

厚生労働科学研究費補助金

新興・再興感染症研究事業

広域における食品由来感染症を迅速に探知するために必要な情報に関する研究

平成18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 寺嶋 淳

平成19（2007）年 4月

目次

1. 平成 18 年度総括研究報告書

広域における食品由来感染症を迅速に探知するために必要な情報に関する研究……………1		
主任研究者	寺嶋 淳	国立感染症研究所 細菌第一部

2. 平成 18 年度分担研究報告書

グループ 1：細菌

(I) 国立感染症研究所

広域における食品由来感染症を迅速に探知するために必要な情報に関する研究……………15		
主任研究者	寺嶋 淳	国立感染症研究所 細菌第一部
分担研究者	渡辺 治雄	国立感染症研究所 細菌第一部
協力研究者	泉谷 秀昌	国立感染症研究所 細菌第一部
	伊豫田 淳	国立感染症研究所 細菌第一部
	三戸部治郎	国立感染症研究所 細菌第一部
	大岡 唯祐	宮崎大学・医学部・医学科
	林 哲也	宮崎大学・医学部・医学科
	楠本 正博	東洋紡・バイオフィロンティアプロジェクト推進室

(II) 北海道・東北・新潟ブロック

a) 北海道・東北・新潟ブロック内の PFGE 画像解析に関する施設間差……………30

分担研究者	長野 秀樹	北海道立衛生研究所
協力研究者	木村 浩一	北海道立衛生研究所
	伊東 拓也	北海道立衛生研究所
	合田 悟	北海道立衛生研究所
	和栗 敦	青森県環境保健センター
	八柳 潤	秋田県健康環境センター
	斎藤志保子	秋田県健康環境センター
	藤井伸一郎	岩手県環境保健研究センター
	谷津 壽郎	宮城県保健環境センター
	金子 紀子	山形県衛生研究所
	渡邊奈々子	福島県衛生研究所
	佐々木寿子	新潟県保健環境科学研究所
	広地 敬	札幌市衛生研究所
	沼田 昇	仙台市衛生研究所

b) 大腸菌 IS 配列による疫学調査の検討……………38

協力研究者	木村 浩一	北海道立衛生研究所
	伊東 拓也	北海道立衛生研究所

	合田 悟	北海道立衛生研究所
分担協力者	長野 秀樹	北海道立衛生研究所

c) 臨床検査機関から分離された散発事例におけるサルモネラ属菌および

Campylobacter coli の PFGE 解析 (岩手県) 41

協力研究者	藤井伸一郎	岩手県環境保健研究センター
	太田美香子	岩手県環境保健研究センター
	後藤 徹	岩手県環境保健研究センター

d) *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* による水系食中毒事例の PFGE 法による解析

及び IS-printing System による O157 の解析結果報告 43

協力研究者	渡邊奈々子	福島県衛生研究所	微生物グループ
	小澤 奈美	福島県衛生研究所	微生物グループ
	平澤 恭子	福島県衛生研究所	微生物グループ
	須釜久美子	福島県衛生研究所	微生物グループ
	大竹 俊秀	福島県衛生研究所	微生物グループ

e) サルモネラ食中毒事例および散発サルモネラ症患者から分離された

Salmonella Montevideo の PFGE 解析 46

協力研究者	齋藤 紀行	宮城県保健環境センター
	平塚 雅之	宮城県保健環境センター
	菅原 直子	宮城県保健環境センター
	小林 妙子	宮城県保健環境センター
	渡邊 節	宮城県保健環境センター
	山田 わか	宮城県保健環境センター
	谷津 壽郎	宮城県保健環境センター
	秋山 和夫	宮城県保健環境センター
	廣重 憲生	宮城県保健環境センター

(Ⅲ) 関東・甲・信・静岡ブロック

a) 関東ブロックにおける PFGE 法の精度管理および PFGE 以外の解析方法の検討 48

分担研究者	甲斐 明美	東京都健康安全研究センター
協力研究者	矢萩かをる	茨城県衛生研究所
	船渡川圭次	栃木県保健環境センター
	黒澤 肇	群馬県衛生環境研究所
	倉園 貴至	埼玉県衛生研究所
	依田 清江	千葉県衛生研究所
	石原ともえ	神奈川県衛生研究所
	松本 裕子	横浜市衛生研究所
	野田 裕之	山梨県衛生公害研究所

小山 敏枝	長野県環境保全研究所
川森 文彦	静岡県環境衛生科学研究所
尾畑 浩魅	東京都健康安全研究センター
小西 典子	東京都健康安全研究センター

b) 腸管出血性大腸菌集団食中毒事例および散発事例への応用……………64

1. (1) EHEC O157 集団感染事例

埼玉県衛生研究所

1. (2) EHEC O111 集団感染事例

埼玉県衛生研究所

2. EHEC O157 事例

千葉県衛生研究所

3. EHEC O157 食中毒事例

神奈川県衛生研究所

4. 搾乳体験で STEC O157 による感染が疑われた事例

横浜市衛生研究所

5. EHEC O157 散発事例

長野県環境保全研究所

6. O157 食中毒事例 Diffuse outbreak

東京都健康安全研究センター

c) サルモネラ集団食中毒事例および散発事例への応用

7. *Salmonella* 血清型 Enteritidis による食中毒事例

埼玉県衛生研究所

8. (1) *Salmonella* 血清型 Newport 食中毒事例の概要および分離株の PFGE 画像

静岡県環境衛生科学研究所

8. (2) *Salmonella* 血清型 Enteritidis 食中毒事例の概要および分離株の PFGE 画像

静岡県環境衛生科学研究所

9. *Salmonella* 血清型 Enteritidis による食中毒事例

東京都健康安全研究センター

d) 腸管出血性大腸菌血清型 O157 による集団および家族内発生事例の解析における

variable number of tandem repeats 型別の有効性……………77

協力研究者

横山 栄二

千葉県衛生研究所

内村眞佐子

千葉県衛生研究所

(IV) 東海・北陸ブロック

東海・北陸地方 9 地方衛生研究所のパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE)

