

- Okamoto R, Arita T, Toda S, Kato H, Iwata H, Akiyama M, Nishio O, Kimura H, Noda M, Takeda N, Oka T, 2009. Detection of multiple sapovirus genotypes and genogroups in oyster-associated outbreaks. *Jan J Infect Dis*: in press.
- Oka T, Yamamoto M, Miyashita K, Hansman GS, Ogawa S, Katayama K, Wakita T, Takeda N, 2009. Self-assembly of sapovirus recombinant virus-like particles from polyprotein in mammalian cells. *Microbiol Immunol*: in press.
- Harada S, Okada M, Yahiro S, Nishimura K, Matsuo S, Miyasaka J, Nakashima R, Shimada Y, Ueno T, Ikezawa S, Shinozaki K, Katayama K, Wakita T, Takeda N, Oka T, 2009. Surveillance of pathogens in outpatients with gastroenteritis and characterization of sapovirus strains between 2002 and 2007 in the Kumamoto Prefecture, Japan. *J Med Virol*: in press.
- Wu FT, Oka T, Takeda N, Katayama K, Hansman GS, Muo CH, Liang SY, Hung CH, Dah-Shyong Jiang D, Hsin Chang J, Yang JY, Wu HS, Yang CF, 2008. Acute gastroenteritis caused by GI/2 sapovirus, Taiwan, 2007. *Emerg Infect Dis* 14: 1169-71.
- Shirato H, Ogawa S, Ito H, Sato T, Kameyama A, Narimatsu H, Xiaofan Z, Miyamura T, Wakita T, Ishii K, Takeda N, 2008. Noroviruses distinguish between type 1 and type 2 histo-blood group antigens for binding. *J Virol* 82: 10756-67.
- Motomura K, Oka T, Yokoyama M, Nakamura H, Mori H, Ode H, Hansman GS, Katayama K, Kanda T, Tanaka T, Takeda N, Sato H, 2008. Identification of monomorphic and divergent haplotypes in the 2006-2007 norovirus GII/4 epidemic population by genomewide tracing of evolutionary history. *J Virol* 82: 11247-62.
- Ishida S, Yoshizumi S, Miyoshi M, Ikeda T, Okui T, Katayama K, Takeda N, Oka T, 2008. Characterization of sapoviruses detected in Hokkaido, Japan. *Jpn J Infect Dis* 61: 504-6.
- Iritani N, Kaida A, Kubo H, Abe N, Murakami T, Vennema H, Koopmans M, Takeda N, Ogura H, Seto Y, 2008. Epidemic of genotype GII.2 noroviruses during spring 2004 in Osaka City, Japan. *J Clin Microbiol* 46: 2406-9.
- Hansman GS, Oka T, Takeda N, 2008. Sapovirus-like particles derived from polyprotein. *Virus Res* 137: 261-5.
- Toshiro Kuroki, Shinji Izumiyama, Kenji Yagita, Yumi Une, Hideki Hayashidani, Masaki Kuro-o, Akira Mori, Hajime Moriguchi, Michihisa Toriba, Toru Ishibashi, Takuro Endo (2008): Occurrence of *Cryptosporidium* sp. in snakes in Japan. *Parasitology Research* 103: 801-805.
- 吉田徹也、粕尾しづ子、畔上由佳、宮澤衣鶴、小林正人、白石 崇、岡 智一郎、片山和彦、

武田直和 長野県内で発生したサポウイルスによる集団感染性胃腸炎の2事例 IASR Vol. 29 p. 129-132: 2008.

大塚有加, 近藤玲子, 市川高子, 山下育孝, 大瀬戸光明, 関谷安正, 上田哲郎, 芝 信明, 岡 智一郎, 片山和彦, 武田直和 結婚式場におけるサポウイルスを原因とする食中毒事例-愛媛県IASR Vol. 29 p. 198-200: 2008.

片山和彦 「ノロウイルス感染症を予防するには“冬に流行する感染性胃腸炎”」婦人の友 第102巻 第16号 通巻1267号 p158-161. 2008

片山和彦 「ノロウイルス感染症」チャイルドヘルス 特集; 詳しく知りたい冬のウイルス感染症 vol. 11, no. 11 p25-29, 2008.

片山和彦 ノロウイルス感染症の検査とその意義 アボット感染症アワー <http://radio848.rs.jp.net/abbott/> 2007.

片山和彦 ノロウイルスの遺伝子型IASR, <http://idsc.nih.go.jp/pathogen/refer/noro-kaisetu.html> 2007

片山和彦 ノロウイルス複製系における最近の知見 IASR Vol. 28 p 293-294: 2007

片山和彦, 岡部信彦 感染症の話、ノロウイルス 感染症 IDWR, http://idsc.nih.go.jp/idwr/kansen/k04/k04_11/k04_11.html 2004, 2007改訂

片山和彦 養護教諭のなんでも質問箱 ノロウイルスについて 「心と体の健康」; Vol. 11 No. 117 Nov. p86-88, 2007.

本村和嗣, 岡智一郎, 中村浩美, 守宏美, Hansman Grant, 横山勝, 片山和彦, 神田忠仁, 武田直和, 佐藤裕徳 「2006秋冬期シーズンに流行したノロウイルス GII/4 株のゲノム解析」病原体微生物情報 (IASR) 10月号 p3-p4 2007.

片山和彦 ウイルス感染症-最新の動向 ノロウイルス感染症 臨床検査 vol. 53

p70-76:2009

片山和彦 特集=感染症をめぐるトピックス ノロウイルス感染症の対策と治療 MEDICAMENT NEWS 1969号: 2009

高木正明, 鳥海宏, 遠藤卓郎, 山本徳栄, 黒木俊郎 (2008): プール水を介したクリプトスポリジウム症集団発生事例、感染症学雑誌, 82 (1): 14-19.

