

200829015B<sup>A</sup>

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O157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
	大畠 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0157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0157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0157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0157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0157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
	烏谷 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O111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ポ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ーイムノクロマト法ーの開発…………… 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、解析情報の共有化を目的としたネットワークの構築とその機能的な稼働を試みた。細菌性食中毒に関しては、パルスネットの効率的運用のために 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 O157 の解析から、迅速で簡便であることから集団発生事例の探知などに適用可能と考えられる 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。

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) およびサポウイルス (SaV) について、ウイルス様粒子 (VLPs) とそのポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体を作成しそれぞれのウイルスの詳細な遺伝子型について明らかにした。さらに両ウイルスの検出法について検討した。NoV については、ノロウイルス抗原測定イムノクロマトキットを開発し、平成 19 年 10 月に厚生労働省より「ノロウイルス抗原検出体外診断薬」として認可された。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を整備し、フロントページおよび CaliciWeb 骨格デザインを構築した。

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。水試料からのクリプトスポリジウムの検査における検査結果に影響を与える要因の検討および遺伝子レベルの検査法としてのリアルタイム PCR 法の基礎的検討を行った。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。

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)、小林慎一(愛知県衛生研究所)、北元憲利(兵庫県立大学)、三好龍也、内野清子、吉田永祥(堺市衛生研究所)、岡 智一郎(国立感染症研究所)、グラント・ハンスマン(国立感染症研究所)

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: 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(宮城県保健環境センター)、

村上光一(福岡県保健環境研究所)、板垣 匡(岩手大学農学部)、泉山 信司(国立感染症研究所)

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。

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) 作成した抗体を用いて、食品中の NoV、SaV 検出法の確立に向けて、磁気ビーズを用いた濃縮精製法を検討する。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 の遺伝子型判定基準の策定を行うために、Capsid N/S 領域の遺伝子型分類の標準化を行い、ゲノム組換えを考慮に入れたカリシウイルスの遺伝子型分類法の検討を行った。d) 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の整備を行う。

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して、わが国特異的な状況を明らかにする。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る。爬虫類及びげっ歯類のクリプトスポリジウムおよびジアルジア感染状況を明らかにする。水試料のクリプトスポリジウム検査に関して、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。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において、表流水および底泥に含まれるクリプトスポリジウムオーシスト、ジアルジアシストの季節及び日変動濃度とその遺伝子

型を明らかにする。

試料中の濃度レベルを定量的に評価するため、回収率を算出して精製工程における損失を補正する定量方法を開発した。この定量法を用いて都下の下水処理場および神奈川県と愛知県の高産排水処理施設で流入水および処理水におけるオーシストおよびシストの濃度レベルを明らかにする。

#### (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

2006 年～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。特に EHEC 0157 においては、毎年 3ヶ所以上の異なる都道府県で分離されたパターンが数十種類分離される状況が続いており、5ヶ所以上の広域にわたって分離されるパターンについても数種類あることが明らかになった。広域分離株については、MLVA により、遺伝子型が変異している株と同一の株が存在していることから、感染源が異なっている場合と共通の感染源が存在して

いる場合があることが考えられた。EHEC 0157 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。

## 2. 北海道・東北・新潟ブロック

PFGE の精度管理として、プラグ作成段階、制限酵素処理と電気泳動段階、及び結果解析段階の3つに大別し、それぞれの精度管理を行うことで全体の制度を向上させることを試みた。平成18年度には、同一のPFGE泳動写真をもちいて結果解析の精度管理について検討した。その結果、同一菌株が100%の相同性を得られたのは3地研のみであった。また、平成20年度には、プラグを送付して制限酵素処理と電気泳動段階について検討した。その結果、9地研で同一菌株が100%の相同性を得ることができた。更に、平成18年度と平成19年度には、腸管出血性大腸菌 0157 の解析のために考案されたIS-Printing system とPFGE について比較検討を行い、PFGE による分子疫学的分析の補完が可能であるか検討を行った。異なる事例で、PFGE において異なるクラスターに分類されたものが、IS-Printing System では同一のパターンを示す場合と異なるパターンを示す場合が認められたが、同一事例内では、PFGE と IS-Printing System はよく一致した。