の行政への還元と PCR を用いた腸管出血性大腸菌 O157 の型別法

(IS printing system) の検討……………80

分担研究者

松本 昌門

愛知県衛生研究所

研究協力者

鈴木 匡弘

愛知県衛生研究所

児玉 洋江

石川県保健環境センター

白木 豊	岐阜県保健環境研究所
田中 保知	岐阜市衛生試験所
木全 恵子	富山県衛生研究所
奥村貴代子	豊田市衛生検査所
石畝 史	福井県衛生研究所
岩出 義人	三重県科学技術振興センター保健環境研究部
藪谷 充孝	名古屋市衛生研究所

(V)近畿ブロック

a) 広域における食品由来感染症を迅速に探知するために必要な情報に関する研究……99

分担研究者	勢戸 和子	大阪府立公衆衛生研究所
協力研究者	岩崎 由紀	滋賀県衛生科学センター
	藤原 恵子	京都府保健環境研究所
	平野 隆	京都市衛生公害研究所
	小笠原 準	大阪市立環境科学研究所
	中村 寛海	大阪市立環境科学研究所
	横田 正春	堺市衛生研究所
	西海 弘城	兵庫県立健康環境科学研究センター
	福永 真治	兵庫県立健康環境科学研究センター
	黒川 学	神戸市環境保健研究所
	川西 伸也	姫路市環境衛生研究所
	榮井 毅	奈良県保健環境研究センター
	金澤 祐子	和歌山市衛生研究所
	田口 真澄	大阪府立公衆衛生研究所

b) レジオネラ症患者発生に伴うレジオネラ属菌のP F G E解析……125

協力研究者	藤原 恵子	京都府保健環境研究所 細菌ウイルス課
	江崎 久雄	京都府保健環境研究所 細菌ウイルス課
	森垣 忠啓	京都府保健環境研究所 細菌ウイルス課

c) 堺市におけるセレウス菌食中毒事例分離菌株の嘔吐毒産生性及び

それらの分子疫学的解析の検討……131

協力研究者	横田 正春	堺市衛生研究所
	大中 隆史	堺市衛生研究所
	山内 昌弘	堺市衛生研究所
	内野 清子	堺市衛生研究所
	下迫 純子	堺市衛生研究所
	中村 武	堺市衛生研究所
	田中 智之	堺市衛生研究所

d) 奈良県における下痢症患者便中の細菌性病原因子の保有状況……137

協力研究者	榮井 毅	奈良県保健環境研究センター
	中山 章文*	奈良県保健環境研究センター

(*現. 奈良県立奈良病院)

e) 下痢原性大腸菌の混合感染による修学旅行食中毒事例……………140

分担研究者	勢戸 和子	大阪府立公衆衛生研究所
協力研究者	田口 真澄	大阪府立公衆衛生研究所
	山崎 渉	大阪府立公衆衛生研究所
	塚本 定三	大阪府立公衆衛生研究所

(VI) 中国四国ブロック

a) 中国四国ブロックにおけるパルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE 法) の
精度管理について……………146

分担研究者	田中 博	愛媛県立衛生環境研究所
研究協力者	榊 美代子	広島県保健環境センター
	大原 祥子	広島県保健環境センター
	中嶋 洋	岡山県環境保健センター
	大島 律子	岡山県環境保健センター
	最首 信和	鳥取県衛生環境研究所
	吉田 紀美	愛媛県立衛生環境研究所
	砂原千寿子	香川県環境保健研究センター
	絹田 美苗	高知県衛生研究所
	谷脇 妙	高知県衛生研究所
	森 敏彦	徳島県保健環境センター
	蔵田 和正	広島市衛生研究所
	笠間 良雄	広島市衛生研究所
	富田 正章	山口県環境保健研究センター

b) 広域における食品由来感染症を迅速に探知するために必要な情報に関する研究……157

分担研究者	田中 博	愛媛県立衛生環境研究所
研究協力者	榊 美代子	広島県保健環境センター
	大原 祥子	広島県保健環境センター
	中嶋 洋	岡山県環境保健センター
	大島 律子	岡山県環境保健センター
	吉田 紀美	愛媛県立衛生環境研究所
	砂原千寿子	香川県環境保健研究センター
	絹田 美苗	高知県衛生研究所
	谷脇 妙	高知県衛生研究所
	蔵田 和正	広島市衛生研究所
	笠間 良雄	広島市衛生研究所

c) 腸管出血性大腸菌 O157 の分子疫学的解析における IS-Printing System の検討…… 170

研究協力者	青木 紀子	愛媛県立衛生環境研究所
-------	-------	-------------

	吉田 紀美	愛媛県立衛生環境研究所
分担協力者	田中 博	愛媛県立衛生環境研究所
d) 散発例由来 <i>Salmonella Infantis</i> の遺伝子解析の検討		174
研究協力者	大原 祥子	広島県保健環境センター
	榊 美代子	広島県保健環境センター
	妹尾 正登	広島県保健環境センター
e) 腸管出血性大腸菌 O157:H7 感染事例由来株の分子疫学的解析法の検討		
—MLVA とパルスネットのパターン比較—		177
研究協力者	渡邊 朱美	広島市衛生研究所生物科学部
	国寄 勝也	広島市衛生研究所生物科学部
	蔵田 和正	広島市衛生研究所生物科学部
	石村 勝之	広島市衛生研究所生物科学部
	笠間 良雄	広島市衛生研究所生物科学部
	松本 勝	広島市衛生研究所生物科学部
	吉岡 嘉暁	広島市衛生研究所生物科学部

