

200931036A

食品由来感染症調査における
分子疫学手法に関する研究
(課題番号：H21-新興-一般-003)

平成 21 年度 総括・分担研究報告書

(厚生労働科学研究費補助金
新型インフルエンザ等新興・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 22(2010)年 4 月

目次

1. 平成 21 年度総括研究報告書

食品由来感染症調査における分子疫学手法に関する研究	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 21 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

食品由来感染症における分子疫学手法に関する研究	15
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
	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の 精度管理方法の検討	25
---	----

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
池田 徹也	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
岩渕 香織	岩手県環境保健研究センター
仲村 容子	宮城県保健環境センター
高橋 恵美	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
細谷美佳子	新潟県保健環境科学研究所
廣地 敦	札幌市衛生研究所
勝見 正道	仙台市衛生研究所

a) 2008年に北海道で発生したCampylobacter食中毒事例	30
-------------------------------------	----

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
池田 徹也	北海道立衛生研究所

(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菌株の解析方法の検討…………… 34

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	永田 紀子	茨城県衛生研究所
	内藤 秀樹	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
	大沼 正行	山梨県衛生公害研究所
	笠原ひとみ	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) 腸管出血性大腸菌血清型0157のクローンの新興…………… 46

研究協力者	横山 栄二	千葉県衛生研究所
	依田 清江	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、PFGE解析結果の行政への還元と

IS printing systemの活用…………… 51

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
	北川恵美子	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) 食品由来感染症調査における分子疫学手法に関する研究…………… 61

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	安田 奈央	滋賀県衛生科学センター
	吉田 時子	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
	浅井 紀夫	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
	齋藤 悦子	兵庫県立健康生活科学研究所
	岩本 朋忠	神戸市環境保健研究所
	川西 伸也	姫路市環境衛生研究所
	柴井 毅	奈良県保健環境研究センター
	田辺 純子	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
	原田 哲也	大阪府立公衆衛生研究所
	河原 隆二	大阪府立公衆衛生研究所

b) 腸管出血性大腸菌群 0157 感染症事例での PFGE と

IS-printing System を併用した解析・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 80

研究協力者	中嶋 智子	京都府保健環境研究所
	星野 桃子	京都府中丹西保健所
	河野 通大	京都府保健環境研究所
	柳瀬 杉夫	京都府保健環境研究所

c) 奈良県における腸管出血性大腸菌0157による散発的集団食中毒事例について・・・・・・・・ 84

研究協力者	大前 壽子	奈良県保健環境研究センター
	柴井 毅	奈良県保健環境研究センター
	田辺 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
	北堀 吉映	奈良県保健環境研究センター

(VI) 中国・四国ブロック

a) 食品由来感染症における分子疫学手法に関する研究・・・・・・・・・・・・・・・・ 87

研究分担者	中嶋 洋	岡山県環境保健センター
研究協力者	黒崎 守人	島根県保健環境科学研究所
	大畠 律子	岡山県環境保健センター
	石井 学	岡山県環境保健センター
	竹田 義弘	広島県立総合技術研究所保健環境センター
	末永 朱美	広島市衛生研究所

富永 潔	山口県環境保健センター
下野 生世	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
浅野由紀子	愛媛県立衛生環境研究所
藤戸 亜紀	高知県衛生研究所

b) マイクロチップ電気泳動法を用いた腸管出血性大腸菌0157のMLVA解析……………	94
研究協力者	大島 律子 岡山県環境保健センター
	石井 学 岡山県環境保健センター
c) マイクロチップ電気泳動法を用いた腸管出血性大腸菌0157の IS-printing Systemの検討……………	97
研究協力者	石井 学 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
d) IS printing法を用いた腸管出血性大腸菌0157の分子疫学解析の 有用性の検討……………	100
研究協力者	黒崎 守人 島根県保健環境科学研究所
e) PFGE法およびプラスミドプロファイルによる菌株間の識別についての検討……………	102
研究協力者	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
	桑山 勝 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:H7の分子疫学的解析法の比較検討……………	107
研究協力者	未永 朱美 広島市衛生研究所
	田中 寛子 広島市衛生研究所
	宮野 高光 広島市衛生研究所
	国井 悦子 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……………	113
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
矢端 順子	山口県環境保健センター

h) 腸管出血性大腸菌0157の感染拡大防止における

IS-printing Systemの活用について…………… 125

研究協力者	下野 生世	徳島県保健環境センター
	宇佐美 實	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

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…………… 127

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
	宮本 孝子	香川県環境保健研究センター
	有塚 真弓	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感染症の分子疫学調査…………… 131

研究協力者	浅野由紀子	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…………… 137

研究協力者	藤戸 亜紀	高知県衛生研究所
	松本 一繁	高知県衛生研究所
	松本 道明	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