## 3. 関東・甲・信・静岡ブロック

3年間に渡り、毎年腸管出血性大腸菌 0157 の共通菌株5~6株を用いて、ブロック内11施設でPFGE解析を行った。3年間に渡り、毎

年腸管出血性大腸菌 0157 の共通菌株5~6株を用いて、11施設でPFGE解析後、その成績を東京都健康安全研究センターで比較検討することで、各地研におけるPFGE解析の技術力を均一化することを目的とした。毎年、菌株によっては類似度に多少のバラツキが認められたが、いずれも概ね90%以上の高い類似度であった。また各地研では、いずれも実際に発生した集団および散发事例についてPFGE解析を実施し、それが行政に活用された事例を多く経験した。PFGE法以外の分子疫学解析法としてIS-printing System法の有用性について検討した結果、本法はPFGE法と比較して非常に短時間で結果が判定できることや、試薬の調整等も容易なことから、PFGE法に代わる手法として期待できることが判明した。

## 4. 東海・北陸ブロック

精度管理として、平成19年度は東海・北陸地方9施設において2検体の腸管出血性大腸菌0157を用い、平成20年度は腸管出血性大腸菌3検体を用いサルモネラマーカ一使用を統一してPFGE解析を行った。何れの年度も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、何れの検体においても90%以上(90.4%から99.1%)と高率であり良好な結果が得られた。したがって、これまでの研究班活動で実施した精度管理は十分にその成果が表れているものの思われ、毎年PFGE担当者が1名~2名程度変わる東海・北陸ブロック内地研でもPFGE泳動図の画質の維持が可能であると思われた。平成18、20年度東海・北陸9地研の

行政への還元に関する調査ではそれぞれ5地研でPFGEの結果が集団事例発生時に行政に還元されていた。行政に還元された集団事例由来病原菌は0157をはじめ026、セラチア菌、サルモネラ、赤痢菌及びカンピロバクターであった。平成20年度には社会的にも大きな問題となったセラチア菌院内感染事例が発生したが、行政へ迅速に良質な泳動図を提供できたことは当班活動の精度管理が多少なりとも貢献したものである。3年間のIS printing systemとPFGEとの比較検討の結果、その解析力はPFGEと同程度であるが、その簡便性及び迅速性はPFGEより優れていることが明らかとなった。

#### 5. 近畿ブロック

EHECの遺伝子解析法として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の信頼性を確保するため、11衛生研究所で同一の菌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。3年間で技術的な施設間差はある程度解消され、施設によって画像のコントラストは多少異なるものの、正確なバンド認識の可能な画像が得られ、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、新しく開発されたIS-printing Systemは、型別能力ではPFGE法におよばないが、迅速性に優れ簡便なEHEC 0157型別法としてスクリーニングに有用であると考えられた。しかし、共通の型別法として利用するためには、正確にバンド増幅を判定できる電気泳動像が必要であった。主要な食中毒原因菌である *Campylobacter jejuni* のPFGE法について毎年プロトコルを改良して検討したところ、*SmaI* と *KpnI* を

用いたPFGEパターンは多様であり、集団発生由来株では同一のパターンを示したことから、*C. jejuni* の遺伝子型別法として実用可能であると推察された。しかし、施設間差の解消や標準化のためには、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、菌量やパルスタイムを検討する必要があると考えられた。