(Ⅶ)九州ブロック

a) 九州地区における食品由来感染症の拡大防止・予防に関する取り組み		
— IS-printing System に関する基礎的研究 —		195
分担研究者	堀川 和美	福岡県保健環境研究所
研究協力者	瓜生 佳世	福岡市保健環境研究所
	徳崎 里美	北九州市環境科学研究所
	眞子 純孝	佐賀県衛生薬業センター
	山崎 省吾	長崎県衛生公害研究所
	植木 信介	長崎市保健環境試験所
	八尋 俊輔	熊本県保健環境科学研究所
	杉谷和加奈	熊本市環境総合研究所
	緒方喜久代	大分県衛生環境研究センター
	河野喜美子	宮崎県衛生環境研究所
	上野 伸広	鹿児島県環境保健センター
	久高 潤	沖縄県衛生環境研究所
	小野塚大介	福岡県保健環境研究所
	大岡 唯祐	宮崎大学・医学部
	林 哲也	宮崎大学・医学部・フロンティア
	楠本 正博	東洋紡績・バイオフィロンティアプロジェクト推進室
b) レジオネラ属菌の PFGE の精度管理、及び九州各機関で検出された		
<i>Legionella pneumophila</i> serogroup 1 の PFGE による比較解析		210
研究協力者	河野喜美子	宮崎県衛生環境研究所
	岡田 美香	宮崎県衛生環境研究所
	村上 光一	福岡県保健環境研究所

野田多美枝	福岡県保健環境研究所
徳崎 里美	北九州市環境科学研究所
眞子 純孝	佐賀県衛生薬業センター
植木 信介	長崎市保健環境試験所
江原 裕子	長崎市保健環境試験所
緒方喜久代	大分県衛生環境研究センター
八尋 俊輔	熊本県保健環境科学研究所
杉谷和加奈	熊本市環境総合研究所
松岡由美子	熊本市環境総合研究所
上野 伸広	鹿児島県環境保健センター
久保園祥子	鹿児島県環境保健センター
久高 潤	沖縄県衛生環境研究所

c) *Campylobacter jejuni* 分子疫学解析の検討……………219

研究協力者	八尋 俊輔	熊本県保健環境科学研究所
	上野 伸広	鹿児島県環境保健センター
	山崎 省吾	長崎県衛生公害研究所
	堀川 和美	福岡県保健環境研究所

グループ2： ウイルス

(I) 食品中のノロウイルス検出法の開発……………231

分担研究者	武田 直和	国立感染症研究所	ウイルス第二部
協力研究者	小林 慎一	愛知県衛生研究所	

(II) ノロウイルスイムノクロマトキットの開発……………235

分担研究者	田中 智之	堺市衛生研究所
-------	-------	---------

(III) 日本版カリシネットの整備……………239

分担研究者	染谷 雄一	国立感染症研究所	ウイルス第二部
-------	-------	----------	---------

グループ3： 原虫

(I) 消化管寄生性原虫類の遺伝子型解析と分子疫学的研究……………283

分担研究者	八木田健司	国立感染症研究所	寄生動物部
協力研究者	板垣 匡	岩手大学	農学部
	泉山 信司	国立感染症研究所	寄生動物部

(II) 各種動物における *Cryptosporidium* の保有状況……………293

分担研究者	黒木 俊郎	神奈川県衛生研究所	微生物部
協力研究者	泉山 信司	国立感染症研究所	寄生動物部
	宇根 有美	麻布大学獣医学部	獣医学科

加藤 行男	麻布大学獣医学部 獣医学科
林谷 秀樹	東京農工大学農学部 獣医学科
橋本 温	阿南工業高等専門学校
市原 眞一	徳島県立佐那河内いきものふれあいの里 ネイチャーセンター

(Ⅲ) 下水処理によるクリプトスポリジウムおよびジアルジアの除去に関する研究……………298

分担研究者	森田 重光	麻布大学環境保健学部
-------	-------	------------

(Ⅳ) 利根川水系におけるクリプトスポリジウム及びジアルジア汚染の実態調査 ……………306

分担研究者	秋葉 道宏	国立保健医療科学院 水道工学部
分担研究者	片山 浩之	東京大学大学院 工学系研究科
研究協力者	西澤 博	国立保健医療科学院 水道工学部

3. 研究成果の刊行に関する一覧表……………320

厚生労働科学研究費補助金（新興再興感染症 研究事業）

平成 18 年度総括研究報告書

広域における食品由来感染症を迅速に探知するために必要な情報に関する研究

主任研究者 寺嶋 淳 国立感染症研究所細菌第一部第一室長

研究要旨：

食品由来感染症のうち細菌を原因とする広域感染症を迅速に探知する目的で、菌学的情報システム（パルスネット）構築のために標準化 PFGE 解析プロトコールによる精度管理と感染研でのデータベース化を継続した。IS-printing system による腸管出血性大腸菌 0157 の解析を行い、PFGE 等従来の型別法との比較及び実用上の改良点についての検討を行った。一方、結果を集約してデータベース化するためには解析方法の標準化などの改良が必要と考えられた。Multilocus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) による腸管出血性大腸菌 0157 の解析から、PFGE パターンが一致する広域分離株においてもさらに異なる MLVA タイプを示す変異型の株が存在する可能性があることが示唆された。また、MLVA, PFGE のいずれによっても同一タイプとなる 0157 が存在することは、これらの株がなんらかの関連性をもつ可能性を示唆するものと考えられた。

ウイルス性食中毒の主要な原因ウイルスであるノロウイルスについて、組換えバキュロウイルスで発現した 4 種類のノロウイルス (NoV) 中空粒子に対するポリクローナル抗体を結合した磁気ビーズを作製した。この磁気ビーズの濃縮性および特異性はともに高く、また RT-PCR 阻害物質が多量に含有する抽出液からも NoV を回収することができることから、食品中の NoV 検出検査法一つとして、有用な手段と考えられた。ノロウイルスの検査診断方法のひとつとして、組換えバキュロウイルスで発現したノロウイルス (NoV) 中空粒子に対するモノクローナル抗体を用いたイムノクロマトキットを開発した。金コロイド標識抗体、ラテックス標識抗体いずれの方法で構築した診断キットの実用化には、非特異反応を抑えることが今後の課題と考えられた。我が国における、カリシウイルスによるウイルス性急性胃腸炎の発生状況の把握と原因ウイルスの遺伝情報のデータベース化をめざし、カリシウイルス研究者らが登録、閲覧できるホームページ（日本版カリシネット）のドラフトを作成した。