2. 学会発表

寺嶋 淳, 伊豫田 淳, 泉谷秀昌, 三戸部治郎, 石原朋子, 渡邊治雄: 2006年におけるO157:H7を中心としたEHECの動向について。第81回日本細菌学会総会、2008年3月、京都

陸 彦, 伊豫田 淳, Claudia Toma, 伊藤健一郎, 八柳 潤, 大西 真, 寺嶋 淳, 渡邊治雄: LEE非保有型の志賀毒素産生性大腸菌が保有する新規免疫グロブリン結合遺伝子ファミリーの解析。第81回日本細菌学会総会、2008年3月、京都

大岡唯祐, 小椋義俊, 中山啓介, 寺嶋 淳, 渡邊治雄, 林 哲也: 腸管出血性大腸菌O157の小規模ゲノム構造多型に関する詳細な解析。第81回日本細菌学会総会、2008年3月、京都

齋藤 剛仁, 伊豫田 淳, 山本章治, 陸 彦, 志牟田 健, 大西 真, 寺嶋 淳, 渡邊治雄: 腸管出血性大腸菌におけるLEEとエンテロヘモリシンの協調発現制御機構。第81回日本細菌学会総会、2008年3月、京都

伊豫田 淳, 山本章治, 陸 彦, 寺嶋 淳, 渡邊治雄: 腸管出血性大腸菌における病

- 原性遺伝子群の統括的発現制御因子 Gr1A の機能に関する遺伝学的解析。第 81 回日本細菌学会総会、2008 年 3 月、京都
- 横山栄二：キムチを原因食品とした腸管出血性大腸菌 O157 集団感染事例における検査および行政対応とその問題点、第 21 回地研全国協議会関東甲信静支部細菌研究部会総会・研究会、2009、横浜市
- Matsumoto M, Suzuki M, Yamazaki M, Hiramatsu R, Toyama A, 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 第43回日米コレラ細菌性感染症専門部会 平成20年11月17-19日 福岡市
- 勢戸和子, 田口真澄：非典型的性状を示す志賀毒素産生性大腸菌O157, 第82回日本感染症学会総会 (2008年4月, 松江)
- Shirato H, Someya Y, Li T, Wakita T, Takeda N, Miyamura K, 2008.10. Development of Inactivated Polio Vaccine in Japan. Milieu Foundation Vaccine Workshop. Tokyo, Japan.
- Oka T, Yokoyama M, Katayama K, Yamamoto M, Miyashita K, Ogawa S, Motomura K, Tsunemitsu H, Wakita T, Sato H, Takeda N, 2008.10. Substrate specificities of calicivirus-encoded 3C-like proteases. The Forum of the Network of Research Centers on Infectious Diseases. Hanoi, Vietnam.
- Oka T, Yamamoto S, Katayama K, Wakita T, Takeda N, 2008.8. Role of amino acid residues located upstream from cleavage site on apovirus ORF1 polyprotein processing. IUMS2008. Istanbul, Turkey.
- Oka T, Iwakiri A, Yamamoto S, Katayama K, Wakita T, Takeda N, 2008.8. Sequential analysis of fecal sapovirus shedding. IUMS2008. Istanbul, Turkey.
- Katayama K, Hansman GS, Oka T, Suzuki Y, Wakita T, Takeda N, 2008.8. Newly identified human norovirus Sa299 strain may be recombinant between one genogroup and the other. IUMS2008. Istanbul, Turkey.
- Hung P, Kao C, Chang S, Huang L, Takeda N, Lee C, 2008.8. The Seroepidemiology of Norovirus in Taiwan Established by ELISA Using E.coli-Expressed Capsid Antigen IUMS2008. Istanbul, Turkey.
- 片山和彦、岡智一郎、脇田隆宇、武田直和「ノロウイルスプロテアーゼを利用したノロウイルスリバースジェネティクスシステムの制御」第81回日本生化学会大会・第31回日本分子生物学会年会合同大会 2008年12月9日(火) -12日(金) 神戸ポートアイランド
- 片山和彦、村上耕介、鈴木さやか、岡島徹也、灘野大太、岡智一郎、松田幹「ノロウイルス・ウイルス様粒子(VLPs)のヒト腸上皮様Caco-2細胞への結合様式とウシ初乳のVLPs結合抑制効果」第81回日本生化学会大会・第31回日本分子生物学会年会合同大会 2008年12月9日(火) -12日(金) 神戸ポートアイランド

- 岡 智一郎、横山 勝、片山 和彦、恒光 裕、山本 真民、宮下 佳奈、本村和嗣、脇田隆字、佐藤 裕徳、武田 直和「カリシウイルスプロテアーゼの活性発現に重要なアミノ酸残基の解析」第81回日本生化学会大会・第31回日本分子生物学会年會合同大会2008年12月9日(火)～12日(金)神戸ポートアイランド
- 横山 勝、岡 智一郎、片山 和彦、神田 忠仁、武田 直和、佐藤 裕徳「カリシウイルスプロテアーゼ分子モデルによる基質認識の解析」第81回日本生化学会大会・第31回日本分子生物学会年會合同大会2008年12月9日(火)～12日(金)神戸ポートアイランド
- 本村和嗣、横山勝、岡智一郎、中村浩美、守宏美、Grant H、片山和彦、田中智之、真崎宏則、星野和彦、蒔本恭、秋山美穂、木村博一、神田忠仁、武田直和、佐藤裕徳、2008. 10. ノロウイルスの免疫淘汰と周期的流行の分子機序. 第56回日本ウイルス学会学術集会. 岡山.
- 北島正章、岡智一郎、片山和彦、原本英司、片山浩之、武田直和、大垣真一郎、2008. 10. 河川中のノロウイルスを指標にした地域流行株の把握. 第56回日本ウイルス学会学術集会. 岡山.
- 片山和彦、岡智一郎、脇田隆字、武田直和、2008. 10. リバースジェネティクスを利用したノロウイルスの病原性発現機構の解析. 第56回日本ウイルス学会学術集会. 岡山.
- 武田直和、2008. 10. 食品媒介性ウイルス感染症の現状と対策. 第30回日本食品微生物学会学術セミナー. 静岡.
- 飯塚節子、岡智一郎、片山和彦、武田直和、野田衛、2008. 10. サポウイルスとノロウイルスが検出された食中毒事例. 第56回日本ウイルス学会学術集会. 岡山.
- 白土東子、熊谷安希子、伊藤浩美、隆 佐、龜山昭彦、久 成、脇田隆字、石井孝司、武田直和、2008. 10. ノロウイルスによる血液型抗原の識別. 第56回日本ウイルス学会学術集会. 岡山.
- 東方美保、斎藤博之、田中智之、武田直和、2008. 10. 食品検体のノロウイルス検査に向けたパンソルビン・トラップ法の実用性の検討. 第56回日本ウイルス学会学術集会. 岡山.
- 田村務、西川真、野田衛、田中智之、武田直和、鈴木宏、2008. 10. 急性胃腸炎患者から嘔吐後に採取された口腔うがい液中のノロウイルスの定量. 第56回日本ウイルス学会学術集会. 岡山.
- 染谷雄一、武田直和、脇田隆字、2008. 10. ノロウイルス3C様プロテアーゼGlu54残基変異の基質認識への影響. 第56回日本ウイルス学会学術集会. 岡山.
- 森嘉生、山下哲夫、嶋亮一、森石恆司、李天成、武田直和、松浦善治、2008. 10. 型肝炎ウイルス様粒子形成に重要なアミノ酸の同定と細胞吸着阻害モノクローナル抗体の作製. 第56回日本ウイルス学会学術集会. 岡山.
- 植木洋、庄司美加、山本美和子、阿部勝彦、伊藤文明、池田義文、西尾治、岡智一郎、片山和彦、武田直和、野田衛、2008. 10. カキを用いたサポウイルスの環境調査.

