

200726029A

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 19 年度 総括・分担研究報告書

(厚生労働科学研究費補助金 新興・再興感染症研究事業)

主任研究者 寺 嶋 淳

国立感染症研究所 細菌第一部

平成 20(2008)年 4 月

目次

1. 平成 19 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 19 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……………17

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

北海道・東北・新潟ブロック内で発生した腸管出血性大腸菌 O157 食中毒事例を用いた

パルスフィールドゲル電気泳動システム (PFGE) と IS-Printing system の比較検討……………28

分担研究者	清水 俊一	北海道立衛生研究所
協力研究者	山口 敬治	北海道立衛生研究所
	森本 洋	北海道立衛生研究所
	駒込 理佳	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
	藤井伸一郎	岩手県環境保健研究センター
	高橋 雅輝	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
	小澤 奈美	福島県衛生研究所
	細谷美佳子	新潟県保健環境科学研究所
	廣地 敬	札幌市衛生研究所
	小関奈那美	仙台市衛生研究所
	沼田 昇	仙台市衛生研究所

(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……………45

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	土井 育子	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
	廣井みどり	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) PFGE 解析の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……………68

1. 焼肉店が原因施設と疑われた O157 食中毒事例

群馬県衛生環境研究所

2. EHEC O157 (VT1+VT2) 散発事例

神奈川県衛生研究所

3. 横浜市内の焼肉店を原因とする EHEC O157 (VT1+VT2 産生) による食中毒事例

横浜市衛生研究所

4. O157 による集団事例

長野県環境保全研究所

5. 焼肉店を原因とした食中毒事例

東京都健康安全研究センター

c) PFGE 解析のサルモネラ集団食中毒事例および散発事例への応用……………75

6. 2007 年に発生したサルモネラ食中毒事例

埼玉県衛生研究所

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

横浜市衛生研究所

8. Salmonella 血清型 Typhimurium による食中毒事例

長野県環境保全研究所

9. S. 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

(Ⅳ) 東海・北陸ブロック

東海・北陸地方9地方衛生研究所及び衛生試験所による

パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) を用いた腸管出血性大腸菌 O157 の精度管理と

PCR 型別法 (IS printing system ver2) の検討.....80

主任研究者	寺嶋 淳	国立感染症研究所
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	豊田市衛生試験所
	藪谷 充孝	名古屋市衛生研究所
	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

(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.....101

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	河野 智美	滋賀県衛生科学センター
	野村 憲一	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
	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
	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
	坂田 淳子	大阪府立公衆衛生研究所

b) 複数保育施設での腸管出血性大腸菌 O157 集団発生事例.....129

協力研究者	小笠原 準	大阪市立環境科学研究所
	長谷 篤	大阪市立環境科学研究所

c) 認可外保育施設における ESBL 産生細菌性赤痢の集団発生事例.....134

協力研究者	下迫 純子	堺市衛生研究所
	山内 昌弘	堺市衛生研究所
	横田 正春	堺市衛生研究所

大中 隆史 堺市衛生研究所
 田中 智之 堺市衛生研究所

d) グラム陰性菌からの非酵素法による DNA 抽出……………141
 協力研究者 西海 弘城 兵庫県立健康環境科学研究所

(VI) 中国四国ブロック

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……………145

分担研究者 中嶋 洋 岡山県環境保健センター
 研究協力者 上田 豊 鳥取県衛生環境研究所
 竹田 義弘 広島県立総合技術研究所 保健環境センター
 大原 祥子 広島県立総合技術研究所 保健環境センター
 石村 勝之 広島市衛生研究所
 伊藤 文明 広島市衛生研究所
 澤田千恵子 徳島県保健環境センター
 下野 生世 徳島県保健環境センター
 砂原千寿子 香川県環境保健研究センター
 吉田 紀美 愛媛県立衛生環境研究所
 松本 紀子 高知県衛生研究所
 大島 律子 岡山県環境保健センター

b) 鳥取県で分離された腸管出血性大腸菌 O157 の分子疫学解析における
 IS Printing 法の検討……………157

研究協力者 上田 豊 鳥取県衛生環境研究所

c) PFGE 解析法と IS-printing system 解析法の比較検討……………159

研究協力者 大原 祥子 広島県立総合技術研究所 保健環境センター
 竹田 義弘 広島県立総合技術研究所 保健環境センター

d) 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……………161

研究協力者 末永 朱美 広島市衛生研究所
 国寄 勝也 広島市衛生研究所
 毛利 好江 広島市衛生研究所
 蔵田 和正 広島市衛生研究所
 石村 勝之 広島市衛生研究所
 伊藤 文明 広島市衛生研究所
 笠間 良雄 広島市衛生研究所
 吉岡 嘉暁 広島市衛生研究所

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
 ～同一患者内における PFGE パターン変化の有無～……………167