広域における原虫感染症を迅速に探知することを目的として、感染源としての水道水源、下水等の環境や野生動物におけるクリプトスポリジウム及びジアルジア分布の調査を行った。また、これらの病原体の分子生物学的情報に関するデータベース構築を目的として水道水源における遺伝子型別濃度分布を明らかにした。ジアルジア及びクリプトスポリジ

ウムの検出診断法のひとつとして、医療現場での免疫クロマト診断法について評価を行った。

分担研究者

グループ1：

長野秀樹（北海道立衛生研究所）

甲斐明美（東京都健康安全研究センター）

松本昌門（愛知県衛生研究所）

勢戸和子（大阪府公衆衛生研究所）

田中 博（愛媛県立衛生研究所）

堀川和美（福岡県保健環境研究所）

渡辺治雄（国立感染症研究所）

協力研究者：泉谷秀昌、伊豫田淳、三戸部治郎（感染研）、および各地方衛生研究所関係者（各分担報告書を参照）

グループ2：

武田直和（国立感染症研究所）

染谷雄一（国立感染症研究所）

田中智之（堺市衛生研究所）

協力研究者：小林慎一（愛知県衛生研究所）

グループ3：

秋葉道宏（国立保健医療科学院）

八木田健司（国立感染症研究所）

黒木俊郎（神奈川県立衛生研究所）

片山浩之（東京大学大学院工学系研究科）

森田重光（麻布大学環境保健学部）

協力研究者：板垣 匡（岩手大学農学部）、泉山 信司（感染研）、宇根有美（麻布大学獣医学部）、加藤行男（麻布大

学獣医学部）、林谷秀樹（東京農工大学農学部）、橋本 温（阿南工業高等専門学校）、市原 眞一（徳島県立佐那河内いきものふれあいの里ネイチャーセンター）、西澤 博（国立保健医療科学院）

A. 研究目的

ウイルスや細菌に汚染された食品や原虫に汚染された飲料水は、広域における食品由来感染症を引き起こす原因となり得るため、これらの感染源を迅速に探知するシステムの構築を目的とする。全国の地方衛生研究所及び国立感染症研究所をネットワークで結び、病原体検出法の改良、解析方法の標準化と精度管理を行い、検出ウイルス・細菌等の解析データを疫学情報に連結させたデータベースを構築し、広域における食品由来感染症の発生に即応できる情報を提供する。

B. 研究方法

対象となる病原体別に本研究班を1)細菌、2)ウイルス、3)原虫のグループに分け、それぞれの班を中心に病原体検査法の開発、評価及びその標準化を行う。各グループでの研究方法について以下に述べる。1)細菌グループ；a) 菌学的情報システム（パ

ルスネット) 構築のための基礎的資料を得るため、日本全国(75の地研; 地方衛生研究所)を6ブロックに分け、各ブロック内の地研で分離菌株(腸管出血性大腸菌 0157 等)に対する PFGE 解析プロトコールの標準化と精度管理を継続する。b) IS-printing system による腸管出血性大腸菌 0157 の解析を行い、PFGE 等従来の型別法との比較及び実用上の改良点について検討する。c) Multilocus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) による解析を行い本法の識別能の評価を行う。2) ウイルスグループ; a) 組換えバキュロウイルスにより発現させたノロウイルス (NoV) 抗原を利用して磁気ビーズによる食品中の NoV 検出法の検討を行う。b) NoV の検査診断方法の一つとして NoV 中空粒子に対するモノクローナル抗体を用いたイムノクロマトキットを開発する。c) NoV、サポウイルスを含むカリシウイルスの遺伝情報をデータベース化し関連機関で情報を共有するために、日本版カリシネットのドラフト作成を行う。3) 原虫グループ; 本年度は国内感染の原因解明が遅れているジアルジア感染に関して、疫学的な特徴を整理するとともに、ヒトならびに野生動物に関する病原体情報の解析を行う。また医療現場での下痢症病原体スクリーニングを目的とした免疫クロマト診断法について、ジアルジア及びクリプトスポリジウムの検出感度の評価を行う。

クリプトスポリジウムの保有動物について、これまでの調査で情報が少なかった四国を中心にデータの収集に努めた。今年

度は8種のげっ歯類の腸管内容物 139 検体を対象にして調査した。都下の下水処理場で流入下水および放流水を採取し、*Cryptosporidium* オーシストおよび *Giardia* シストの濃度レベルを調べ、流入下水中の濃度と放流水中の濃度から下水処理による両原虫の除去率を算出した。水道水源のクリプトスポリジウム、ジアルジアの分子生物学的情報に関するデータベースの構築を行うため、首都圏住民の水道水源河川である利根川及びその支川の小山川の6地点を選定し、表流水及び底泥中の遺伝子型別濃度分布を明らかにする。

C. 研究結果及び考察

細菌グループ; 1. 感染研における研究
2006 年に分離された腸管出血性大腸菌 (EHEC) について PFGE 解析を行い、その遺伝子型別に基づいて分離株の動向について調べた。EHEC 0157 では、1791 株に対して 2006 年に分離された新しいサブタイプとして 761 種類、2005 年に分離されたことのあるサブタイプが 36 種類、その他が 12 種類見いだされた。また、EHEC 026 では、440 株に対して 221 種類のサブタイプが見出された。一方、広域共通パターンを示す EHEC 株については、XbaI 消化でのパターンが同一と考えられる 0157 では、3ヶ所以上の異なる都道府県で分離されたパターンが 37 種類存在したが、そのうち 5 箇所以上の都道府県で分離されかつ BlnI 消化でも一致するパターンは 6 種類存在していた。特に、26 都府県から 131 株が分離された Type No a259 のパターンを示す株

