

200829015B^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
(課題番号：H18-新興-一般-016)

平成 20 年度 総括・分担研究報告書

及び

平成 18～20 年度 総合研究報告書

(厚生労働科学研究費補助金 新興・再興感染症研究事業)

研究代表者 寺 嶋 淳

国立感染症研究所 細菌第一部

平成 21 (2009) 年 4 月

目次

1. 平成 20 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
研究代表者 寺嶋 淳	国立感染症研究所 細菌第一部

2. 平成 20 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	18
研究代表者 寺嶋 淳	国立感染症研究所 細菌第一部
研究分担者 渡辺 治雄	国立感染症研究所 細菌第一部
研究協力者 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
地方衛生研究所	

(II) 北海道・東北・新潟ブロック

北海道・東北・新潟ブロックにおけるパルスフィールドゲル電気泳動システム(PFGE)の 精度管理方法と検体の輸送方法の検討	27
研究分担者 清水 俊一	北海道立衛生研究所
研究協力者 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
菅野 奈美	福島県衛生研究所
加藤美和子	新潟県保健環境科学研究所
廣地 敦	札幌市衛生研究所
野中 陽子	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

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	36
---	----

研究分担者	甲斐 明美	東京都健康安全研究センター
研究協力者	土井 育子	茨城県衛生研究所
	馬淵佐知子	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
	横山 栄二	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

(IV) 東海・北陸ブロック

東海・北陸地方9地方衛生研究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の精度管理、集団事例発生時のPFGE解析結果の還元と

IS printing systemの活用..... 65

研究代表者	寺嶋 淳	国立感染症研究所
研究分担者	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
	本庄 峰夫	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
	中根 邦彦	岡崎市総合検査センター
	石畝 史	福井県衛生研究所
	岩出 義人	三重県保健環境研究所
	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..... 79

研究分担者	勢戸 和子	大阪府立公衆衛生研究所
研究協力者	河野 智美	滋賀県衛生科学センター
	中嶋 智子	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所

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
池端 孝清	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) サルモネラ・エンテリティディスによる食中毒事例 (奈良県) 106

研究協力者	榮井 毅	奈良県保健環境研究センター
	田邊 純子	奈良県保健環境研究センター
	橋田みさを	奈良県保健環境研究センター
	大前 壽子	奈良県保健環境研究センター

c) 飲食チェーン店で発生した *Salmonella* Montevideo 食中毒事件 109

研究協力者	田口 真澄	大阪府立公衆衛生研究所
	井上 清	大阪府立公衆衛生研究所
研究分担者	勢戸 和子	大阪府立公衆衛生研究所

d) 保育所における腸管出血性大腸菌0157集団感染事例 112

研究分担者	勢戸 和子	大阪府立公衆衛生研究所
研究協力者	田口 真澄	大阪府立公衆衛生研究所
	原田 哲也	大阪府立公衆衛生研究所

(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 116

研究分担者	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
	黒崎 守人	島根県保健環境科学研究所
	竹田 義弘	広島県立総合技術研究所保健環境センター
	蔵田 和正	広島市衛生研究所
	富永 潔	山口県環境保健センター
	宇佐美 実	徳島県保健環境センター
	久保由美子	香川県環境保健研究センター
	青木 紀子	愛媛県立衛生環境研究所
	平松 佐穂	高知県衛生研究所
	大島 律子	岡山県環境保健センター

b) IS Printing法の有効性についての検討 129

研究協力者	上田 豊	鳥取県生活環境部衛生環境研究所
-------	------	-----------------

c) <i>Campylobacter jejuni</i> による2件の食中毒事例について.....	133
研究協力者	田中 真弓 鳥取県衛生環境研究所
	齋尾 美春 鳥取県衛生環境研究所
	上田 豊 鳥取県衛生環境研究所
	井田 正己 鳥取県衛生環境研究所
d) 島根県内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法の有用性の検討.....	136
研究協力者	黒崎 守人 島根県保健環境科学研究所
e) PFGE法とIS法の比較検討.....	139
研究協力者	桑山 勝 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
	竹田 義弘 広島県立総合技術研究所保健環境センター
f) 腸管出血性大腸菌O157の分子疫学的解析におけるPFGE法とIS-printing法および MLVA法の有効性比較.....	143
研究協力者	末永 朱美 広島市衛生研究所
	田中 寛子 広島市衛生研究所
	蔵田 和正 広島市衛生研究所
	花木 陽子 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
	池田 義文 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
g) 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.....	147
研究協力者	富永 潔 山口県環境保健センター
	野村 恭晴 山口県環境保健センター
	伊藤 恵美 山口県環境保健センター
h) 腸管出血性大腸菌O157の分子疫学的解析におけるIS-printing法の検討.....	155
研究協力者	宇佐美 実 徳島県保健環境センター
	石田 弘子 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
i) 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.....	157
研究協力者	久保由美子 香川県環境保健研究センター
	内田 順子 香川県環境保健研究センター