- 第 56 回日本ウイルス学会学術集会. 岡山.
- 小澤一弘, 岡智一郎, 片山和彦, 本村和嗣, 中村浩美, 守宏美, 佐藤裕徳, 武田直和, 2008. 10. 調理従事者を対象としたノロウイルスの網羅的検出調査. 第 56 回日本ウイルス学会学術集会. 岡山.
- 山下哲夫, 宮崎直幸, 森嘉生, 森石恆司, 李天成, 宮村達男, 武田直和, 吉村政人, 月原富武, 善治 松, 2008. 10. 分解能 3.5A の E 型肝炎ウイルス様粒子の X 線結晶構造解析. 第 56 回日本ウイルス学会学術集会. 岡山.
- 三好龍也, 武田直和, 田中智之, 2008. 10. G II/4 型ノロウイルス P particle の発現と血液型抗原との結合. 第 56 回日本ウイルス学会学術集会. 岡山.
- 斎藤博之, 東方美保, 田中智之, 武田直和, 2008. 10. 食品からのノロウイルス回収を目的としたパンソルビン・トラップ法の開発. 第 56 回日本ウイルス学会学術集会. 岡山.
- 高木弘隆, 遠矢幸伸, 片山和彦, 岡智一郎, 武田直和, 杉山和良, 2008. 10. 国内で分離されたマウスノロウイルスの安定性および消毒剤に対する感受性の検討. 第 56 回日本ウイルス学会学術集会. 岡山.
- 原田誠也, 岡田峰幸, 岡智一郎, 八尋俊輔, 西村浩一, 松尾繁, 中島龍一, 篠崎邦子, 片山和彦, 武田直和, 2008. 10. サボウウイルスによる散発性下痢症の地域流行-熊本-. 第 56 回日本ウイルス学会学術集会. 岡山.
- 吉田徹也, 粕尾しず子, 畔上由佳, 内山友里恵, 薩摩林一代, 白石崇, 岡智一郎, 片山和彦, 武田直和, 2008. 10. 長野県内で発生したサボウウイルスによる集団感染性胃腸炎の 2 事例. 第 56 回日本ウイルス学会学術集会. 岡山.
- 岩切章, 山本正悟, 岡智一郎, 片山和彦, 武田直和, 2008. 10. リアルタイム RT-PCR 法を用いた急性胃腸炎患者糞便中のサボウウイルス排泄期間の解析. 第 56 回日本ウイルス学会学術集会. 岡山.
- 加藤大介, 三好龍也, 内野清子, 鎌田公仁夫, 高橋幸三, 武田直和, 田中智之, 2008. 10. 改良 Immunochromatography 法によるノロウイルス抗原検出. 第 56 回日本ウイルス学会学術集会. 岡山.
- 岡智一郎, 横山勝, 片山和彦, 恒光裕, 山本真民, 宮下佳奈, 本村和嗣, 守宏美, 中村浩美, 脇田隆宇, 佐藤裕徳, 武田直和, 2008. 10. カリシウイルスプロテアーゼの基質認識に影響する切断部位上流アミノ酸残基の解析. 第 56 回日本ウイルス学会学術集会. 岡山.
- 横山勝, 岡智一郎, 片山和彦, 山本真民, 宮下佳奈, 神田忠仁, 武田直和, 佐藤裕徳, 2008. 10. サボウウイルスプロテアーゼの基質認識に関わるアミノ酸残基の解析. 第 56 回日本ウイルス学会学術集会. 岡山.
- Cryptosporidium* オーストおよび *Giardia* シストの精製方法の検討, 日本水環境学会年会 (2009. 3)
- 中野雅之, 岸田直裕, 金京柱, 原本英司, 浅見真理, 秋葉道宏. 利根川水系におけるクリプトスポリジウムとジアルジア濃度の季節及び日変動, 第 60 回全国水道研究

発表会；2009年5月；さいたま市（発表
予定）

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

「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」

分担研究報告書

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
研究協力者	伊豫田 淳	国立感染症研究所 細菌第一部
研究協力者	三戸部 治郎	国立感染症研究所 細菌第一部
研究協力者	大岡 唯祐、林 哲也	宮崎大学・医学部・医学科
研究協力者	地方衛生研究所	

なお、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た。

研究要旨 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。PFGE解析結果は、BioNumericsによる系統樹作成に基づくサブタイプ名の付与とPFGEパターンのデータベース構築に使用した。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都道府県から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。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。

A. 研究目的

腸管出血性大腸菌感染症の発生では、特に広域に及ぶ同時多発的な散発事例を早期に探知し、その拡大を未然に防ぐことが重要である。本研究

では、腸管出血性大腸菌のPFGEによる解析から国内分離株の遺伝子型に基づく動向を把握し、広域発生事例等の拡大防止対策に貢献することを目的とした。特にEHEC O157については、広域

分離株を中心に PFGE 及び MLVA による解析を行い、株間の遺伝学的な関連性を調べることでこれらの方法の実用性について検討した。また、一部の集団発生分離株では、IS-printing system を同時に使用することにより本システムの O157 株識別能について検討した。