研究協力者	蔵田 和正	広島市衛生研究所
	国寄 勝也	広島市衛生研究所
	末永 朱美	広島市衛生研究所
	毛利 好江	広島市衛生研究所
	石村 勝之	広島市衛生研究所
	伊藤 文明	広島市衛生研究所
	笠間 良雄	広島市衛生研究所
	吉岡 嘉暁	広島市衛生研究所

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

研究協力者	下野 生世	徳島県保健環境センター
	澤田千恵子	徳島県保健環境センター

g) 腸管出血性大腸菌 O157 の分子疫学解析における IS-Printing System の検討……………173

研究協力者	砂原千寿子	香川県環境保健研究センター
-------	-------	---------------

h) 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……………176

研究協力者	吉田 紀実	愛媛県立衛生環境研究所
	青木 紀子	愛媛県立衛生環境研究所
	田中 博	愛媛県立衛生環境研究所

i) 高知県で分離された腸管出血性大腸菌 O157 の分子疫学的解析における
 IS-Printing System の検討……………182

研究協力者	松本 紀子	高知県衛生研究所
	平松 佐穂	高知県衛生研究所
	戸梶 彰彦	高知県衛生研究所

(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2
 —IS-printing System の分子疫学的解析法としての有用性について—……………185

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
	村瀬浩太郎	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
	右田 雄二	長崎県衛生公害研究所
	江原 裕子	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

峯 真由美	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
江藤 良樹	福岡県保健環境研究所
小野塚大介	福岡県保健環境研究所
中村 祥子	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 バイオフロンティアプロジェクト推進室
寺嶋 淳	国立感染症研究所 細菌第一部

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 に関する九州地区 研修.....199

c) 米国及び極東米軍基地に流通する冷凍ビーフパティによる腸管出血性大腸菌 O157:H7 の感染事例と原因食品の加熱試験.....205

研究協力者	久高 潤	沖縄県衛生環境研究所
	安里 龍二	沖縄県衛生環境研究所
	糸数 清正	沖縄県衛生環境研究所
	中村 正治	沖縄県衛生環境研究所
	平良 勝也	沖縄県衛生環境研究所
	国吉 秀樹	沖縄県中部保健所
	金城 夕子	沖縄県中部保健所
	寺嶋 淳	国立感染症研究所
	渡辺 治雄	国立感染症研究所
	John Kobayashi	国立感染症研究所
	B.Swaminathan	Centers for Disease Control and Prevention
	C.R.Braden	Centers for Disease Control and Prevention
	J.R.Dunn	Centers for Disease Control and Prevention

d) PFGE により湧水を原因と特定し得た *Yersinia pseudotuberculosis* による家庭内感染事例.....210

協力研究者	上野 伸広	鹿児島県環境保健センター 微生物部
	本田 俊郎	鹿児島県環境保健センター 微生物部
	養田 祥子	鹿児島県環境保健センター 微生物部
	石谷 完二	鹿児島県環境保健センター 微生物部
	松山 茂樹	鹿児島県環境保健センター 微生物部

e) 3施設へ拡大した腸管出血性大腸菌 O111 による集団発生事例……………214

研究協力者	緒方喜久代	大分県衛生環境研究センター	微生物担当
	成松 浩志	大分県衛生環境研究センター	微生物担当
	若松 正人	大分県衛生環境研究センター	微生物担当
	長岡 健朗	大分県衛生環境研究センター	微生物担当
	小河 正雄	大分県衛生環境研究センター	微生物担当
	吉用 省三	大分県衛生環境研究センター	微生物担当
	澗 祐一	大分県衛生環境研究センター	微生物担当

f) 2007年9-10月に発生した *Salmonella Enteritidis* による2例の集団事例、

および同時期に発生した散発事例について……………217

研究協力者	河野喜美子	宮崎県衛生環境研究所
-------	-------	------------

g) ミドリガメが感染源と考えられる小児サルモネラ感染事例……………222

研究協力者	海部 春樹	長崎市保健環境試験所
	飯田 國洋	長崎市保健環境試験所
	植木 信介	長崎市保健環境試験所
	島崎 裕子	長崎市保健環境試験所
	江原 裕子	長崎市保健環境試験所

h) 足湯浴槽の清掃が原因と考えられたレジオネラ症の事例報告……………224

協力研究者	蓑田 祥子	鹿児島県環境保健センター	微生物部
	上野 伸広	鹿児島県環境保健センター	微生物部
	松山 茂樹	鹿児島県環境保健センター	微生物部
	本田 俊郎	鹿児島県環境保健センター	微生物部
	石谷 完二	鹿児島県環境保健センター	微生物部
	藏元 強	鹿児島県環境保健センター	微生物部

グループ2 : ウイルス

(I) 組換えノロウイルスおよびサポウイルスの作製とその応用……………227

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	グラント・ハンスマン	国立感染症研究所	ウイルス第二部