j) 愛媛県で検出された腸管出血性大腸菌0157の分子疫学的解析における
IS-Printing Systemの検討..... 159

研究協力者	青木 紀子	愛媛県立衛生環境研究所
	鳥谷 竜哉	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

k) 高知県で検出された腸管出血性大腸菌0157の分子疫学的解析における
IS-Printing Systemの検討..... 165

研究協力者	平松 佐穂	高知県衛生研究所
	藤戸 亜紀	高知県衛生研究所
	千屋 誠造	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3
-IS-printing System の分子疫学的解析法としての有用性について- 167

研究分担者	堀川 和美	福岡県保健環境研究所
研究協力者	尾崎 延芳	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
	西 桂子	佐賀県衛生薬業センター
	右田 雄二	長崎県環境保健研究センター
	江原 裕子	長崎市保健環境試験所
	松本 一俊	熊本県保健環境科学研究所
	岩永 貴代	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
	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	動物衛生研究所・安全性研究チーム
	江藤 良樹	福岡県保健環境研究所
	中村 祥子	福岡県保健環境研究所
	濱崎 光宏	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
	村上 光一	福岡県保健環境研究所
	竹中 重幸	福岡県保健環境研究所

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 新規遺伝子解析法について……………	178
--	-----

c) 輸入冷凍海産物を原因とした赤痢集団事例……………	179
-----------------------------	-----

研究協力者	尾崎 延芳	福岡市保健環境研究所
	眞子 俊博	福岡市保健環境研究所
	宮尾 義浩	福岡市保健環境研究所
	財津 修一	福岡市保健環境研究所
	川崎 恵	福岡市保健環境研究所
	江洲 寿美	福岡市保健環境研究所
	吉田 眞一	福岡市保健環境研究所

d) 運動会時の喫食による黄色ブドウ球菌食中毒事例の パルスフィールドゲル電気泳動法による解析……………	185
---	-----

研究協力者	右田 雄二	長崎県環境保健研究センター
	山崎 省吾	長崎県環境保健研究センター
	吾郷 昌信	長崎県環境保健研究センター

e) 保育園における腸管出血性大腸菌0111とノロウイルスの同時流行による 集団発生事例……………	188
--	-----

研究協力者	河野喜美子	宮崎県衛生環境研究所
	岩切 章	宮崎県衛生環境研究所
	三浦 美穂	宮崎県衛生環境研究所
	塩山 陽子	宮崎県衛生環境研究所
	山本 正悟	宮崎県衛生環境研究所
	川畑 紀彦	宮崎県衛生環境研究所
	吉野 修司	宮崎県都城保健所
	小寺美津夫	宮崎県都城保健所
	藤本 茂紘	宮崎県都城保健所

f) 2008年に発生したセレウス菌による2例の食中毒事例について……………	194
--	-----

研究協力者	緒方喜久代	大分県衛生環境研究センター
	若松 正人	大分県衛生環境研究センター
	成松 浩志	大分県衛生環境研究センター

グループ2：ウイルス

(1) 組換えサポウイルス粒子および単クローンの作製とその応用……………	197
--------------------------------------	-----

研究分担者	武田 直和	国立感染症研究所	ウイルス第二部
研究協力者	田中 智之	堺市衛生研究所	

北元 憲利 兵庫県立大学
岡 智一郎 国立感染症研究所

- (II) ノロウイルス P particle の発現と血液型抗原との結合…………… 202
- 研究分担者 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
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…………… 209
- 研究分担者 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
研究協力者 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…………… 217
- 研究分担者 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
研究協力者 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) 迅速診断検査法による原因不明の感染性胃腸炎検体におけるクリプトスポリジウム
ならびにジアルジアの検出…………… 224
- 研究分担者 八木田健司 国立感染症研究所 寄生動物部
研究協力者 浅野由紀子 愛媛県衛生研究所 衛生研究課
佐々木美江 宮城県保健環境センター 微生物部
村上 光一 福岡県保健環境研究所 保健科学部
板垣 匡 岩手大学農学部 応用獣医
泉山 信司 国立感染症研究所 寄生動物部
- (II) 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
クリプトスポリジウム研究班…………… 233
- 研究分担者 黒木 俊郎 神奈川県衛生研究所 微生物部
研究協力者 古川 一郎 神奈川県衛生研究所 微生物部
泉山 信司 国立感染症研究所 寄生動物部
- (III) 畜産排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…………… 245
- 研究分担者 森田 重光 麻布大学 生命・環境科学部
秋葉 道宏 国立保健医療科学院 水道工学部
研究協力者 原本 英司 国立保健医療科学院 水道工学部
岸田 直裕 国立保健医療科学院 水道工学部

