、春木孝祐:感染性胃腸炎患者からのパレコウイルス 1 型および 2 型の分離 —大阪市—、病原微生物検出情報、23:64、2002
18. 勢戸祥介、入谷展弘、久保英幸、阿部仁一郎、村上司、春木孝祐:事業所給食によるノーウォーク様ウイルス食中毒事例 — 大阪市—、病原微生物検出情報、23:64-65、2002
19. Iritani N, Seto Y, Kubo H, Haruki K, Ayata M, Ogura H: Prevalence of 'Norwalk-like virus' infections in outbreaks of acute nonbacterial gastroenteritis observed during the 1999-2000 season in Osaka City, Japan. *J Med Virol.* 66: 131-138, 2002
20. Fukuda S, Takao S, Shimazu Y, Miyazaki K: An application of microplate hybridization assay for the confirmation and probe typing of "Norwalk-like viruses". *Microbiol Immunol.* 46(7):495-498, 2002
21. 原みゆき、古屋由美子、片山丘、今井光信:ウイルス性食中毒の発生状況(平成 14 年度)、神奈川県衛生研究所研究報告、33:80-82、2003

22. 入谷展弘、久保英幸、勢戸祥介、春木孝祐、西尾治、武田直和、村上司、簗城昇次、改田厚、綾田稔、小倉壽：平成 14 年度に検出されたノーウォークウイルスの遺伝子型別、大阪市立環境科学研究所報告 調査・研究年報、平成 14 年度版 第 65 集：29-37、2003
23. 野田衛、西尾治、秋山美穂、国井悦子、藤井彰人、池田義文、平崎和孝、荻野武雄：市販カキにおけるノロウイルスの定量的汚染調査、広島市衛生研究所年報、22:61-66、2003
24. 福田伸治、高尾信一、桑山勝、島津幸枝、宮崎佳都夫：小児科領域の検体から検出した Sapovirus の遺伝子学的解析、広島県保健環境センター研究報告、11:27-29、2003

#### 平成 15 年度

25. 鈴木宏：感染性胃腸炎(ロタウイルスについて)、Infectious Diseases Report、6:2003
26. 西川眞：ノーウォークウイルスによる急性非細菌性流行性胃腸炎と小児急性胃腸炎の分子疫学的研究、新潟医学会誌、117:251-264、2003
27. 勢戸祥介、入谷展弘、小倉壽：ウイルスによる食中毒、医薬ジャーナル、39：1457-1461、2003
28. 入谷展弘、勢戸祥介：ノロウイルス感染症、生活衛生、47：34-39、2003
29. 岡藤隆夫、岡藤輝夫、藤本嗣人、近平雅嗣：アデノウイルス感染症—免疫クロマト法による迅速診断法の有用性について—、外来小児科、6：293-295、2003
30. 西尾治、西香南子、福田伸治、西田知子、篠原美千代、三上稔之、沖村容子、新川奈緒美、杉枝正明、古屋由美子、大瀬戸光明、鈴木宏：ウイルス性食中毒の病因、臨床とウイルス、31：163-170、2003
31. 福田伸治、高尾信一、桑山勝、島津幸枝、宮崎佳都夫：ウイルス性食中毒の発生の特徴、日本食品微生物学会雑誌、20(4):203-209、2003
32. 福田伸治、宮崎佳都夫：乳幼児感染性胃腸炎患者における Norwalk virus, Sapporo virus および Human astrovirus の検出状況と流行型、感染症学雑誌、77:965-970、2003
33. 植木洋、秋山和夫、渡辺徹、大村達夫：遺伝子相同性にもとづく Norovirus (NV) のカキへの汚染経路の解明、環境工学研究論文集、40：607-616、2003

34. 西尾治:ノロウイルスによる食中毒の発生とその防止について、Kewpie News、357号、2003
35. 藤本嗣人、近平雅嗣、芥川宏、西尾治:兵庫県阪神地域における妊婦および0-9歳児のノロウイルスに対する中和抗体保有状況について、兵庫県立健康環境科学研究センター年報、2:103-106、2003
36. 藤本嗣人、近平雅嗣、秋山美穂、西尾治:ノロウイルス検査におけるRNA抽出コントロールとしてのエコーウイルス9型Hill株の適用について、兵庫県立健康環境科学研究センター年報、2:107-110、2003
37. 藤本嗣人、近平雅嗣、増田邦義、西尾治、吉田 茂:日本において一般的に軽症と考えられている手足口病が、兵庫県において死亡例と後遺症例を含む、重症中枢神経患者を多発させたケースに関する調査研究、ひょうごの公衆衛生、18:23-24、2003
38. 山上隆也、大屋とし子、中澤美佳子、窪田玲子、望月町子、大石陽子、嶋村博、秋山美穂、西尾治:最近2年間に小児から検出された下痢症ウイルスについて-A群ロタウイルスのG血清型別結果-、山梨中病年報、30:80-81、2003
39. 徳竹由美、中村友香、横内文子、村松紘一、西尾治:長野県における食中毒集団発生事例からのノロウイルスの検索、長野県衛公研報告、26:16-22、2003
40. 藤本嗣人、近平雅嗣、岡藤輝夫、岡藤隆夫:アデノウイルスによる滲出性扁桃炎-兵庫県、病原微生物検出情報、24:136-137、2003
41. 西田知子、野田衛、三上稔之、篠原美千代、春木孝祐、大瀬戸光明、加藤由美子、秋山美穂、西尾治:市販生食用カキのノロウイルス汚染状況、病原微生物検出情報、24:317、2003
42. 杉枝正明、古屋由美子、大瀬戸光明、藤本嗣人、新川奈緒美、田中俊光、長谷川斐子、秋山美穂、西尾治:輸入生鮮魚介類におけるノロウイルス汚染状況、病原微生物検出情報、24:317-318、2003
43. 近平雅嗣、藤本嗣人、池野まり子、押部智宏:2002/2003シーズンのノロウイルスの施設内流行事例-兵庫県、病原微生物検出情報、24:319-320、2003
44. Nishida T, Kimura H, Saitoh M, Shinohara M, Kato M, Fukuda S, Munemura T, Mikami T, Kawamoto A, Akiyama M, Kato Y, Nishi K, Kozawa K, Nishio O: Detection, quantitation, and phylogenetic analysis of noroviruses in Japanese oysters. *Appl Environl Microbiol.* 69(10):5782-5786, 2003