B. 研究方法

平成 20 年度に感染研に送付された腸管出血性大腸菌に対して PFGE 解析を行った。結果については、E-mail により菌株送付機関に返信するとともに、感染研のサーバー上で全国の地研の担当者に対して ID とパスワードの組合せによる限定公開を行った。MLVA については、米国 CDC が使用している 9 組の primer を用いて行った。PCR 反応は、GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystem 社)で行った。また、fragment size marker としては、GeneFlow 625 ROX labeled (CHIMERx 社、米国)を使用し、Fragment Analysis には ABI-3130xl Genetic Analyzer 及び解析ソフトとして GeneMapper (Applied Biosystems 社)を用いた。PFGE 及び MLVA の結果は BioNumerics (Applied Maths 社)を用いて解析を行った。IS-printing system (東洋紡)では、昨年度版に新たな検出項目が加わった改訂版を用いて 2007 年に発生した集団事例由来 O157 の解析を行った。方法は、添付のプロトコルに準じた。

C. 研究結果

1. PFGE 解析結果と dendrogram によるサブタイプング

EHEC O157 については、2008 年に分離・送付された 1737 株が、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 種類見いだされ、集団発生由来株等がクラスターを形成した(図 1)。EHEC O26

についても同様に、集団発生由来株がクラスターを形成した(図 2)。後述するように、EHEC O157 では散発事例由来株においても *Xba*I 消化による PFGE 解析結果において同一クラスターに属する分離株が検出された。O157 以外の血清群の株については、このようなクラスター形成をする散発事例由来株はみられなかった。

2. EHEC における広域共通パターンを示す株の解析

2008 年に分離された 1737 株の EHEC O157 は、850 種類のサブタイプに分かれ、そのうち 45 種類については、*Xba*I 消化の結果では同一クラスターを形成し少なくとも 3 つの異なる都道府県から分離されていた。このうち、2008 年に出ているパターンである、Type No.(TN) d148 のパターンについては、24 都道府県から 56 株が散発事例から分離されており、一部では集団発生由来株も含まれていた。これらの株の分離期間は 7 月から 9 月の 3 カ月に及んでいた(図 3)。その他に、11 箇所以上の異なる都道府県において分離される広域共通パターンとして、2007 年に引き続き分離されていたパターンである TN c57、TN c293、及び TN c47 が見いだされた(図 4~6)。これらの 5 種類のパターンを示す株はその大部分が *Xba*I の結果だけではなく BinI の結果においても同一パターンを示していることから、極めて clonality の高い株であることが示唆された。また、TN c293 については、散発事例だけでなく複数の集団発生(OB)をも引き起こしており、いずれも焼肉店における集団発生であるが、両者の関連性を示唆するような疫学的情報は得られていない。

広域に及ぶ分離株である TN d148 及びその類似のパターンを示す株、計 49 株について MLVA を行った結果、38 株はすべての遺伝子座におい

てリピート数が一致し(A型)、1遺伝子座において1だけリピート数が異なる変異株(Single Locus Variant: SLV1)は38株、その他に複数の遺伝子座においてリピート数の異なる株が6株存在していた(表1)。

2. カメ由来サルモネラ症の探索について

「動物由来感染症のコントロール法の確立に関する研究」吉川班から提供された、ミシシippアカガメ由来のサルモネラ8血清型12株のPFGE泳動像をパルスネット上で公開し、これらの血清型株あるいはパターンに類似する株について提供のお願いを行った。その結果、7血清型121株の提供があり、1血清型(S. Montevideo)においてヒト由来43株がカメ由来2株の示すPFGEパターン(XbaI digestion)と類似性を示した(図7)。

3. IS-printing system による集団発生事例由来 O157 の解析

集団発生由来株を用いたIS-printing systemでの解析では、集団内で1株程度の変異株が4つの異なる事例内で観察された(図8:A, C, D, G)がそれぞれの集団事例が異なるクラスターとなった。またMLVAの結果から同一集団事例内でもさらに変異株が存在している場合が示唆された(図8:G)。いずれの解析方法でも同一集団事例由来株は同一クラスターを形成し、IS-printing system およびMLVAを合わせた結果でも図8のA~Gで示されるような大きなクラスターごとに分かれた。変異株の識別能については、MLVAの方がIS-printing systemよりも優れていた(data not shown)。

D. 考察

PFGEパターンが同一と思われる、複数の都道府県から分離されるEHEC O157は、毎年数種類見出されるが、分布している都道府県の数が2008年に分離株については、11~24都道府県とか

なり多いことが明らかになった。広域から分離されるパターン自体は年により変化しているが、連続で分離されるパターンもある。2007年に出現して集団発生も引き起こしたTN c47については、2008年においても数こそは少ないが、連続して分離されていることから、感染源が完全に消滅しているわけではないことが考えられた。比較的短期間(3ヵ月)に分離されたTN d148については、MLVAの結果からもその遺伝学的な均一性が示唆され、同一感染源による広範囲に発生したunrecognized outbreakの可能性が考えられるが、疫学的な調査結果で互いの関連性を示す結果は得られていない。このような広域流行株による感染の拡大を阻止するために、その発生を早期に探知することとその感染源を解明することが今後の課題と考えられる。

カメを感染源とするサルモネラ症の報告はいくつかあり注意喚起がなされてきた。爬虫類を感染源とするサルモネラ症の実態は不明であるため、動物由来感染症班との共同研究により患者株にその可能性を示唆する結果が得られたことは意義あるものと考えられる。両者の関連性を論じるには、患者株とカメ由来株のより詳細な解析が必要であり、爬虫類を感染源とするサルモネラ症を把握するうえでも今後の継続的な監視が重要である。

IS-printing systemは、PFGEに比べると迅速性と簡便性に優れているが、その識別能についてもわずか7つの集団発生事例であるが、十分識別可能であることが明らかになった。Stxの有無を含めてPCRのみで結果が得られる利点は、迅速に解析結果が必要な現場での有用性であると考えられるが、共通の情報源としてデータベース化するためには、標準的なキット等と厳密な精度管

理が必須であろう。

E. 結論

2006年及び2007年に続いて2008年のEHEC O157においてもPFGEで共通パターンを示す広域分離株が存在していることが明らかになった。特に2008年に初めて出現したパターンであるTN d148を示すO157では、MLVAにおいても遺伝子構成が極めて類似していることが明らかとなり、お互いの関連性が高い可能性が示唆された。発生の初期にこのような分離株の解析情報を迅速に共有し疫学調査に活用することで、感染源の探知・感染拡大の阻止に結びつくことが期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1) 誌上发表

1. 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.