(IV) 利根川水系におけるクリプトスピリジウム及びジアルジア汚染の実態調査……………	251
研究分担者	秋葉 道宏 国立保健医療科学院 水道工学部
研究協力者	原本 英司 山梨大学大学院 医学工学総合研究部
	中野 雅之 国立保健医療科学院 水道工学部
	岸田 直裕 国立保健医療科学院 水道工学部
	金 京柱 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 (平成 20 年度) ……………	259

目次

1. 平成 18～20 年度総合研究報告書

- 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…………… 263
研究代表者 寺嶋 淳 国立感染症研究所 細菌第一部

2. 平成 18～20 年度分担研究総合報告書

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…………… 272
研究代表者 寺嶋 淳 国立感染症研究所 細菌第一部
研究分担者 渡辺 治雄 国立感染症研究所 細菌第一部

(II) 北海道・東北・新潟ブロック

- 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…………… 279
研究分担者 清水 俊一 北海道立衛生研究所

(III) 関東・甲・信・静岡ブロック

- 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…………… 287
研究分担者 甲斐 明美 東京都健康安全研究センター

(IV) 東海・北陸ブロック

平成18～20年度東海・北陸地方 9 地方衛生研究所による

- 1) 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の精度管理、
 - 2) 集団事例発生時のPFGE解析結果の還元調査、
 - 3) IS printing system ver2のPFGEとの比較検討…………… 302
- 研究分担者 松本 昌門 愛知県衛生研究所

(V) 近畿ブロック

- 近畿ブロックにおける、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…………… 317
研究分担者 勢戸 和子 大阪府立公衆衛生研究所

(VI) 中国・四国ブロック

- 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…………… 335
研究分担者 中嶋 洋 岡山県環境保健センター

(VII) 九州ブロック

- 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…………… 347
研究分担者 堀川 和美 福岡県保健環境研究所

グループ2：ウイルス

- (I) 食品由来ウイルスの検出法の開発…………… 357
研究分担者 武田 直和 国立感染症研究所 ウイルス第二部
- (II) ノロウイルス迅速診断「イムノクロマト法」の開発…………… 365
研究分担者 田中 智之 堺市衛生研究所
- (III) カリシウェブの整備…………… 372
研究分担者 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
- (IV) カリシウェブを利用したNorovirus 遺伝子型分類法の標準化…………… 375
研究分担者 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

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…………… 378
研究分担者 八木田健司 国立感染症研究所 寄生動物部
- (II) 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
クリプトスポリジウム研究班…………… 389
研究分担者 黒木 俊郎 神奈川県衛生研究所 微生物部
- (III) 下水および畜産排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…………… 397
研究分担者 森田 重光 麻布大学 生命・環境科学部
秋葉 道宏 国立保健医療科学院 水道工学部
- (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…………… 407
研究分担者 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 生命・環境科学部
片山 浩之 東京大学大学院 医学工学総合研究部
3. 研究成果の刊行に関する一覧表（平成18～20年度）…………… 421

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

研究代表者 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する広域食品由来感染症を迅速に探知するために、病原体の迅速検出方法や解析方法について改良を加えた。細菌性食中毒に関しては、PFGE 解析の精度管理と原因菌のデータベース化を継続しパルスネットの効率的運用を行った。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 O157 の解析から、迅速で集団発生事例の探知などに適用可能である IS-printing system と PFGE を補完し得る解像度を有する MLVA の特性を明らかにした。さらに、カメ由来のサルモネラ症の把握に関する研究では、「動物由来感染症のコントロール法の確立に関する研究」研究代表者 吉川泰弘 東京大学大学院との共同研究を実施し、一部の患者由来株とカメ由来株の類似性を示した。