(II) ノロウイルス抗原のイムノクロマトグラフィーによる迅速検出方法……………231

分担研究者	田中 智之	堺市衛生研究所
研究協力者	三好 龍也	堺市衛生研究所
	内野 清子	堺市衛生研究所

吉田 永祥 堺市衛生研究所
 武田 直和 国立感染症研究所 ウイルス第二部

(Ⅲ) カリシウェブの整備……………237

分担研究者 染谷 雄一 国立感染症研究所 ウイルス第二部
 片山 和彦 国立感染症研究所 ウイルス第二部
 協力研究者 三瀬 敬治 札幌医科大学 医学部 衛生学

(Ⅳ) カリシウェブを利用した Norovirus 遺伝子型分類法の標準化……………243

分担研究者 片山 和彦 国立感染症研究所 ウイルス第二部
 染谷 雄一 国立感染症研究所 ウイルス第二部
 協力研究者 鈴木 義幸 国立遺伝学研究所
 三瀬 敬治 札幌医科大学 医学部 衛生学

グループ 3 : 原虫

(Ⅰ) 消化管寄生性原虫症に関する検査法および分子疫学的研究……………249

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 応用獣医学講座
 浅野由紀子 愛媛県衛生研究所 衛生研究課
 泉山 信司 国立感染症研究所 寄生動物部

(Ⅱ) 野外に生息するへびにおける *Cryptosporidium* の保有状況

および遺伝学的手法を用いた検査法に関する検討……………265

分担研究者 黒木 俊郎 神奈川県衛生研究所 微生物部

(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……………273

分担研究者 森田 重光 麻布大学 環境保健学部

(Ⅳ) 畜舎排水処理施設におけるクリプトスポリジウムの除去性の検討……………279

分担研究者 秋葉 道宏 国立保健医療科学院 水道工学部
 森田 重光 麻布大学 環境保健学部
 研究協力者 原本 英司 国立保健医療科学院 水道工学部
 與那城雄司 国立保健医療科学院 水道工学部

(Ⅴ) 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……………282

分担研究者 秋葉 道宏 国立保健医療科学院 水道工学部
 協力研究者 原本 英司 国立保健医療科学院 水道工学部
 與那城雄司 国立保健医療科学院 水道工学部
 橋本 温 阿南工業高等専門学校

(VI) ハイドロキシアパタイトを用いた多種類の微生物の同時濃縮法の開発……………293

分担研究者 片山 浩之 東京大学 工学系研究科

協力研究者 金 京 柱 東京大学 工学系研究科

3. 研究成果の刊行に関する一覧表……………296

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：

ウイルスや細菌等を原因として、広域における食品由来感染症を迅速に探知するためには、病原体の正確かつ迅速な検出とともに、病原体解析情報を共有しうるシステムを構築することが重要である。細菌性食中毒に関しては、稼動中の菌学的情報システム（パルスネット）を効果的に運用するため、PFGE 解析の精度管理と原因菌のデータベース化を継続した。また、IS-printing system 及び Multilocus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) による腸管出血性大腸菌 0157 の解析を行い、PFGE を補完する遺伝子型別方法としての評価を行った。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 (NoV) 及びサポウイルス (SaV) の組換えウイルス様粒子 (VLPs) とその抗血清を作成し、交差反応性について解析した。NoV については、遺伝子群 1 及び 2 に特異的な単クローン抗体を作成し、これを用いたイムノクロマト法を開発した。本法は平成 19 年末に診断薬として承認された。NoV 及び SaV の遺伝子型分類基準の策定を目的として、インターネット上のカリシウェブを整備し、カリシウイルス塩基配列データのサブデータベースの作成、自動アップデート用のオートパイロットプログラムを構築した。さらに、カリシウェブ上で各遺伝子型の基準配列及び遺伝子解析の操作ガイドを公開した。原虫による水系汚染の実態を把握するために、水道水源周辺環境に生息する哺乳類、爬虫類及び輸入哺乳類のクリプトスポリジウム、ジアルジアの感染状況を調査した。首都圏の主要な水道水源である利根川及びその支川の小山川の表流水及び底泥の両原虫の遺伝子型別濃度分布を明らかにした。また、両原虫の発生源である下水処理施設、畜舎排せつ物処理施設の除去性を明らかにした。市販のイムノクロマトキットを用いて、ヒト臨床材料等からの両原虫の検出における有用性を示した。

分担研究者	勢戸和子	(大阪府公衆衛生研究所)	
グループ 1 :	中嶋 洋	(岡山県環境保健センター)	
清水俊一	(北海道立衛生研究所)	堀川和美	(福岡県保健環境研究所)
甲斐明美	(東京都健康安全研究センター)	渡辺治雄	(国立感染症研究所)
松本昌門	(愛知県衛生研究所)	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）