2. 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 GrIA, a global regulator

encoded within the locus of enterocyte effacement in enterohemorrhagic Escherichia coli. J Bacteriol. 2008 Jul;190(14):4822-30.

2) 学会発表

1. 寺嶋 淳、伊豫田 淳、泉谷秀昌、三戸部治郎、石原朋子、渡邊治雄:2006年におけるO157:H7を中心としたEHECの動向について。第81回日本細菌学会総会、2008年3月、京都
2. 陸 彦、伊豫田 淳、Claudia Toma、伊藤健一郎、八柳 潤、大西 真、寺嶋 淳、渡邊治雄:LEE非保有型の志賀毒素産生性大腸菌が保有する新規免疫グロブリン結合遺伝子ファミリーの解析。第81回日本細菌学会総会、2008年3月、京都
3. 大岡唯祐、小椋義俊、中山啓介、寺嶋 淳、渡邊治雄、林 哲也:腸管出血性大腸菌O157の小規模ゲノム構造多型に関する詳細な解析。第81回日本細菌学会総会、2008年3月、京都
4. 齋藤 剛仁、伊豫田 淳、山本章治、陸 彦、志牟田 健、大西 真、寺嶋 淳、渡邊治雄:腸管出血性大腸菌におけるLEEとエンテロヘモリシンの協調発現制御機構。第81回日本細菌学会総会、2008年3月、京都
5. 伊豫田 淳、山本章治、陸 彦、寺嶋 淳、渡邊治雄:腸管出血性大腸菌における病原性遺伝子群の統括的発現制御因子GrIAの機能に関する遺伝学的解析。第81回日本細菌学会総会、2008年3月、京都

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

図 3

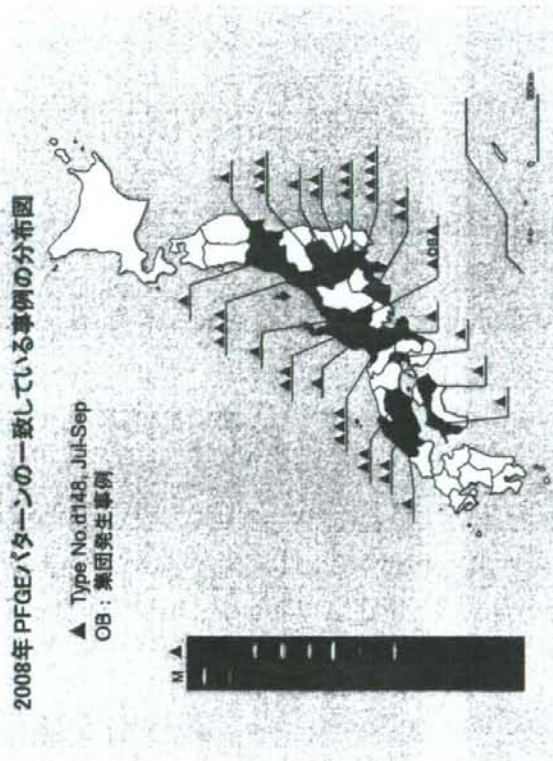


図 4

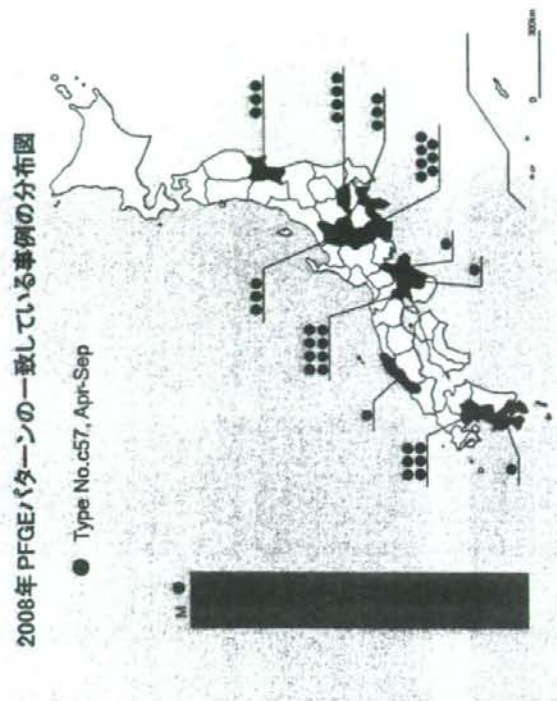


図 5



図 6

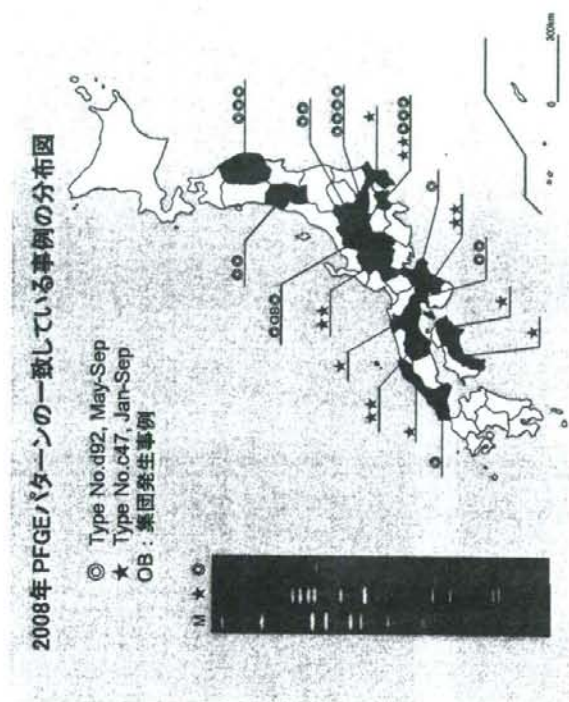


表 1

VNTR loci										Subtype			No. of isolate
25	3	34	9	17	19	36	37	10	XbaI	BlnI	MLVA	38	
4	9	10	12	8	6	5	6	40	d148	08BL001	A		2
4	10	10	12	8	6	5	6	39	d148	08BL001	B	1	1
4	9	10	12	8	6	5	6	38	d148	08BL001	C	2	5
4	9	10	12	8	6	5	6	35	d148	08BL001	D	1	1
4	9	10	12	8	6	5	6	28	d148	08BL001	E	1	1
4	9	10	11	8	7	5	6	38	d148	08BL001	F	4	6