サポウイルス (Sapovirus, SaV) の遺伝子型と抗原性の関係を明らかにするために、SaV GI/1、GI/5、GII/2、GII/3、GIV、および GV の組換え粒子 (VLPs) を発現し、高力価血清ならびに単クローン抗体を作製した。VLPs とその抗血清の交差反応性を抗原 ELISA で解析した結果、遺伝子群特異的単クローン抗体、遺伝子型特異的単クローン抗体、および全ての SaV VLP と反応する単クローン抗体が得られた。簡便でコストも安い大腸菌発現系を用いて、GII/4 変異型ノロウイルス (NoV) (2006b 型) のカプシド蛋白の一部である P ドメインを発現させた。発現させた P 蛋白は粒子状 (P particle) であったが、唾液中の血液抗原との結合能は見られなかった。NoV の遺伝子型判定基準の策定を目的として、完全長ゲノム塩基配列が報告されているカリシウイルス株のゲノム全長を対象とした分子遺伝学的解析を実施した。また、Nov, SaV の遺伝子解析に用いるインターネット上のカリシウェブのフロントページおよび CaliciWeb 骨格デザインを構築した。

水道水源である利根川並びにその支川の小山川等において、表流水に含まれるクリプトスポリジウムオーシスト (以下オーシストという)、ジアルジアシスト (以下シストという) の季節変動は冬期に高い濃度を示した。畜産排水処理施設における処理前後の排水のオーシスト及びシストの濃度を明らかにした。感染性胃腸炎検体についてのイムノクロマト法の結果では、国内の低年齢層におけるクリプトスポリジウムならびにジアルジアの感染が統計以上に発生していることが示唆された。水試料のクリプトスポリジウム検査法として、既報の 5 種類の

Taq-Man PCR 法について、増幅曲線、検量線、アガロースゲル電気泳動像等を比較した結果、18SrRNA を標的遺伝子として設計されている Miller らのシステムが最適と考えられた。

研究分担者

グループ 1 :

清水俊一 (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)

中嶋 洋 (岡山県環境保健センター)

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 (各分担研究報告書を参照)

グループ 2 :

武田直和 (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)

染谷雄一 (国立感染症研究所)

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)、北元憲利 (兵庫県立大学)、岡 智一郎

(国立感染症研究所)、三好 龍也 (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)

森田重光 (麻布大学環境保健学部)

協力研究者 : 原本英司 (山梨大学大学院)、

中野雅之、岸田直裕、金 京柱 (国立保健医

療科学院)、浅野由紀子 (愛媛県衛生研究所)、

佐々木美江 (宮城県保健環センター)、村上

光一 (福岡県保健環境研究)、板垣 匡 (岩

手大学農学部)、泉山信司 (国立感染症研究

所)、古川一郎、(神奈川県衛生研究所)、

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 O157 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 O157 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。d) 「動物由来感染症」研究班から提供されたカメ由来サルモネラの PFGE 画像をパルスネット内で配信し、血清型あるいは PFGE パターンの合致するサルモネラ株を収集・解析した。

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) 簡便でコストも安い大腸菌発現系を用いて、GII/4 変異型ノロウイルス (2006b 型) のカプシド蛋白の一部である P ドメインを発現させ、唾液中の血液抗原との結合能を測定する。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。d) カリシウイルス科における NoV の分子遺伝学的特徴の解析を目的として、カリシウェブより完全長ゲノム塩基配列の報告されているカリシウイルス株を集め、ゲノム全長を対象とした分子遺伝学的解析を実施した。

3) 原虫グループ; 感染症発生动向調査において原因不明とされた感染性胃腸炎検体に関して、迅速診断キットを用いたクリプトスポリジウムおよびジアルジアの検出を試みる。水試料のクリプトスポリジウム検査として顕微鏡検査は信頼性が高いが習熟と検査時間を要するため、迅速簡便に結果が得られる試験法が望まれている。迅速簡便な方法とし

て、既報の Taq-Man PCR 法から 5 種類を選び、これらの評価を行う。試料中のオーシスト及びシストの濃度レベルを定量的に評価するために、回収率算出用のトレーサーを用いて回収率を算出し、精製工程における損失を補正する定量方法を開発する。4 箇所の畜産排水処理施設における畜産排水および処理水中のオーシスト、シストの濃度レベルを調査し、流入水中の濃度と処理水中の濃度から畜産排水処理による両原虫の除去率を算出する。利根川中流域に位置する利根大堰を含む 2 地点、利根川の一次支川である小山川で 2 地点、二次支川である A 川において 6 地点を選定し、オーシスト及びシストの季節変動と、二次支川における日変動濃度を明らかにする。

(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

2008 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 O157 では、1737 株に対して 2008