について Multilocus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) による解析を行い、このサブタイプを示す株のなかでさらに変異株が存在することを明らかにした。宮崎大学の岡らが開発した IS-printing system を用いて、EHEC 0157 の識別能について PFGE 及び MLVA との比較を行いその実用性を検討した。その結果、IS 法は、迅速性に優れ識別能については PFGE には及ばないもののそれに準じる結果が得られた。検査法の標準化などの改善点が残るものの、迅速な検査法としての有望性が示唆された。

2. 北海道・東北・新潟ブロック

PFGE 画像を正確に解析するには、バンドパターンの認識が重要であり、今回はその認識方法について検討を行った。北海道立衛生研究所に保存されている大腸菌 0157:H7 株から、PFGE 上で比較的太いバンドが多く見られる 7 株を選定し、この中から 6 株を 3 株ずつ分けて、第 1 群および第 2 群試料とした。第 1 群の PFGE 像は 12 月、第 2 群の PFGE 像は 1 月に各地方衛生研究所（地研）に送付した。各地研には、昨年度の PFGE 像であること、および今回の調査の目的を通知した。2 回に分けて送付した画像は、それぞれ各地研において到着後直ちにバンドパターンの入力を行った。入力したバンド位置は、以後訂正しないよう要請した。各地研で 2 群の画像データを同じデータベース上に登録した後、両方のデータを Dice 法および Pearson 法で解析した。同一株である No. 2 と No. 7 についての類似度が 100% 一致を示した地研は、昨年度わず

か 2 施設であったが、本年度も 3 施設にとどまった。昨年度に 100% 一致の結果となった 2 施設は、本年度のバンド指定方法ではいずれも 100% 一致の結果を得られなかった。アルゴリズム別では、昨年度と同様、Dice 法でのみ 100% 一致の結果が得られ、Pearson 法では 100% 一致の結果を得た施設はなかった。本年度 100% 一致の結果が得られた施設は、昨年度より 1 施設増えたが、その他の施設では、類似度の値がすべて減少していた。

本年度の精度管理では、各地研に昨年度と同じ菌株を用いた PFGE 画像データを送付し、全施設同一の泳動像でのバンド読み取りを行い、かつバンド読み取り方法をデントグラフの波形のみに基づいて行うよう指定した。100% 一致の結果が得られなかった施設の殆どでは、昨年度同様、2 つの群に含まれる同一菌株の太いバンドを、片方の群で 1 本、もう一つの群で 2 本と判断していた。各地研での PFGE 担当者が昨年度と同じなのであれば、昨年度と本年度で 100% 一致の結果を出した施設が異なるということは、担当者によってバンド位置の最適な指定方法が異なっているということを示唆するものである。昨年度と同じ PFGE 画像を用い、画像解析における施設間差を検討した結果、年度が異なっても施設間差があることから、バンド指定では、担当者の個人差を吸収できるような明確な基準が必要であることが示された。

3. 関東・甲・信・静岡ブロック

本研究では、関東ブロック 11 地方衛生研究所を対象に、PFGE 法の技術向上のため

の精度管理を行った。また、より正確な分子疫学的解析を行うために、PFGE 法以外の解析方法として、IS-Printing system 解析法および VNTR 法について、その有用性および問題点について検討した。各地研で PFGE 解析をするための共通菌株として、2006 年に分離された腸管出血性大腸菌 0157 (VT1+VT2 産生株および VT2 産生株、各 3 株) 6 株を供試した。各地研で分離された腸管出血性大腸菌及びサルモネラについて PFGE 解析を行い、有用性を検討した。IS-Printing system による解析では、PCR 条件及び DNA 抽出法の検討を行い、異なる PFGE パターンを示す 0157 菌株 18 株、および同じ PFGE パターンを示した 4 組 8 株、合計 26 株について PFGE 型と比較した。VNTR 法については、PFGE 解析のスクリーニングとして VNTR 型別が使用可能であるかについて検討した。腸管出血性大腸菌 0157 の共通菌株 6 株を用いて、11 施設で行った PFGE 解析結果から、各施設ともバンドの分離が良く、非常にシャープであり、今回の条件が解析の基準として適していることが確認された。用いた腸管出血性大腸菌 0157 26 株については、IS-Printing system 解析では、非常に多様性に富む結果を得ることができた。またその多くは、PFGE 解析成績とほぼ相関する成績であった。しかしデータ集計の際、検出バンドの増幅量が異なるため、判定が困難な場合もあった。PFGE 解析と VNTR 解析で、疫学的関連株の全てがクラスターを形成したことから、VNTR 解析は PFGE 解析のスクリーニングと

して有効であることが明らかとなった。IS-Printing system による解析から、PFGE 解析とほぼ同様の成績を得ることができた。本解析法は特別な技術を必要とせず、また解析日数も短いことから非常に有用であると示唆された。しかし、バンドの有無を正確に判断できる泳動像を得るためには、DNA 抽出法等、更に検討が必要である。PFGE 解析と VNTR 解析で、疫学的関連株の全てがクラスターを形成したことから、VNTR 解析は PFGE 解析のスクリーニングとして有効であることが明らかとなった。

4. 東海・北陸ブロック

平成 18 年度東海・北陸ブロックにおける研究の一環として、ブロック内 9 地研での 0157 をはじめ各種病原菌による集団発生時の PFGE 解析結果の行政還元の有無について調査を行った。

ブロック内 9 地研中 5 地研（富山県、岐阜市、岐阜県、福井県、愛知県）が今年度集団発生の際に PFGE を実施し、その結果を行政に還元していた。その件数は 4 地研（岐阜市、岐阜県、福井県、愛知県）が 1 から 3 事例であった。富山県は腸管出血性大腸菌に関しては集団、散發事例全ての菌株、2 類感染症菌については集団事例全ての菌株について PFGE を実施し、その結果を行政へ還元していた。また PFGE を行った病原菌は腸管出血性大腸菌 0157、サルモネラ、赤痢菌及びカンピロバクターであった。残りの 4 地研では今年度は行政に還元した事例がなかったため各地研で検出された 0157、サルモネラ、赤痢菌について