片山和彦（国立感染症研究所）

協力研究者： Grant・ハンスマン（国立感染症研究所ウイルス第二部）、鈴木 義幸（国立遺伝学研究所）、三瀬 敬治（札幌医科大学・医学部・衛生学）、三好龍也、内野清子、吉田永祥（堺市衛生研究所）

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 応用獣医学講座）、浅野由紀子（愛媛県衛生研究所 衛生研究課）、泉山信司（国立感染症研究所 寄生動物部）、原本 英司、與那城雄司（国立保健医療科学院水道工学部）、橋本 温（阿南工業高等専門学校）、金 京 柱（東京大学 工学系研究科）

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)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 解析プロトコルの標準化と精度管理を継続する。b) PFGE によるデータベース構築を継続するとともに、MLVA による解析を行い本法の識別能の評価を行う。c) 各ブロック内で分離された腸管出血性大腸菌 0157 について IS-printing system による解析を行い、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。

2)ウイルスグループ；a) ノロウイルス (NoV) 及びサポウイルス (SaV) についてそれぞれ組換えウイルス様粒子 (VLPs) を作成し抗原性の解析、さらに NoV 及び SaV の遺伝子型別に応用可能な抗体の作成を行う。b) 簡便かつ迅速な NoV 検査診断法の一つとして開発したイムノクロマト法を既存の検出法と比較しその評価を行う。c) NoV 及び SaV の遺伝子型判定に必須である分子系統解析に資するために、インターネット上のカリシウェブを整備する。

3)原虫グループ；クリプトスポリジウム症およびジアルジア症の国内発生動向に関する我が国と諸外国の最新統計データを比較しわが国特異的な状況を明らかにする。特に10才以下の低年齢層における感染が、国内では統計上ほとんど表れていない点に注目し、この年齢層に関する調査のパイロット的研究として、愛媛県における発生動向調査で感染性胃腸炎として検査される試料のうち、原因不明となった試料に関し、迅速簡便な検査法である免疫クロマト法を用いて原虫検出を試みた。水源等の *Cryptosporidium* 汚染を引き起こす動物種等の調査として、*Cryptosporidium* を保有するヘビ種の特異性や保有状況の把握を進めてきた。平成19年度は、東北地方、北陸地方および九州地方のヘビについて調査を行う。水試料からの *Cryptosporidium* の検出法として、TaqMan PCR法に注目し既存の検出法との比較を行う。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における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。また、畜舎排水処理施設における流入水及び処理水を採取し、オーシスト濃度の把握及びその除去性について検討する。

(倫理的側面での配慮)

本研究において、患者情報等の疫学情報に関しては、連結不可能匿名化された情報となっている。連結不可能匿名化された情報については、「疫学研究に関する倫理指針」において指針の適用外とされており、国立感染症研究所の「ヒトを対象とする医学研究倫理審査委員会」に審査の申請をした結果も申請の対象外となっている。

C. 研究結果

細菌グループ；

1. 感染研における研究

2007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、2150株に対して2007年に分離された新しいサブタイプとして790種類、2006年に分離されたことのあるサブタイプが58種類、その他が22種類見いだされた。また、EHEC 026では、306株に対して164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、22都道府県から119株が分離されたType No c47のパターンを示す株について 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。また、c47株の一部については、IS-printing systemの改良版

による解析を行った。

2. 北海道・東北・新潟ブロック

北海道・東北・新潟ブロック内の各地研管内で発生した 88 事例 133 株の腸管出血性大腸菌 0157 による食中毒事例について、PFGE と IS-Printing system について比較検討を行った。それぞれの施設において PFGE のタイプ分けと IS-Printing System によるタイプ分けを行った結果、集団事例における PFGE と IS-Printing System でのタイプ分けは良く一致した。また、PCR ベースで分析が行えるため、高額な装置を用意する必要がなく、試験検査機能を持つ保健所や食肉衛生検査所においても分析が行えるなど、PFGE の補助的な分析方法として利用価値が高いことが示唆された。しかし、散発事例については、PFGE の結果と IS-Printing System の結果が一致しない事例もあり、また、感染研によるタイプ分けで、同一のタイプに分類された菌株が IS-Printing System では施設間で異なったパターンを示す場合もあった。IS-Printing System では、1stセット、2ndセットそれぞれ 18 のバンドの有無を比較するため、比較する菌株数が多くなると、大変見づらく比較検討しづらいと言う欠点がある。そこで、今回、このデータのコード化を試み、スムーズな比較検討が行えた。

3. 関東・甲・信・静岡ブロック

PFGE 法技術向上のための精度管理として行った、2007 年に分離された腸管出血性大腸菌 0157 5 株（VT1+VT2 産生株 3 株および VT2 産生株、2 株）の解析結果から、各施設ともバンドの分離が良く、非常にシャープであり、解析の基準として適していることが確