年に分離された新しいサブタイプとして 761 種類、2007 年に分離されたことのあるサブタイプが 60 種類、その他が 29 種類見いだされた。また、EHEC O26 では、421 株に対して 176 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 O157 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 45 種類存在したが、そのうち 11 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 5 種類存在していた。特に、24 都府県から 56 株が分離された Type No d148 の株では、Multilocus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) でも大部分の株が同一リピート数を示し、これらの株の遺伝学的関連性が高いことが示唆された。EHEC O157 に関しては、IS-printing system の改良版による解析結果から、菌株の識別能については 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た。ヒトにおける動物由来サルモネラ症の可能性を探る目的で、患者由来株とミシシッピアカガメ由来のサルモネラについて PFGE による解析を行った。7 血清型の 121 株のサルモネラ分離株のうち、1 血清型 (*S. Montevideo*) において人由来 43 株がカメ由来 2 株の示す PFGE パターン (XbaI) と類似性を示した。

2. 北海道・東北・新潟ブロック

PFGE によるパルスネットの構築のためには、各検査施設における精度管理が重要となる。精度管理方法としては、共通の菌株を各

検査施設に送付して PFGE を行い、その結果を集計するという方法が一般的である。しかし、病原菌の輸送には多くのリスクが伴う。今回、北海道・東北・新潟ブロックにおいて、PFGE の精度管理方法の検討としてプラグの送付による精度管理を試みた。プラグは通常の郵便で各施設に発送した。到着までの日数は最長が 3 日で、プラグの破損その他は認められず、泳動結果への影響も認められなかった。通常郵便での輸送の場合、輸送コストの軽減につながり、また、発送後 3 日程度で到着するため、定期的な精度管理のための送付方法として有用であると思われた。制限酵素はメーカー、量、反応時間で泳動像への影響は認められなかったが、2 施設において高分子領域に薄いバンドが多数認められ、制限酵素の不良が疑われた。クラスター解析ソフトを保有する 9 施設での解析結果は同一菌株をそれぞれ同一のクラスターに分類できたが、菌株間の相同性では、菌株 A、B と菌株 C を別のクラスターに分類できたものの、菌株 A と菌株 B を別のクラスターに分類できた施設は 4 施設であった。これらのことからプラグの送付による精度管理方法は、制限酵素処理、泳動、分析の部分における各施設間の格差を把握する上でも有用であった。

3. 関東・甲・信・静岡ブロック

2008 年に分離された腸管出血性大腸菌 O157 5 株 (VT1+VT2 産生株 3 株、および VT2 産生株 2 株) を用いて PFGE 解析を行い、結果を東京都健康安全研究センターに電送して解析ソフトによる解析を試みた。多くは菌株ごとにクラスターを形成していたが、相同性が低い施設もあった。これは写真の解像度

が低いあるいはバンドがシャープではないため、解析時のバンド読み取りでバンドの選択が困難であったためであると考えられた。施設によっては担当者が頻りに交代する場合もあるため、共通菌株を用いた精度管理は、今後も行っていく必要がある。

IS-printing system 解析法 (IS 法) は PFGE 成績とも非常に良く相関し、有用な方法であることが確認された。アンケートの結果でも、IS 法は簡便であり、PFGE 法に代わる手法として非常に期待できるという結果であった。また、異なる施設間で、菌株の相同性を比較する場合は、PFGE 画像を電送し比較するよりも容易であった。しかし、IS 解析データをそのまま比較するのではなく、10 進法に変換して比較する等の工夫が必要であった。

4. 東海・北陸ブロック

東海・北陸地方 9 施設による腸管出血性大腸菌 3 検体 (0157:H7, 026:H11, 0111:HNM) を用い、サルモネラマーカー使用を統一して精度管理を実施した。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 (1 施設は PFGE 修理のため PFGE 未実施、残り 1 施設は画質が不十分であったため解析不可能であった)。施設間の相同性の比較を行なったところ、3 株何れにおいても施設間の相同性が 90% 以上 (90.7% から 99.1%) と高率であり、良好な結果が得られた。また、1 施設では PFGE 担当でない職員が担当者の指導のもと PFGE を実施し泳動図を作成した。これら泳動図は何れも良好な画質で系統樹解析においても他の泳動図と高い相同性を示した。

平成 20 年度に 5 施設で検出された 25 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 90% 以上を示すグループが 3 つ (6 株) 認められた。これらグループは何れも異なった 2 つ以上の施設由来株が含まれていた。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たことが示唆された。