PFGE を実施した。これら 9 地研の PFGE 画像は全て疫学的資料として用いるに足る良質な画像であった。これは過去 6 年間のパルスネット研究班活動の成果であると思われる。今後、東海・北陸ブロック各地研で疫学調査等に PFGE の利用が増大すると予想されるため、PFGE 精度管理等を実施し、東海・北陸 9 地研の PFGE 画像の質を高く保つことが重要であると思われた。今回の調査では 0157 の他にサルモネラ、赤痢菌及びカンピロバクターも PFGE の対象となったことからこれら食中毒菌も今後、精度管理の対象とすべきであろう。

東海・北陸 6 地研で行なった IS printing system の PFGE との解析力、簡便性及び迅速性の比較検討から、本法は PFGE が同じか非常に類似した集団事例由来株を同一若しくは IS パターンのひとつ異なるパターンに分類することから PFGE と解析力に関しては同程度と考えられる。また、簡便性、迅速性に関してはより優れていると思われた。今回の検討で出された若干の修正点を改良することで、PFGE と同じように集団発生時の疫学解析の有力な手段となることが期待される。

5. 近畿ブロック

近畿ブロック内で発生した食中毒事例の解析を行う上で、PFGE 法を共通の疫学指標として使用するため、ブロック内 11 衛生研究所の施設間差および解析者による変動を検討した。また、EHEC 0157 の遺伝子型別法として IS-printing System の有用性を PFGE と比較した。さらに、細菌性食中毒の原因菌として最も事例数の多い

Campylobacter jejuni について EHEC と同様に PFGE 法による遺伝子解析が実施可能であるか検討した。

精度管理株として腸管出血性大腸菌 (EHEC) 0157:H7 5 株を配布し、各施設で実施した PFGE 画像について解析を行った結果、解析者によって小さいサイズのバンド認識にばらつきがあり、画像間の近似度を左右していた。これは、画像ソフトの自動バンド認識を目視で修正したため、画像のコントラストにおける施設間差を解消することにより改善できると考えられた。EHEC 0157 の 75 株を用いた解析から、IS-printing System による解析においては、その実用化に向けて電気泳動条件の統一、テンプレート調整法の検討、PCR 反応の成否を確認できる陽性対照の有無について検討すべきと考えられた。*Campylobacter jejuni* の PFGE 解析について、CDC のホームページで公開されている PulseNet USA の方法を感染研新プロトコルに準じて改変した「*Campylobacter* PFGE Protocol-Kinki」で実施した。*SmaI* と *KpnI* による PFGE 解析の有用性を検討したが、*SmaI* ではバンド数が少なく、*KpnI* では小さいサイズのバンドが近接した。したがって、パルスタイムやこれらの酵素の他の制限酵素についても検討する必要があると考えられた。

6. 中国四国ブロック

PFGE を基盤とした分散型システム (パルスネット) を構築するため、画像解析の精度管理とパルスネットの試行を実施した。2006 年に愛媛県内のウシから分離された

腸管出血性大腸菌（EHEC）の PFGE 画像（0157 : H7、0157 : HUT、026 : H11、0111 : H-の画像）とヒトから分離された EHEC 0157 の PFGE 画像を電子メールで中・四国地区内の 5 地方衛生研究所（地研）に送信して各施設で画像解析を行い、施設間変動の検討を行った。また、各県・市で同時期に分離された EHEC の PFGE 画像との類似度を比較した。ウシ由来 9 株の画像では 6 施設とも各々 9 タイプに判読された。また、クラスター解析では、異なった 3 種類のデンドログラムに区別された。デンドログラムおよびクラスターの類似度に施設間の差異が見られた原因の一つは各解析者によって認識されるバンドの数、位置の違いによるものと考えられた。今後、PFGE の手技および画像の解析精度を高めることにより本システムの信頼性が増すものと思われる。腸管出血性大腸菌 0157、12 株について、IS-Printing System の検討を行い PFGE 法と比較した。その結果、9 事例 12 株は 9 タイプに分類され、PFGE と同等の解析が可能であると思われた。しかし、一部のプライマーの増幅バンドが不明瞭で判定に苦慮する場合があったことから、DNA 抽出および PCR の各段階で条件設定が必要であることが示された。Multiple-Locus Variable Number Tandem Repeats Analysis (MLVA) 解析では、PFGE と比較するとともに、解析に有用なプライマーの検討を行った。同じパルスネットパターンに分類される株は、Vhec1, Vhec4, TR4 の 3 つのプライマーによる繰り返し回数の組合せで表されるとともに、Vhec2, TR3, K11, K37 の 4

つのプライマーによる繰り返し回数の組合せで細分化できることが示唆された。

7. 九州ブロック

九州地区12地方衛生研究所の参加により、平成18年度は 1) IS-printing System に関する基礎的研究、2) レジオネラ属菌のPFGEの精度管理、及び九州各機関で検出された*Legionella pneumophila* serogroup 1のPFGEによる比較解析、

3) *Campylobacter jejuni*分子疫学解析の検討の3課題について実施した。IS printing system の実用化に向けて、DNA 抽出条件、DNAポリメラーゼ量やPCR条件等について、最適条件の検討とブロック内の分離菌株において有用性を検討した。レジオネラ属菌のPFGE についてサイズマーカーとして*Salmonella* Braenderup H9812 株を用い精度管理及び参加10機関分離株についてのPFGE 画像相同性比較を実施した。さらに、平成18年のレジオネラ属菌由来別検出状況を参加機関から収集した。その結果、精度管理を実施した標準菌株3株のPFGE パターンは、6 機関間で90%以上の相同性が見られ、λラダーを使った昨年度よりも良い結果が得られた。しかし、40kb 以下のバンドの検出がばらついたことにより、100%の相同性が得られなかった。従って、菌量の違いによるバンドの濃淡、画像取り込みの際の解像度の問題など技術的なことを今後も検討していく必要があると考えられる。各機関でPFGE を実施した*Legionella pneumophila* serogroup (SG) 1 分離株の総数は90株で、比較解析の結果、90%以上の高い相同性を示す株はその由来