#### 6. 中国四国ブロック

平成18年度から20年度に中四国地域で分離された腸管出血性大腸菌0157株を用いてパルスフィールド電気泳動法とIS printing systemを比較し、菌の遺伝子による疫学解析ツールとして両法の評価を行った。各県で分離された菌株間および中四国地域で分離された菌株相互の遺伝子解析を実施した結果、総合的な解析能力はパルスフィールド電気泳動法がIS printing systemより高かった。IS-printing systemは迅速性・簡便性などの点から感染事例発生初期にスクリーニング的な使用が効果的で、両法は目的に応じた選択使用が有効であると思われた。平成18年度と20年度に中四国地域で実施したパルスフィールドゲル電気泳動法による精度管理は、全体的には良好な結果が得られた。

#### 7. 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に向けた基礎的研究について、九州地区12地方衛生研究所の参加により平成18年、19年、20年の3カ年間実施した。本研究では、  
1) IS-printing Systemに関する基礎的研究、  
2) PFGEが実施可能な状態にある菌種を増やすために方法論等について検討すること



3) 食中毒および感染性胃腸炎事例について検討すること及び4) 新規遺伝子解析法の導入検討について実施した。

各課題、3年間で得られた成果は次のとおりである。1) IS-printing Systemの基礎的実験及びPFGEとの比較検討実験を行い、IS-printing Systemは新規遺伝子解析法として有用であり、行政現場に迅速に科学根拠として細菌学的疫学データを還元し得る解析法であることが判明した。

2) *Campylobacter jejuni*および*Legionella*属菌についてのPFGE方法等について検討し、マニュアルを作成し緊急時に対応可能な状態にした。3) 各機関で原因究明がなされた食中毒および感染症9事例について詳細な情報を提供した。4) IS-printing System、*Legionella pneumophila*のSBT及び下痢原性大腸菌の遺伝子解析法について研修会を行い、行政検査に新規遺伝子検査法導入および整備に貢献した。

#### ウイルスグループ；

1) VLPの作製：遺伝子の系統樹解析から発現候補株を選出し、これまでにGI NoVで9株の、GII NoVでは24株の組換えVLPを作製した。抗体ELISAで高力価ポリクローナル抗体と精製VLPの交差反応をしらべたところGIの9株は9の抗原型に、GIIの24株は14の抗原型に分類された。同様に、6株のSaV VLPと抗体を作製した。

2) 抗体磁気ビーズの評価：GI NoV VLPで作製した高力価抗体を用いて磁気ビーズを作製した。ノロウイルスが含まれることがわかっている患者便材料と磁気ビーズを混合し、結

合したウイルスの遺伝子をしらべたところ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が明らかになった。磁気ビーズ特異性が確認できた。また、磁気ビーズの濃縮効果も確認し、カキ1個体からもNoVを検出することもできた。さらに、原因食品からのNoV検出にも有効であった。組換えバキュロウイルスで発現したノロウイルス中空粒子(VLPs)に対するモノクローナル抗体を作製し、これらを用いたノロウイルス抗原測定イムノクロマトキットを開発した。当初は非特異反応を抑えることが課題であったが、改良の結果、ラテックス標識抗体を用いたキットではRT-PCR法との一致率は、89.2%、感度81.0%、特異性100%に向上した。平成19年10月に厚生労働省より「ノロウイルス抗原検出体外診断試薬」として認可された。検出感度、特異性を高めるために、より特異的に、より広範囲に認識するモノクローナル抗体の作製に向けて、NoV capsid蛋白の一部であるPドメイン蛋白の大腸菌を用いた発現を試みた。このP蛋白に対するモノクローナル抗体の作製は現在進行中であるが、それを用いたNoV検出キットの開発が一層NoV診断には有用であると考えられる。

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基準配列は、感染情報センターのIASR (<http://idsc.nih.go.jp/pathogen/refer/noro-kaisetu.html>) 上に公開すると共に、CaliciWeb

(<http://teine.cc.sapmed.ac.jp/~calici/modules/news/>) 上にも公開した。

この基準配列ファイルを用いてNoVの遺伝子型

分類を行う方法をスライドにまとめ、同様に CalilciWeb 上に公開した。

NoV の遺伝子型分類法のガイドラインを示した。Capsid N/S 領域の塩基配列を用いた遺伝子型分類は、VPI 全長アミノ酸配列を用いた分類と矛盾を生じなかった。