東海・北陸 2 施設において 29 株の 0157 を用いて IS printing system ver2 の試行を行った。その結果、若干の非特異バンドは出現するものの、PFGE に比べ迅速性、簡便性に優れ、その解析力も PFGE と同程度と考えられた。よって集団事例発生時の疫学解析の手段として十分応用可能と思われた。

5. 近畿ブロック

EHEC の遺伝子解析法としてパルスフィールド・ゲル電気泳動 (PFGE) 法の有用性は確立されているが、共通の疫学指標として使用するため、近畿ブロックの 11 衛生研究所で同一の菌株 (2008 年に大阪府で分離された EHEC 0157:H7 5 株) を用いた精度管理を行い、施設間差および 3 人の解析者による変動を検討した。その結果、施設によって画像のコントラストは多少異なるものの、小さいバンドが比較的明瞭に区別できる画像が得られ、いずれの解析者でも菌株ごとに高い近似度を示した。また、実際に関連性の疑われた 2 人の分離株について、別々の施設で実施した電気泳動像を電送で交換し、菌株の同一性を確認した。Campylobacter jejuni の PFGE 法については、昨年度のプロトコルを改良

して7衛生研究所で検討したところ、サイズの小さいバンドが明瞭になったものの、バンド認識の困難な太すぎるバンドがみられた。そのため配布株の近似度は、*Sma*I 切断、*Kpn*I 切断ともにトレランス 1.2%では 73.7~84.7%にとどまっていた。トレランス 2.0%の解析で近似度 88.8~100%を示したが、バンド数の多少やサイズの大小にかかわらず、明瞭なバンドに区別できるよう、菌量やスイッチタイムを検討する必要があると考えられた。EHEC O157 の IS-printing System については、感染者の多い自治体で1年間に分離された127株をすべて型別し、型別能力では PFGE 法におよばないが、事例間の関連性や広域流行株の探知に、迅速性に優れたスクリーニング型別法として有用であることが確かめられた。

6. 中国四国ブロック

平成 20 年 4 月~6 月に岡山県で頻発した EHEC O157:H7 VT2 12 株を用いて IS-printing System を実施した。キットに添付されている 6X Loading Dye に代えて、市販のキシレンシアノールと BPB を含む Loading buffer を用いた結果、キシレンシアノールは長時間の泳動でもゲル内に止まり泳動状況の良い指標となった。泳動時間は、1st set primer の PCR 産物がミュービッドでは 80 分間、ミュービッドよりゲルが長い Pico-2 は 120 分間、2nd set primer の場合は、ミュービッドで 80 分間、Pico-2 は 135 分間行った結果、良好な結果を得た。中四国地域で分離された菌株のうち、8 地方衛生研究所の報告にある 125 株について、IS-printing System コードパターン毎および PFGE 型毎にまとめて比較した結果、97 株、27 組では複数の株が

同一コードパターンを示し、同時に同じ PFGE 型であったものが 11 組 (40.7%) で、これらは全て同一県内で分離された株同士であった。同一の IS-printing System コードパターンを示した株で PFGE 型が異なったものは 16 組 (59.3%) で、このうち 9 組 (56.3%) は同一県内で分離された株、7 組 (43.8%) は複数県で分離された株であった。また、PFGE 型毎にまとめると、77 株、23 組は複数の株が同一の PFGE 型を示し、同時に同一の IS-printing System コードパターンであったものが 15 組 (65.2%) で、これらは全て同一県内で分離された株同士であった。同一の PFGE 型を示した株で IS-printing System コードパターンが異なったものは 8 組 (34.8%) で、このうち 2 組 (25.0%) は同一県内で分離された株、6 組 (75.0%) は複数県で分離された株であった。これらのことから、PFGE 型別の方が IS-printing System コードパターンよりバリエーションが多く、識別能力は高かったが、両法ともいくつかの同じ型あるいはパターンが他法では複数のパターンあるいは型に分かれた。

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 20 度は 1) IS-printing System に関する基礎的研究、2) 研修 (新規遺伝子解析法：大腸菌の病原性因子の検査とその解析法)、3) 事例検討の 3 課題について実施した。平成 19 年度に解析し、*eae* と *hlyA* が検出されない株について宮崎大学及び各地研において再度解析した結果、全ての株で *eae* および *hlyA* は陽性となった。このことから、*eae* および *hlyA* が陰性であった結果は、PCR エ