が同一、又は関連があると推定される株であった。その他の由来の関連のない株では、概ね、85%以下の相同性であり、このことから、制限酵素 *SfiI* を使用した PFGE パターンは、由来が異なれば多型を示し、疫学指標としての有用性が示された。さらに、レジオネラ属菌の検出状況調査の結果、九州全体で7 菌種（その他に菌種不明有り）が検出され、そのうち *L. pneumophila* については12 血清型（その他に血清群不明有り）が検出された。

Campylobacter jejuni の PFGE による解析画像を、異なる機関間で有効活用することを目的に、新規マニュアルの作成および reference 株を用いた精度管理試験、制限酵素の選択について九州地区4 機関で検討を行った。精度管理試験では、参加した3 機関において高い相同性が得られた。また、由来の異なる分離株を用いて、制限酵素 *SmaI* に加え、*KpnI* 及び *SmaI+KpnI* を用いて処理後、その泳動パターンを比較した。その結果、*Campylobacter jejuni* の PFGE には、*SmaI* よりも *KpnI* または *SmaI+KpnI* を用いたほうが、バンドパターンの多形性の点で有効であることがわかった。

ウイルスグループ；

組換えバキュロウイルスで発現した4 種類のノロウイルス (NoV) 様中空粒子 (Virus-like particles: VLPs) に対するポリクローナル抗体を結合した磁気ビーズを作製し、その濃縮効果および特異性について検討した。4 種類の GI の VLPs (GI/1 Seto124 株、GI/2 Funabashi258 株、GI/3 Kashiwa645 株、GI/4 Chiba407 株) で作製

した高力価抗体を用いて磁気ビーズを作製した。これらの磁気ビーズは同種の抗原型とのみ結合し、異種の抗原型とは全く反応しないことから、極めて高い特異性を有していることが明らかになった。磁気ビーズの濃縮効率については、1ml、10ml、50ml の PBS/0.1%BSA に NoV 陽性 10%糞便乳剤 100 μ L を添加し磁気ビーズで回収されるウイルスを調べた。その結果、すべての検体から NoV を効率よく回収することができ、磁気ビーズの濃縮効果を確認することができた。今回の検討はモデル実験であり、また添加回収実験は定性的な結果であるが、食品の NoV 検出検査法に抗体結合磁気ビーズは有用な手段であると考えられた。GI、GII を特異的に認識するモノクローナル抗体#3912 および#NS14 を捕獲抗体および標識検出抗体として用いてイムクロマトキットを構築した。2.5%便乳剤 を作製し遠心後、その上清 100 μ l を GI、GII それぞれのキットに滴下し 15 分後に判定した。検出抗体には、これらに金コロイド標識抗体或いはラテックス標識抗体を用いた。RT-PCR 法を golden standard とした場合、イムクロマトキットとの一致率は 68 %、感度 75 %、特異性 55 %であった。これまでの成績に比較して、感度は向上したものの特異性の低下が強く認められた。今後の改良と共に、感度、特異性の向上を図る予定である。現時点ではまだ試作段階ではあるが、ウイルス性急性胃腸炎の発生事例のデータベース化を目指し、地方衛生研究所等の担当者がカリシネットにアクセスし、原因ウイルスや発生地等の疫学情

報に関する項目を登録することができるシステム（ホームページ）を作成した。

原虫グループ；

本年度は国内感染の原因解明が遅れているジアルジア感染に関して、疫学的な特徴を整理するとともに、ヒトならびに野生動物に関する病原体情報を解析した。

国内でヒト感染した遺伝子型として Assemblage A2 ならびに B4 を検出した。一方、東北地方生息の野生ニホンカモシカより 10%前後の割合でジアルジアが検出され、遺伝子型は人畜共通感染型の Assemblage A1 と同定された。また医療現場での下痢症病原体スクリーニングを目的とした免疫クロマト診断法について、市販キットの検出感度を調べた結果、ジアルジアに関しては蛍光抗体染色法と同等の感度が得られたが、クリプトスポリジウムに関しては判断不能で再検討が必要となった。臨床材料を用いた場合の本キットと蛍光顕微鏡の検査結果は一致しており、簡便なスクリーニング法としては有用と考えられた。

兵庫県で発生した簡易水道のクリプトスポリジウム汚染事例から検出されたヘビ由来クリプトスポリジウムの保有動物を探索したところ、これまでにヤマカガシがクリプトスポリジウムに感染していることが明らかになった。今年度はこれまでの調査で情報が少なかった四国を中心にデータの収集に努めた。ペットとして輸入される小型哺乳類は平成 16 年に輸入が禁止されたが、未だに輸入が継続している。今年度は 8 種のげっ歯類の腸管内容物 139

検体を対象にして調査した。種によっては *Cryptosporidium* あるいは *Giardia* を高率に保有していた。

流入下水および放流水中の *Cryptosporidium* オーシスト、*Giardia* シストの濃度を調査した結果、以下の知見が得られた。

- 1) 流入下水中の *Cryptosporidium* オーシスト濃度は 4.0~12.0 oocysts/100mL, *Giardia* シスト濃度は 12.5~42.0 cysts/100mL となり、放流水中の *Cryptosporidium* オーシスト濃度は 0.35~1.08 oocysts/L, *Giardia* シスト濃度は 0.30~12.4 cysts/L となった。
- 2) *Cryptosporidium* オーシストの回収率トレーサーとして、使用条件は限定されるもののクリプトレーサー1号が有効であることを確認した。流入下水中の *Cryptosporidium* オーシストの回収率は約 30%、放流水中の回収率は約 50%であった。
- 3) 得られた平均回収率を用いて、流入下水および放流水中の *Cryptosporidium* オーシスト濃度を補正すると、流入下水中のオーシスト濃度は 12.1~41.4 oocysts/100mL, 放流水中のオーシスト濃度は 0.72~2.24 oocysts/100mL となった。
- 4) 流入下水および放流水中濃度から下水処理による両原虫の除去率を算出したところ、*Cryptosporidium* オーシストでは 97.3~99.7%, *Giardia* シストでは 97.0~99.9%であった。
- 5) DAPI 陽性率から不活化率を算出したと