Salmonella Montevideo PFGE(XbaI)解析

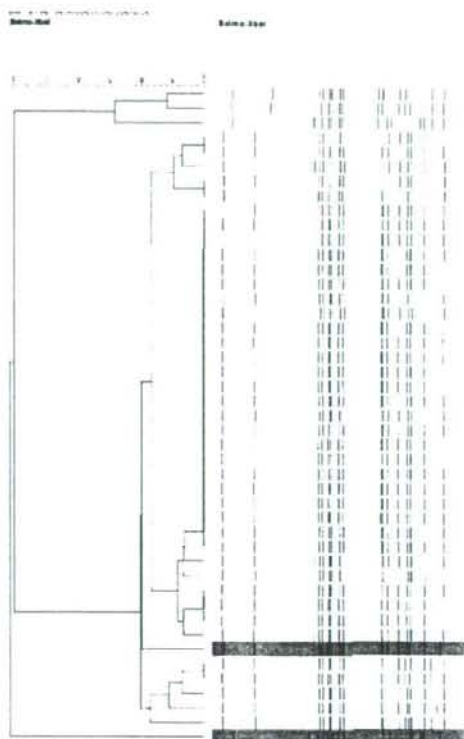
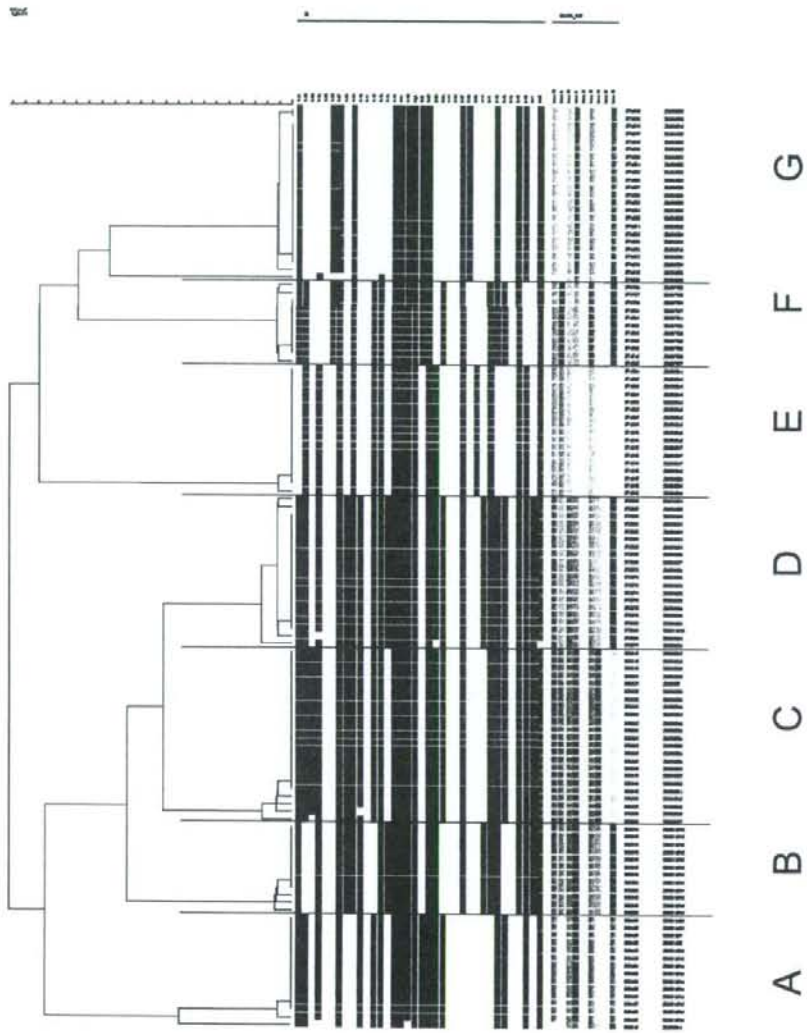


図 7

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。



「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」

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

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、森本洋、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、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
	廣地敬	札幌市衛生研究所
	野中陽子、沼田昇	仙台市衛生研究所

研究要旨：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。

A. 研究目的

食中毒事件発生時に行う疫学調査は、食品由来感染症の拡大を防ぐと共に、再発防止のために大変重要なものである。近年、腸管出血性大腸菌O157やカンピロバクター等の原因菌のDNAを用いた

分子疫学的分析が感染源究明に利用され、その有用性が報告されている。その中でパルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）法は、特に優れた分子疫学的解析法であり、国立感染症研究所を中心にデータベースの構築（Pulse-net）が進んでいる。し

かし、PFGE は手技や解析者の違いによる施設間格差が生じることが多く、各施設の精度管理が重要である。PFGE の精度管理方法としては、共通の菌株をそれぞれの施設でプラグにし、制限酵素処理、泳動、泳動結果の解析を行って、施設間格差を最小限にすることが行われている。この方法は、PFGE の全行程を確認することができ、それぞれの施設の問題点を確認する上で有用であるが、その反面、病原菌をそれぞれの施設に配布しなければならず、輸送コストの面や、輸送時の事故による病原菌の流出等のリスクが伴う。

そこで、今回、輸送コストとリスクの軽減を目的として、プラグの配布による精度管理方法について検討した。

B. 研究方法

1. 使用菌株

2005 年、2006 年、2007 年に北海道で分離された腸管出血性大腸菌 O157:H7、3 株 (A、B、C) を用い、それぞれの株について 2 サンプル、合計 6 サンプルを使用した。

2. プラグの作成

それぞれの株を平板分離しその 2 コロニーをそれぞれ 5mL の L-Broth で培養後、ホルマリン 500 μ L を加え 30 分間室温放置した。1 サンプル当たり 5 本の 1.5mL チューブに 1mL ずつ分注して、遠心分離後、TE で 2 回洗浄し、感染研プロトコールに従い制限酵素処理の前段階まで処理した。また、プラグ作成には、サンプルプラグキャスト 0.7mm を用いた。