認された。各地研から電送された PFGE 画像をもとに、デンドログラム解析を行った結果、いずれも、菌株ごとにクラスターを形成していた。類似度をみると、菌株 No. 1 では 9 施設で 100%一致となったが、1 施設が 95%であった。その他の菌株でも、類似度はいずれも 90%以上であったが、菌株 No. 2, No. 3, No. 5 では、施設ごとにバラツキが認められた。菌株によっては、500kb 付近に太いバンドが出現するが、このバンドを 1 本と判定するか、2 本と判定するか判定が困難な写真が数施設あった。また、180~310kb 付近のバンドが非常に細かいためバンド同士がつながってしまい、バンドの選択が困難であった。関東ブロック 5 施設に IS-Printing System キットを配布し、各地研で分離された 0157 株 20 株以上について IS 解析を行い、PFGE パターンと比較した。その結果、いずれの施設でも PFGE 型の方が細かい型別が可能であった。

PFGE パターンと IS パターンの相関性をみると、PFGE パターンが全く異なる場合は IS パターンも異なり、両者は非常に良く相関していた。しかし、同一集団事例で、同じ PFGE パターンを示した株でも IS パターンが異なる場合や、PFGE パターンが異なる場合でも同じ IS パターンを示した場合がそれぞれ一部に確認された。IS-Printing System の評価については、試薬の調整や PCR 反応そのものについては、比較的簡便であり問題はなかった。電気泳動時間は 60 分が 3 施設、75 分、90 分、7 時間が各 1 施設と、施設により異なっていた。PFGE パターンとの相関性については 5 施設で相関性ありと回答し、4 施設が PFGE 法に代わる手法として期待できるとした。し

かしバンドが多くて読みにくい、2nd set の分子量が大きいところが読みにくい、同一集団なのに結果が異なり、解釈に困った等の意見もあった。

4. 東海・北陸ブロック

東海・北陸地方9地方衛生研究所及び衛生試験所（以下施設と略す）による腸管出血性大腸菌 0157 を用いた精度管理を実施した。PFGE 型の異なる2検体についてサルモネラマーカー使用を統一して行った。その結果、9施設のうち7施設の泳動図は解析ソフトを用いた解析に十分な画質が得られた。施設間の相同性の比較を行なったところ、2検体で検体ごとに同一のクラスターを形成した。その相同性は検体1、2で全体の相同性はそれぞれ90.4%と91.7%であり、さらに検体1では4つと2つの施設、検体2では5つと2つの施設間での相同性が100%となった。残りの2施設の泳動図については画質がやや劣るため解析が困難であった。

7施設で検出された17株の0157について電送された泳動図について系統樹を作成し、「東海・北陸ブロック版パルスネット」の試行を行った。その結果、類似したバンドパターンを示し菌株間の相同性が80%以上を示すグループが6つ認められた。これら6つのグループのうち3つは同一施設由来の2株であったが、残り3グループは異なった施設由来株であった。さらに1グループの2株は東海地方と北陸地方由来株であった。これらことから類似したバンドパターンを示す0157が東海・北陸地方に存在していることが示唆された。

東海・北陸9施設において各施設4から30

株の0157を用いてIS printing system ver2の試行を行った。IS printing system ver2は昨年度のver1に比べ、2、3の改良が加えられたことから試薬の調製が簡便となり、eae 遺伝子のバンドの不安定さも解消された。非特異バンドは出現するものの、その解析力はPFGEと同程度と考えられるが、簡便性、迅速性に関してはIS printing system ver2の方がPFGEより優っていた。

5. 近畿ブロック

パルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）法を共通の疫学指標として使用するため、近畿ブロック11衛生研究所で精度管理株として配布したEHEC 0157:H7 5株を用いてPFGEを実施し、電送された電気泳動画像について解析して、施設間差および3名の解析者による変動を検討した。その結果、解析者によって不明瞭なバンドや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。IS-printing Systemについては、7施設で合計194株（VT1陽性株6株、VT2陽性株81株、VT1およびVT2陽性株107株）について検討した。194株のPFGE型は135タイプに分かれていたが、ISコードでは91タイプに区別された。このうちPFGE型25タイプの65株は、PFGE型ごとにISコードも一致していた。同一PFGE型でISコードの異なった株は、10タイプ29株あり、特にPFGE型c114の2株は、12桁のISコードのうち8桁で異なっていた。細菌性食中毒の原因菌として最も事例数の多い*C. jejuni*について、7施設において昨年引き続き制限酵素 *SmaI* と *KpnI* を用いたPFGE法の改良を試みた。スイッチタイムの変更により *KpnI* 切断のサイズ

の小さいバンドが明瞭になったが、EHEC 0157 同様バンド認識のばらつきが近似度を下げる結果につながっていた。*SmaI* 切断はバンド数が少ないが、その泳動パターンは多様であり、*C. jejuni* 型別法として利用可能であると考えられた。