ころ、*Cryptosporidium* オーシストでは 85.8, 100%, *Giardia* シストでは 0~90.2%であった。

- 6) 下水処理による総合的な不活化率を除去率と DAPI 陽性率から求めた不活化率とを合わせたものとするれば、*Cryptosporidium* オーシストは 99.9, 100%, *Giardia* シストは 97.0~99.99%不活化されることが明らかとなった。

水道水源のクリプトスポリジウム、ジアルジアの分子生物学的情報に関するデータベースの構築を行うため、首都圏住民の水道水源河川である利根川及びその支川の小山川の6地点を選定し、表流水及び底泥中の遺伝子型別濃度分布を明らかにした。オーシスト、シスト濃度は、河川水中ではそれぞれ2~28 オーシスト/40L、1~29 シスト/40L、底泥中ではそれぞれ1~5 オーシスト/g-dry、1~3 シスト/g-dryであった。河川水、底泥中で検出されたオーシストの種・遺伝子型は全てヒトへ感染性を示す *C. parvum* bovine genotype であった。シストは、*G. lamblia* assemblage A のサブグループ I、*G. lamblia* assemblage B であり、2つのタイプともにヒトへの感染性を示す種であった。河川では、2つのタイプが検出されたが、底泥で検出されたのは assemblage B のみであった。

D. 結論

食品由来感染症における広域流行を迅速に探知しその拡大を防ぐためには、病原体解析の共通プロトコールとデータの相互比較を可能にしたシステムの構築が必要

である。細菌感染症においては PFGE を主体とした解析情報ネットワークであるパルスネットの効率的な運用が有効であった。ウイルス感染症では食品からのノロウイルス検出法を確立し、検査診断法としてイムノクロマトキットを開発した。さらに、日本版カリシネットの構築を開始した。クリプトスポリジウム等の原虫感染症では、広域発生原因と成り得る水道水源周辺環境等の病原体分布を明らかにし、その解析情報のデータベース化を目的として一部について遺伝子型を明らかにした。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Terajima J, Tosaka N, Ueno K, Nakashima K, Kitsutani P, Gaynor MK, Park SY, Watanabe H. Shigella sonnei outbreak among Japanese travelers returning from Hawaii. Jpn J Infect Dis. 2006, 59, 282-3.
2. Iguchi A, Iyoda S, Terajima J, Watanabe H, and Osawa H. Spontaneous recombination between homologous prophage regions causes large-scale inversions within the Escherichia coli O157:H7 chromosome. Gene, 2006, 372:199-207
3. Terajima J, Izumiya H, Iyoda S, Mitobe J, Miura M, Watanabe H. Effectiveness of pulsed-field gel electrophoresis for the early detection of diffuse outbreaks

- due to Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Japan. *Foodborne Pathogens and Disease*. 2006, 3(1):68-73.
4. Ogura Y, Kurokawa K, Ooka T, Tashiro K, Tobe T, Ohnishi M, Nakayama K, Morimoto T, Terajima J, Watanabe H, Kuhara S, Hayashi T. Complexity of the genomic diversity in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 revealed by the combinational use of the O157 Sakai OligoDNA microarray and the Whole Genome PCR scanning. *DNA Res*. 2006, 13, 3-14.
 5. Tanaka D, Shima T, Isobe J, Watahiki M, Matsumoto M, Endoh M, Okuno R, Ogata K and Nagai Y. Epidemiology and Molecular Analysis of Group A Streptococci from Patients Involved in Food-Borne Disease Outbreaks in Japan between 1996 and 2003. *Jpn J Infect Dis*. 2006 59(3):202-3
 6. Suzuki M, Tawada Y, Kato M, Hori H, Mamiya N, Hayashi Y, Nakano M, Fukushima R, Katai A, Tanaka T, Hata M, Matsumoto M, Takahashi M, Sakae K. Development of a rapid strain differentiation method for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated in Japan by detecting phage-derived open-reading frames. *J. Appl. Microbiol*. 2006 101(4):938-47.
 7. 久米田裕子、田口真澄、川津健太郎、河合高生、神吉政史、浅尾 努、濱野米一、勢戸和子、山崎 渉、河原隆二、依田知子、石橋正憲、塚本定三、堤 千津、足立和人：学校給食によるカンピロバクター集団食中毒-大阪府，病原微生物検出情報，27:，172-173，2006
 8. Okada M, Tanaka T, Oseto M, Takeda N, Shinozaki K: Genetic analysis of noroviruses associated with fatalities in healthcare facilities. *Arch Virol* 2006;151:1635-1641.
 9. Katayama K, Hansman GS, Oka T, Ogawa S, Takeda N: Investigation of norovirus replication in a human cell line. *Arch Virol* 2006;151:1291-1308.
 10. Hansman GS, Natori K, Shirato-Horikoshi H, Ogawa S, Oka T, Katayama K, Tanaka T, Miyoshi T, Sakae K, Kobayashi S, Shinohara M, Uchida K, Sakurai N, Shinozaki K, Okada M, Seto Y, Kamata K, Nagata N, Tanaka K, Miyamura T, Takeda N: Genetic and antigenic diversity among noroviruses. *J Gen Virol* 2006;87:909-919.
 11. Tomoyuki Tanaka, Noritoshi Kitamoto, Xi Liang, and Mary K. Estes: High efficiency cross-reactive monoclonal antibody production by oral immunization with recombinant Norwalk virus-like particles. *Microbiol. Immunol*. 2006; 50:883-888
 12. Miyoshi T, Uchino K, Matsuo M, Ikeda Y, Yoshida H, Sibata H, Fujii F and Tanaka T. Characterization of Norovirus outbreaks during a non-epidemic season. *Jpn. J. Infect. Dis*. 2006; 59:140-141