3. 各施設への輸送

輸送用バッファーとしては、北海道衛研で通常プラグ保管用に使用している 0.5MEDTA (pH8.0) を使用した。2mL のマイクロチューブ (丸底スクリーキャップタイプ) にバッファー 1.5mL を加え、これにサンプルプラグキャストの 1 プラグを 4 等分して入れ、蓋をしてパラフィルムでシールし通常郵便で送付した。

4. 制限酵素処理

制限酵素は *Xba* I を使用し、メーカー、ユニッ

ト数、処理温度、時間は各施設で行っている方法で実施した。

5. PFGE

泳動条件は、6V、2.2~54.2sec、21hr、buffer 0.5 \times TBE、温度 14 $^{\circ}$ C を基本としたが、泳動時間については各施設により調整した。

また、マーカーとしては Lambda ladder (以下 L マーカーとする) と *S.Braenderup*H9812 株 (以下 SB マーカーとする) の双方を所有する施設では、双方を、それぞれ一方のみを所有する施設はそのマーカーを使用するよう指示した。

6. 結果の解析

泳動結果の解析は、各施設が所有する解析ソフトにより解析した。また、解析ソフトがない施設については、送付された泳動写真を使用して、北海道衛研で解析した。さらに、送付された泳動写真を使用して、施設間の違いについて検討した。

7. アンケート調査

各施設に対し、サンプルの到着日、制限酵素のメーカー、使用ユニット数、反応時間、PFGE 装置の種類等をアンケート調査した。

C. 研究結果

1. アンケート調査

各施設にプラグが到着するまでにかかった日数は、1~3 日で、7 施設で 2 日目に到着した。到着したプラグは肉眼的な破損等は認められなかった。検査開始日は、プラグ送付日より 2 日目が 3 施設、3 日目が 2 施設、4 日目が 1 施設で、1 週間以上が 3 施設あった。

使用した制限酵素のメーカーは 3 社でそれぞれ 5 施設、4 施設、1 施設であった。

制限酵素処理では、ユニット数は 30U が 7 施設、50U が 2 施設、60U が 1 施設で、処理時間は 2~19 時間で、4 施設で 4 時間以内、6 施設で 10 時間以上であった。

クラスター解析ソフトを所有する施設は 9 施設で、内 Fingerprinting II が 8 施設、Bio Numerics が 1 施設であった。

2. PFGE の結果

各施設の泳動結果の写真は、クラスター解析上

支障がなかったものの、2施設でバンドの照度が低くやや判定しづらいものであった。制限酵素の量と消化時間によるバンド出現の違いは認められなかったものの、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た。また、1施設において1サンプルがスメア状態となりバンドの確認が行えなかった。使用したマーカーは、LマーカーとSBマーカーの双方を使用した施設が6施設で、Lマーカーのみが1施設、SBマーカーのみが3施設であった。双方を使用した施設の内1施設でSBマーカーのバンドが得られなかった。

3. クラスタ解析ソフトによる解析

クラスタ解析ソフトの設定は、類似係数がDiceの施設が8施設で、Jaccardが1施設であった。トランス設定は、0.3%~1.5%であった。解析結果では、9施設において、菌株A、菌株B、菌株Cのそれぞれの2サンプルが100%の相同性を示したが、1施設で、菌株Bの2サンプルが100%の相同性を示さず、94.5%であった。クラスタ分類では、全ての施設でクラスタ範囲90~100%において、菌株A、Bと菌株Cを別々のクラスタに分類した。また、その内、4施設では菌株Aと菌株Bについても異なったクラスタに分類した。菌株Aと菌株Bを別のクラスタに分類した施設のトランス設定は、それぞれ施設Eが0.38%、施設Fが0.30%、施設Bが1.0%、施設Aが1.0%で相同性はそれぞれ、71%、54%、84%、87%であった。また、SBマーカーを使用した8施設の泳動写真を使用してクラスタ解析を行った結果、各菌株とも1施設を除きクラスタ範囲90~100%で同一のクラスタに分類された。

D. 考察

プラグ送付方法は、輸送コストをできるだけ安価に抑えることを目的として普通郵便により送付した。輸送に係る日数も最長で3日間であり、肉眼的なプラグの損傷やバッファの液漏れは認められず、PFGEの結果への影響も認められなかったことから、精度管理検体の送付方法としては有用であると思われたが、今回のプラグ送付日

が、冬場の比較的穏やかな気温であったことから、厳冬期や夏場の高温期での輸送がプラグへあたえる影響については、今後更に検討する必要があると考える。

プラグの菌量を均一化するため、多めの液体培地で培養を行い、これを1.5mLマイクロチューブに分注してプラグを作成した。また培養後、ホルマリンによる固定処理を行い、分注後のDNAの自己消化等が起こらないよう注意を払った。各施設から送られた泳動写真を確認したところ各プラグ間での菌量のバラツキは、PFGEに支障をきたすほどのものではなく良好であった。しかし、1施設において菌株Aの1サンプルがスメア状態となり泳動されず、また、高分子領域に薄いバンドが多数認められることから、制限酵素処理において何らかのトラブル(制限酵素の不良等)があったものと思われるが、その原因について今後検討する必要がある。

今回、マーカーとして、LマーカーとSBマーカーを使用した施設が、双方のマーカーを使用して泳動した施設の内1施設でSBマーカーのバンドが得られない施設があった。これは、今回の調査において前もって*S.Braenderup*H9812株をマーカーとして使用する旨を連絡していなかったことと、結果の提出期限が短かったため準備ができず、古くなったSBマーカーを使用したためであった。また、SBマーカーを使用した8施設分について解析を行ったところ1施設を除いた各菌株の施設間の相同性は、菌株Aでは93.6%、菌株Bでは90.1%、菌株Cでは93.6%であったものの、1施設については、写真上でのバンドの状態は他の施設と大変よく類似しているが分析ソフト上では、各バンドの間隔が他の施設に比べ広い状態となり、菌株A、菌株B、菌株Cのそれぞれで他の施設との相同性が40%未満となった。原因としては、SBマーカーのバンドが歪んでいること、また、かまぼこ上になっており、173.4kbと167.1kbのバンドの分離が悪いことなどから、SBマーカーにあると思われた。*S.Braenderup*H9812株は各施設で保存し、プラグを作成して使用しているが、菌の

濃度等の要因によりバンドの照度や太さのパラツキや、プラグの保存方法や保存期間によってバンドが得られないこともあることから、SB マーカーのメーカーによる販売が望まれるところである。