ラーによるものである可能性が高いと考えられた。九州地区で分離された 219 株について IS-printing および PFGE により解析し、結果を比較検討した。その結果、IS-printing が 74 タイプ、PFGE が 140 タイプに分類された。PFGE の分類は、IS-printing の分類の約 2 倍であった。

ウイルスグループ；

サポウイルス (Sapovirus, SaV) の遺伝子型と抗原性の関係を明らかにするために、SaV GI/1、GI/5、GII/2、GII/3、GIV、および GV の組換え粒子 (VLPs) を発現し、高力価血清ならびに単クローン抗体を作製した。VLPs とその抗血清の交差反応性を抗原 ELISA で解析した結果、遺伝子群特異的単クローン抗体、遺伝子型特異的単クローン抗体、および全ての SaV VLP と反応する単クローン抗体が得られた。大腸菌発現系を用いて GII/4 変異型ノロウイルス (2006b 型) のカプシド蛋白の一部である P ドメインを発現させ、大量の P ドメイン蛋白を作製することができた。FPLC 及び SDS-PAGE の解析結果より P particle と P dimer と考えられるピークがみられ、多量の P particle の形成が示唆された。得られた P particle を用いた Saliva binding ELISA では、今回の NVGII/4 変異型は A、B、O 型、非分泌型、すべての型との結合はみられなかった。非構造蛋白質領域と構造蛋白質領域の系統樹を bootstrap probability > 95% の部分のみを対象として比較したところ、nebovirus では、AY082891、sapvirus では、AY237420、AY237420、AY603425、AY646855 の祖先配列、norovirus では、AB081723、更に、(AB045603、AB044366、

AB039775、U07611、AY772730、AF504671、AY237415、DQ456824、DQ366347、AY134748、AB083780、AB039781、AB039782、AB365435) の 14 配列の間においてゲノムの組換えが示唆された。また、非構造蛋白質領域で作成された系統樹と構造蛋白質領域を更に VP1 と VP2 に分け、そのうちの VP1 だけで作成された系統樹と比較することによっても得られた。更に、図には示さないが、VP1 の N-terminal 領域の核酸配列 (従来より、Capsid N/S 領域と名付けられ、核酸塩基配列を用いた NoV の遺伝子型分類に用いられてきた領域) を用いた解析でも、同様の結果が得られた。従って、構造蛋白質領域 (VP1 + VP2) の系統樹、VP1 だけの系統樹、VP2 だけの系統樹、の 3 者間で矛盾はなく、更に Capsid N/S 領域の塩基配列を用いた系統樹とも矛盾が無く、非構造蛋白質コード領域と構造蛋白質コード領域のジャンクション領域でゲノムの組換えが起きていることが証明された。このゲノムの組換えは、今まで報告されていた Norovirus や Sapovirus だけの特徴ではなく、カリシウイルス全体に観察される現象であることが示唆された。

原虫グループ；

前年度に引続き、感染症発生動向調査において原因不明とされた感染性胃腸炎検体に関して、迅速診断キットを用いたクリプトスポリジウムおよびジアルジアの検出を試みた。感染性胃腸炎の原因不明例として 44 検体を調べ、その中でクリプトスポリジウム抗原陽性が 2 例検出された。検出率としては 4.5% (2/44) であった。ジアルジアは検出されなかった。年次別でみると、2006 年は

構造蛋白質のアミノ酸配列とウイルスの病原性に関係がある場合、また、非構造蛋白質領域が宿主域の決定に関係する場合は、これらに関する蛋白質コード領域を対象とした遺伝子型分類法を構築し、標準化する必要がある。

現在、国内において購入可能なクリプトスポリジウムおよびジアルジアの迅速検査キットとして、3種類のキットの性能を比較した。その中で検査の実用に応える性能という点からみると、全体的にイムノクロマト法のImmunoCard STAT!ならびにELISAのProSpectは感度、特異性でイムノクロマト法のDuo-Stripよりも優ると考えられた。

本研究では、感染症法に基づく感染性胃腸炎の発生动向調査において、原虫検査を病原体検査の一つとしてルーティンに行った場合、現在の統計を上回る低年齢層感染者が存在することが示唆された。クリプトスポリジウム症およびジアルジア症は実際には国外の状況に似た、全体的な感染者の絶対数は少ないかもしれないが、その中で低年齢層にも感染が発生しており、その原因となるリスクが存在することに注意を払うことが必要である。