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に認められる genome recombination は、Norovirus、Sapovirus のみならず、カリシウイルス全体に認められる現象である可能性が高い。

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関係する場合は、これらに関与する蛋白質コード領域を対象とした genotyping 方法を構築し、標準化する必要がある。

#### 原虫グループ；

クリプトスポリジウム症ならびにジアルジア症発生の迅速把握を目的として、迅速検査キットを使用して原因不明下痢症検体の原虫症検査における各キットの評価を行った。国内 3 県において感染症発生動向調査の感染性胃腸炎において原因不明とされた下痢症検体の原虫症検査を実施し、数%であるが原虫感染が含まれることが判明したことから、これら原虫の感染実態は統計を上回ることを示唆された。平成 18 年度に 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。

平成 19 年度と 20 年度においては、水試料からの *Cryptosporidium* の検査における検査結果に影響を与える要因の検討および遺伝子レベルの検査法としてのリアルタイム PCR 法の基礎的検討を行った。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において、表流水および底泥に含まれるクリプトスポリジウムオーシスト、ジアルジアシストの季節及び日変動濃度とその遺伝子型を明らかにした。2006 年 10 月から 2008 年 12 月の間、下水および下水処理水中の *Cryptosporidium* オーシストおよび *Giardia* シスト濃度を定量した。また、神奈川県内と愛知県内の計 4 箇所の畜産排水処理施設で排水と排水処理水を採取し、オーシストおよびシスト濃度を定量した。

#### D. 考察

広域で発生する食品由来感染症の迅速な探知と拡大阻止に向けて、病原体を正確に分離・同定しその解析情報を共有できるようなシステムの構築が本研究班の目的である。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んでおり、ウイルス性食中毒に関しては、主要な原因ウイルスであるノロウイルス、サポウイルスの遺伝子解析情報等の共有化を目指したカリシネットが構築されつつある。いずれのネットワークにおいても、病原体解析情報をデータベ

ス化しながら疫学情報等を加えた情報提供ネットワークとしての機能が拡充されてゆく予定である。一方、データベースの構築においては病原体解析手法の標準化や解析結果の正確さが重要であることから、当該ネットワーク構成機関での病原体解析に関して精度管理が継続的に実施されている。特に、パルスネットにおいては、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。各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、行政的にも効果的な貢献を果たしているものと考えられる。

病原体の解析方法に関しては、ノロウイルス及びサポウイルスの VLPs を発現させポリクローナル及びモノクローナル抗体を作成することにより、それぞれのウイルスにおける遺伝子型を明らかにする研究が進行している。その結果、ノロウイルスの検出に関して開発したイムノクロマト法が平成 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。細菌の解析方法に関しては、パルスネットにおいて現在汎用されている PFGE 以外の解析方法として、

EHEC 0157 における IS-printing system と MLVA の菌株識別能を検討した結果、前者の迅速性、簡便性から地域内の集団発生事例解析等に十分応用可能であること、後者では PFGE 以上の解析能があることが明らかになった。MLVA に関しては、Auto-sequencer を使用している難点があるものの、結果の汎用性があることなども含めて、今後の解析方法として継続的に検討する価値があるものと考えられた。

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、より簡便迅速な方法として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。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、表流水および底泥に含まれるクリプトスポリジウムオーシスト、ジアルジアシストの季節及び日変動濃度は、冬期に高い濃度を示し、その遺伝子型は、いずれもヒトへの感染報告があるものかあるいは感染性があるものが大部分であった。

## 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 を補完し得ることから、将来的に有望な解析方法としての可能性が示された。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ノクロマト法が平成 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、畜舎排せつ物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ノクロマト法の有用性と水試料における原虫遺伝子検査法の可能性を示した。

#### F. 健康危険情報

特記事項なし

#### G. 研究発表

巻末を参照のこと

#### 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