今回使用した菌株は、IS-Printing System において、それぞれ、異なるパターンを示した菌株であり、PFGE のクラスター分類においても別のクラスターに分類されたものであった。解析ソフトを持たない1施設について北海道衛研で解析を行ったが、クラスター分類において、各施設とも菌株 A、B と菌株 C については、別のクラスターに分類することが可能であったが、バンドパターンが近似している菌株 A と菌株 B を別のクラスターに分類できた施設は4施設のみであった。同一のクラスターに分類した施設から送付された写真を使用して解析ソフトによる解析を行ったが、菌株 A、菌株 B は別のクラスターに分類されなかったことから、解析者の違いよりも、泳動写真上での各バンドの太さと制限酵素による未処理と思われるバンドの存在が原因の一つとして考えられた。バンドの太さと未処理バンドの出現原因としては、初期菌量の多さ等が考えられ、均一で大量なプラグを作成する方法等について更に検討する必要があると思われた。

今回は精度管理方法の1手法としてプラグを各施設へ送付し、制限酵素処理、電気泳動、泳動結

果の解析を行った。その結果、菌株の送付よりも簡易的に輸送が可能であり、また、制限酵素処理以降の処理での問題点の洗い出しが行えたことは、PFGE の定期的な精度管理手法として有用であると思われた。

E. 結論

プラグの輸送方法として普通郵便を利用したが、プラグの破損や PFGE の泳動結果への影響は認められず、輸送コストの軽減につながった。しかし、厳冬期や夏場の高温期における影響については不明であり、さらに検討する必要があると思われた。

プラグの送付による精度管理を試みた結果、各施設での制限酵素処理以降の施設間格差について確認することが可能であった。

同一菌量のプラグを使用することで、制限酵素処理以降での問題点（制限酵素の不良等）を明らかにすることができ、各処理工程別の精度管理方法として有用であった。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

なし

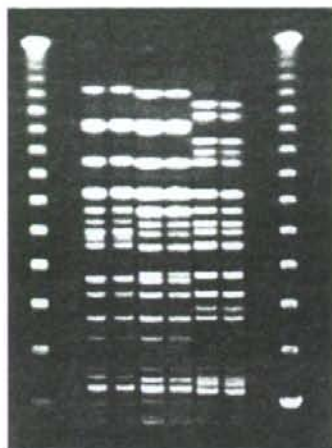


図1 施設Aの泳動写真

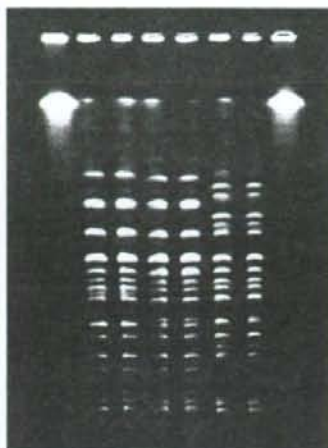


図2 施設Bの泳動写真

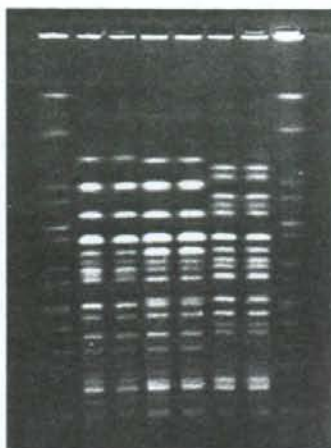


図3 施設Cの泳動写真

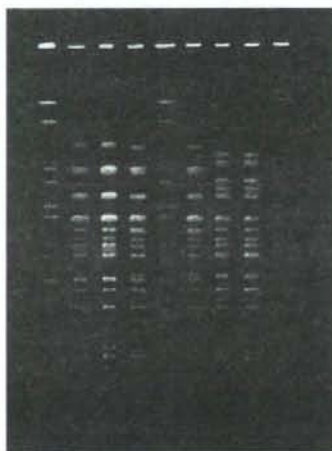


図4 施設Dの泳動写真

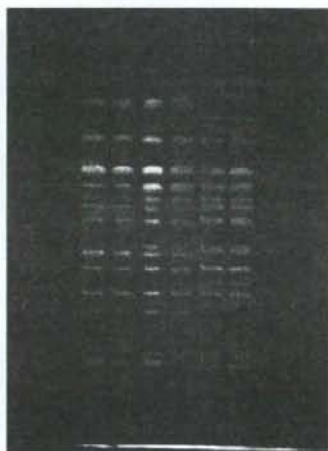


図5 施設Eの泳動写真

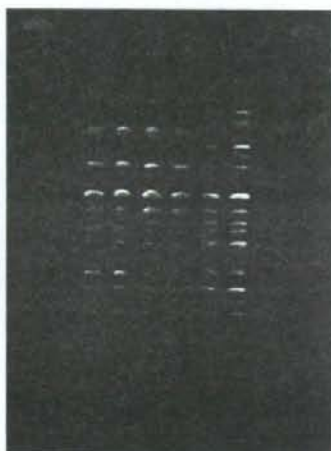


図6 施設Fの泳動写真

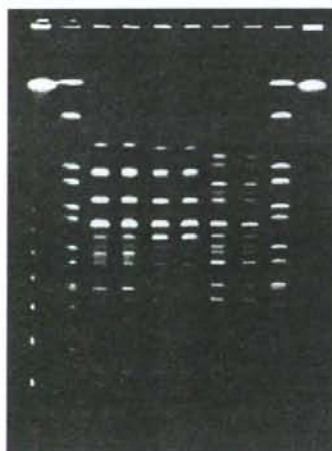


図7 施設Gの泳動写真

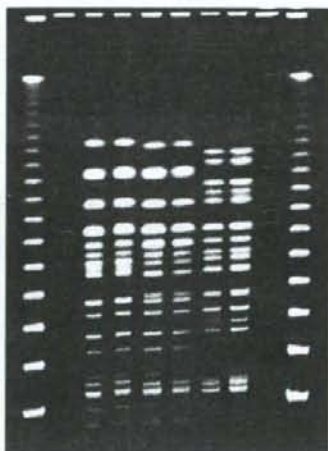


図8 施設Hの泳動写真



図9 施設Iの泳動写真