水試料のクリプトスポリジウム検査の迅速化を目指して、現行の顕微鏡検査法と比較してクリプトスポリジウムDNAを用いた5種類のTaq-Man PCR法によるクリプトスポリジウム検出法を評価した。その結果では、標的遺伝子を18S rRNAとしたMillerらのTaq-Man PCRシステムが最も優れていたが、今後、実際の水試料からのクリプトスポリジウム検出での性能を検討する必要があると考えられた。

河川別のオーシストとシストの最大濃度は、二次支川であるA川において高濃度で検出される傾向が見られ、支川では人為的負荷の影響を大きく受けていることが明らかとなった。また、利根川において小山川合流後、小山川においてはA川合流後の濃度が高い値を示したことから、支川の汚濁状況が本川にも影響を及ぼすことが示唆された。A川における原虫濃度の日変動の調査から、クリプトスポリジウムは各時間帯で常に検出され、定期調査におけるA川での陽性率が極めて高いこと、および降雨等の突発的な要因もなかったこと等を考慮すると、A川流域は定常的に原虫によって汚染されていることが示唆された。

E. 結論

広域食品由来感染症における感染源の解明や感染症の拡大を阻止するためには、原因病原体の解析情報を関係機関において共有することが重要である。細菌感染症においては、継続的な精度管理により、PFGEの解析情報が各ブロック内の地研においても共有可能となりつつあることが示された。ウイルス感染症では、サポウイルスのGI/1、GI/5、GII/2、GII/3、GIV、およびGVのVLPsを発見し、遺伝子型特異的、遺伝子群特異的単クローン抗体を得ることができた。大腸菌発現系によるGII/4変異型NVの抗原の発現は、簡便性、コスト面において他法より有用な方法であると考えられた。カリシウイルスの遺伝子型分類は、非構造蛋白質コード領域と構造蛋白質領域で異なる結果を導くことがある。非構造蛋白質のアミノ酸配列とウイルスの病原性に関

係がある場合、また、非構造蛋白質領域が宿主域の決定に係る場合は、これらに関する蛋白質コード領域を対象とした遺伝子型分類法を構築し、標準化する必要がある。

原虫感染症では、水道水源環境におけるクリプトスポリジウムオーシスト及びジアリジアシストによる汚染状況を明らかにするとともに、畜産排水処理施設での原虫除去率を明らかにした。また、低年齢層における両原虫症感染者が現在の報告よりも多い可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Kam KM, Luey CK, Parsons MB, Cooper KL, Nair GB, Alam M, Islam MA, Cheung DT, Chu YW, Ramamurthy T, Pazhni GP, Bhattacharya SK, Watanabe H, Terajima J, Arakawa E, Ratchtrachenchai OA, Huttayananont S, Ribot EM, Gerner-Smidt P, Swaminathan B; for the Vibrio parahaemolyticus PulseNet PFGE Protocol Work Group. Evaluation and Validation of a PulseNet Standardized Pulsed-Field Gel Electrophoresis Protocol for Subtyping Vibrio parahaemolyticus: an International Multicenter Collaborative Study. J Clin Microbiol. 2008 Aug. 46 (8):2766-2773.

Saitoh T, Iyoda S, Yamamoto S, Lu Y,

Shimuta K, Ohnishi M, Terajima J, Watanabe H. Transcription of the ehx enterohemolysin gene is positively regulated by GrlA, a global regulator encoded within the locus of enterocyte effacement in enterohemorrhagic Escherichia coli. J Bacteriol. 2008 Jul;190(14):4822-30.

Matsumoto M, Suzuki M, Takahashi M, Hirose K, Minagawa H, Ohta M. Identification and epidemiological description of Enterohemorrhagic Escherichia coli O157 strains producing low amounts of Shiga toxin 2 in Aichi Prefecture, Japan. Jpn. J. Infect. Dis. 2008 61:442-445.

東京都健康安全研究センター 微生物部食品微生物研究科：学生食堂で発生した腸管出血性大腸菌 O157 による大規模食中毒事例 - 東京都，病原微生物検出情報（国立感染症研究所），29，5，4-5，2008

勢戸和子：患者発生現場でのバイオセーフティ 腸管出血性大腸菌- 正しい知識で正しく予防，BMSA会誌，19:85-89，2008.

Yamazaki, Y., Seto, K., Taguchi, M., Ishibashi, M., Inoue, K.: Sensitive and rapid detection of cholera toxin-producing *Vibrio cholerae* using a loop-mediated isothermal amplification. BMC Microbiology, 8:94, 2008.

Someya Y, Takeda N, Wakita T, 2009. Ultimate Mutational Analysis of Norovirus 3C-like Protease. J Biochem: in press.