6. 中国四国ブロック

平成18年から19年に岡山県下で分離された EHEC68 株 (0157:H7 VT1, 2 ; 56 株、0157:H7 VT2; 11 株、0157:H- VT1, 2; 1 株) を用いて IS printing 法による解析を行った。さらに、中四国地域の各県で分離・検査された EHEC 株について、IS printing 法および PFGE 法の結果を用いて菌株相互の疫学解析を行った。PFGE 型の異なる菌株が同じ IS printing パターンを示したグループは 0157:H7 VT1, 2 の菌株で 4 グループあり、それぞれの IS printing パターンに属する PFGE 型は 2~3 種類であった。他の血清型あるいは毒素型の株では、すべて同じ PFGE 型の株が同一の IS printing パターンを示した。中四国地域で分離された EHEC 株の一部を用いて、IS printing パターンと PFGE 型を比較したところ、同じ IS printing パターンを示したグループは 10 グループあり、各グループには 1~4 種類の PFGE 型の菌株が含まれていた。一方、同じ PFGE 型の菌株を集めると 7 グループに分類され、4 グループでは IS printing パターンが異なっていたが、それらの IS printing パターンは増幅バンド 1 本の違いで近似していた。

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 19 年度は 1) IS-printing System に関

する基礎的研究、2) 研修について、3) 事例検討の 3 課題について実施した。IS-printing System に関しては、平成 18 年度の結果に基づき改良された IS-printing System を用いて各地研で保存され かつ 感染症研究所へ送付し PFGE Type が判明している 267 株の 0157 を対象とした。IS-printing の ID コードは 105 型、PFGE-Type は 159 型であった。同一 PFGE-Type で IS-printing の ID コードが異なる菌株群は、9 グループであった。同一地研内では家族や同一施設である場合は ID コードが同じであるが、地研が異なる場合に ID コードに相違が見られた。さらに、これらの関連性をまとめると、同一コードで PFGE-Type が異なる菌株が 2 グループあった。IS-printing System の同一 ID コードで PFGE-Type が異なる菌株群は、29 グループあった。29 グループ中 7 グループは、同一家族あるいは同一事例であった。また、7 グループは同一県内の事例であった。さらにその他のグループにおいても隣接した県や市である場合が多かった。一方、これらの結果の一部をクラスタ解析した (図 1) が、株数が多くなると関連性について判断が困難となり、むしろ ID コードによる直接比較の方が解析する上で簡便であった。

研修としては、*Legionella pneumophila* について、Sequence-based typing (SBT) を *L. pneumophila* の 7 つの遺伝子 (*flaA*, *pile*, *asd*, *mip*, *mompS*, *proA*, *neuA*) の多型性を利用して行った。

ウイルスグループ ;

ノロウイルス (NoV) の遺伝子型と抗原性

の関係を明らかにするために組換えウイルス様粒子 (VLPs) とその抗血清との交差反応性を抗体 ELISA および抗原 ELISA で解析した。今回発現した遺伝子群 GI/7、GI/12、GI/14 および GII/13 の VLPs は相互に異なった抗原型を示した。同様に、SaV GI/1、GI/5、GII/2、GII/3、GIV、および GV の VLPs を発現し、高力価血清を作製した。これらの株は NoV 同様、相互に異なった抗原性を示した。これらの VLPs は遺伝子群特異的単クローン抗体のスクリーニングに有用である。ノロウイルス検出法として、ELISA 法よりさらに簡便かつ迅速なイムノクロマトグラフ (Immunochromatography, IC) 法の開発を試みた。開発された IC 法は、小児科外来で採取された急性胃腸炎患者検体 102 検体のノロウイルス抗原検出結果では、RT-PCR 法を Golden standard method とした場合、一致率は 89.2%、感度 81.0%、特異性 100%であった。測定時間は 15 分、検体搬入から約 30 分で診断できる。

原虫グループ；

クリプトスポリジウム症およびジアルジア症の国内発生動向に関して我が国と諸外国の最新統計データを比較した。我が国では、諸外国よりも報告数および発生率ともに低く、諸外国では感染報告数のおよそ 1/3 を占める 10 才以下の低年齢層における感染が、国内ではほとんど報告されておらず、この年齢層に関する調査の必要性が指摘された。今年度は、パイロット的研究として、愛媛県における発生動向調査で感染性胃腸炎として検査される試料のうち、原因不明となった試料に関し、迅速簡便な検査法である免疫クロ

マト法を用いて原虫検出を試みた。その結果、1.3%の割合ではあるが、原因不明試料中に原虫が検出され、感染性胃腸炎の原因検索として原虫をも対象とすべき必要性があることが明らかとなった。

クリプトスポリジウムの水系感染においては、汚染源となる動物の種類や保有率等のデータを蓄積することが重要であることから、これまで全国規模で *Cryptosporidium* を保有するヘビ種の特異性や保有状況の把握を進めてきた。今年度は、これまでに十分なデータがそろっていない東北地方 (福島県)、北陸地方 (福井県) および九州地方 (長崎県および鹿児島県) のヤマカガシを中心に保有率の調査を行った。

東北地方産の 20 匹のうち 11 匹 (55.0%)、北陸地方産の 4 匹のうち 4 匹 (100%) から *Cryptosporidium* が検出されたが、九州地方産の 17 匹からは検出されなかった。

東北地方と北陸地方のヤマカガシそれぞれ匹と 4 匹から検出された *Cryptosporidium* の遺伝子型は、これまでヤマカガシから検出された遺伝子型である *Cryptosporidium* sp. 983 と一致した。

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明らかにするとともに、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。

① 流入下水中の *Cryptosporidium* オーシスト濃度は 5.00 ~ 1380 oocysts/L, *Giardia* シスト濃度は 448 ~ 1170 cysts/L となり、放流水中の

Cryptosporidium オーシスト濃度は0.08～2.13 oocysts/L, *Giardia* シスト濃度は2.00～6.70 cysts/Lとなった。

- ② 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96.1～99.9%, *Giardia* シストでは99.2～99.8%であった。
- ③ *Giardia* シストをシヨ糖浮遊法で精製して定量する場合は、シヨ糖液の比重を1.30とする必要がある。

水道水源河川における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である利根川並びにその支川の小山川等の9地点を選定し、表流水に含まれるクリプトスポリジウム及びジアルジアの濃度分布とその遺伝子型を明らかにした。オーシスト、シスト濃度は、それぞれ0.5～788 oocysts/10L, 0.5～37 cysts/10Lであった。オーシストの遺伝子型は、*Cryptosporidium* pig genotype I (AF115377)が49試料、*C. andersoni* (AB089285)が5試料、*C. pig* genotype II (EF012375)が1試料、*C. pig* genotype II (EU331243)が1試料、*C. meleagridis* (AF112574)が1試料であり、同定された57試料中50試料(88%)がヒトへの感染報告が存在する遺伝子型(*C. pig* genotype I及び*C. meleagridis*)であった。また、牛舎汚水を処理する実施設において、流入水及び処理水を採取し、オーシストの濃度を把握するとともに、その除去性について検討した。その結果、牛舎汚水処理施設の流入オーシスト濃度は、1500 oocysts/L～2000

oocysts/L であり、その除去率は、1.03Log～1.30Logであった。

D. 考察

広域における食品由来感染症を迅速に探知するためには、病原体の検出を迅速かつ正確に行い関係機関において病原体解析情報を共有しうるシステムを構築することが重要である。細菌性食中毒に関しては、地研及び感染研を主体としたネットワークであるパルスネットにおいて情報の共有化が進みつつある。本システムにおいては、各機関におけるPFGE解析の精度管理が重要であり、特に担当者の入れ替わりがある機関が含まれる地域においては研修会等の開催による技術の継承・均一化を含めて継続的な精度管理が行われている。また、各機関において域内で発生した食中毒の原因菌等のデータベースが構築されるとともに、感染研において原因菌のデータベース化が継続されている。それぞれの地域で実際に発生した赤痢、サルモネラ、*Campylobacter*等による事例においてPFGEによる解析が行われ、行政サイドへの情報還元が行われるなど、行政的貢献度の高さも注目すべきものがある。2007年に分離されたEHEC 0157においては同一PFGEパターンと考えられる株が広域から分離されていたが、これらの株のなかにはMLVAではタイプが異なる株が含まれていることから、広域で分離される同一PFGEパターンの株でも分離時期が大きく異なるものでは遺伝子型に変化が起こっているものと考えられた。EHEC 0157に関しては、IS-printing systemの改良版を用いての解析が行われ、本システムに関して高分子量域のバンドの視認性が

改善された点や前回と同様、本システムの操作の容易さ及び迅速性が評価されている。詳細な型別能については PFGE ほどではないものの、集団感染事例等の由来株での一致率は高く、それぞれの地域における関連株の迅速な把握が可能であることが示唆されている。一方、バンドパターンの解釈の違いから異なる施設間での結果の相違も報告されており、特に広域発生時での多数機関による解析では、最終的なデジタル化されたデータのみならず泳動像をも確認する必要が生じる可能性も考えておくべきであろう。泳動結果のコード化も含めて今後の課題である。

大きく 2 つの遺伝学的グループ (GI, II) に分けられる NoV において、今回発現に成功した 3 種類の NoV GI 株を含めこれで NoV GI では 9 遺伝子型の 9 株で、GII では今回の 1 株を含め 14 遺伝子型の 24 株で NoV VLPs を作製することができた。抗体 ELISA の結果は各遺伝子群にはそれぞれ共通のエピトープが存在することを示唆しており、より反応性の高い遺伝子群特異的単クローン抗体作製への応用が期待される。一方、SaV はいまだ新規の遺伝子型が検出されており、すべての遺伝子型が出揃うまでには少し時間が必要である。しかし、今回の解析から SaV においても NoV 同様、遺伝子群に共通に反応する単クローン抗体作製での可能性は十分であり、今後抗原検出 ELISA の充実を図るとともに、イムノクロマトでの応用を視野に入れた実験を計画中である。NoV 同様、SaV においてもデータベースの整備が必要である。これらの VLPs は遺伝子群特異的単クローン抗体のスクリーニングに有用であり、残りの株につ

いても VLPs の作製に向けて研究を進展させる予定である。今回、開発した IC 法は平成 19 年末に厚生労働省より NoV 体外診断用医薬品として認可された。したがって、食中毒疑いの事例においても、感染性胃腸炎事例においても、IC 法が陽性であれば NoV 感染と診断でき、且つ感染拡大予防に集中できると言える。加えて、原因微生物の迅速な同定のみならず、患者の的確な治療、不必要な検査などが著しく改善され、それに付随する経済的効果も飛躍的に伸びるものと期待される。

NoV、SaV の遺伝子型を判定するためには、分子系統解析が必須である。オートパイロットプログラムを使用した SaV のサブデータベース作成と検索プログラムのテストランに成功した。スクリプト実行中にパケットの送受信傷害によるネットワーク中断が発生すると、スクリプトエラーに直結するため、通信環境の整備と、サーバーの能力向上が必要であると思われた。検索プログラムに関しては、問題はなく、目的とする情報が表示されることが確認された。今回テストした検索プログラムでは、サブデータベースへのリンク、サブデータベースのデータファイルを選択するボタン、オンライン解析ソフトウェアへの出力の機能を持たせていない。今後、これらの機能を付加する必要がある。NoV 遺伝子型の判定基準の策定は、未だ模索の段階にある。抗原性の違いを予測する目的でタイピングを行うのであれば、Capsid N/S 領域の塩基配列を用いた遺伝子型分類と CDC の提唱する遺伝子型分類では、どちらの方法で行っても分子系統関係に大差はない事が明らかとなった。したがって、Capsid N/S 領域の塩基配

列を用いた遺伝子型分類を行うために FASTA フォーマットで用意したの基準配列をインターネット上で公開し、この基準配列ファイルによる NoV の遺伝子型分類方法とガイドラインを公開した。

クリプトスポリジウム症およびジアルジア症の国内発生動向を把握するためには、現状の検査法では対応が難しいことが予想され、より簡便迅速な方法の導入が求められる。今回試用した免疫クロマト法は、その要求に応える有用性を備えるものと考えられた。国内の実態としては低年齢層における感染の存在が想定されることから、その感染源の解明が今後の課題となる。水系環境汚染は一つの要因となり得るが、東北地方の北上川の流域調査では、ヒト感染性タイプのジアルジアによる流域汚染と下水放流による高汚染域への注意が指摘された。適切な検査法に基づき国内の発生動向を正確に把握することは、種々の感染リスクを低減し、流行の阻止につながるものである。低年齢層あるいはその他のリスクグループに関してさらに広範な調査が必要と考えられる。

E. 結論

広域における食品由来感染症の原因病原体を迅速に検出しその解析情報を共有化することは、感染源の解明や感染症の拡大を阻止するうえで重要である。細菌感染症においては、IS-printing system や MLVA 等の新規型別方法が、現在パルスネットで主体となっている PFGE を補完する方法として機能し得る可能性が示された。ウイルス感染症では、ノロウイルス及びサポウイルスにおける新

規の遺伝子型抗原が明らかになり、ノロウイルス抗原を応用したイムクロマト法が平成 19 年末にノロウイルス体外診断用医薬品として認可された。さらに、ノロウイルス及びサポウイルスの遺伝子型の判定基準の策定を目的としてカリシウェブの整備を行い、ノロウイルス遺伝子型分類法の標準化を行った。クリプトスポリジウム等の原虫感染症では、広域発生源と成り得る水道水源周辺環境等の病原体分布とその遺伝子型を明らかにするとともに、下水処理施設等における原虫除去率を明らかにした。また、ヒト臨床材料等からの両原虫の検出におけるイムクロマト法の有用性を示した。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Pei Y, Terajima J, Saito Y, Suzuki R, Takai N, Izumiya H, Morita-Ishihara T, Ohnishi M, Miura M, Iyoda S, Mitobe J, Wang B, Watanabe H. Molecular Characterization of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 Isolates Dispersed across Japan by Pulsed-Field Gel Electrophoresis and Multiple-Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis. *Jpn J Infect Dis.* 2008 Jan;61(1):58-64.

Yoshitoshi Ogura, Tadasuke Ooka, Asadulghani., Jun Terajima, Jean-Philippe Nougayrede, Ken Kurokawa, Kousuke Tashiro, Toru Tobe, Keisuke