—IS-printing System の分子疫学的解析法としての有用性について— …… 140

研究分担者	堀川 和美	福岡県保健環境研究所
研究協力者	財津 修一	福岡市保健環境研究所
	久保田 勉	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
	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
大岡 唯祐	宮崎大学・医学部・フロンティア
林 哲也	宮崎大学・医学部・フロンティア
江藤 良樹	福岡県保健環境研究所
市原 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) 「食品由来感染症調査における分子疫学手法に関する研究」に
 関する九州地区研修 新規遺伝子解析法について…………… 151

c) 平成21年5月に発生した中間出血性大腸菌感染O157:H7 (VT1&2陽性)を
 原因とする食中毒事件について…………… 152

研究協力者	久保田 勉	北九州市環境科学研究所
	清水 寧	北九州市環境科学研究所
	村瀬浩太郎	北九州市環境科学研究所
	下原 悦子	北九州市環境科学研究所
	境 美津枝	北九州市保健所保健予防課
	永富あかね	北九州市保健所保健予防課
	小川真由美	北九州市保健所保健予防課
	佐藤 優	北九州市保健所保健予防課
	刀根 誠一	北九州市保健所東部生活衛生課
	北村 尚男	北九州市保健所東部生活衛生課
	太田 宏一	北九州市保健所東部生活衛生課
	稲富 秀敏	北九州市保健所東部生活衛生課

d) A焼肉店が原因施設と推定された腸管出血性大腸菌 O157 集団発生事例…………… 157

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

e) 2009年に福岡県で発生した腸管出血性大腸菌O157:H7食中毒事例における
 IS-printing Systemの活用例…………… 160

研究協力者	濱崎 光宏	福岡県保健環境研究所
	江藤 良樹	福岡県保健環境研究所
	市原 祥子	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
堀川 和美	福岡県保健環境研究所
石田 一義	福岡県保健医療介護部保健衛生課
梅崎 由佳	福岡県嘉穂・鞍手保健福祉環境事務所
甲斐田美菜	福岡県嘉穂・鞍手保健福祉環境事務所

f) 保育園で発生した腸管出血性大腸菌O157集団感染事例…………… 165

研究協力者	尾崎 延芳	福岡市保健環境研究所
	財津 修一	福岡市保健環境研究所
	樋脇 弘	福岡市保健環境研究所

g) 2つの保育園で発生した腸管出血性大腸菌O26による集団感染事例…………… 167

研究協力者	西 桂子	佐賀県衛生薬業センター
	諸石 早苗	佐賀県衛生薬業センター
	福富由美子	佐賀県衛生薬業センター
	増本 久人	佐賀県衛生薬業センター
	角 典子	唐津保健福祉事務所
	野田日登美	唐津保健福祉事務所
	川内 保典	唐津保健福祉事務所

グループ2：ウイルス

(I) ノロウイルスゲノムの分子進化…………… 171

研究分担者	片山 和彦	国立感染症研究所 ウイルス第二部
-------	-------	------------------

(II) ノロウイルスの病原性に関する研究…………… 178

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

(III) サポウイルスの分子疫学的解析手法の確立…………… 181

研究分担者	岡 智一郎	国立感染症研究所 ウイルス第二部
-------	-------	------------------

(IV) サポウイルス感染症におけるImmunochromatography(IC)法の開発…………… 187

研究分担者	田中 智之	堺市衛生研究所
研究協力者	北元 憲利	兵庫県立大学環境人間学部
	飯塚 節子	島根県保健環境科学研究所
	山下 育孝	愛媛県立衛生環境研究所
	森野 吉晴	和歌山市衛生研究所
	岡 智一郎	国立感染症研究所 ウイルス第二部
	白土 東子	国立感染症研究所 ウイルス第二部
	高橋 幸三	堺市衛生研究所

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
松尾 光子	堺市衛生研究所

(V) カリシウェブの整備と活用..... 194

研究分担者	三瀬 敬治	札幌医科大学・医学部・衛生学講座
	片山 和彦	国立感染症研究所 ウイルス第二部

3. 研究成果の刊行に関する一覧表（平成 21 年度）..... 198

厚生労働科学研究費補助金（インフルエンザ等新興再興感染症研究事業）

平成 21 年度総括研究報告書

食品由来感染症調査における分子疫学手法に関する研究

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：

食品由来感染症の原因病原体となるウイルスや細菌の遺伝学的解析方法を利用して当該病原体解析情報を収集し、疫学情報と組み合わせてデータベース化した総合情報をネットワーク上で共有することを目的として、まず解析手法の検討とオンラインシステムの構築に着手した。腸管出血性大腸菌(EHEC)0157の解析においては、IS-printing system(IS法)及びMultilocus variable-number tandem repeat analysis (MLVA)がそれぞれの特性を活用して事例解析に利用できることが明らかになった。2009年に発生した広域散発発生食中毒の探知では、従来のネットワークシステムが有効に機能したものの、迅速な探知という点で新しいオンラインシステムが有効に機能することが今後の課題となる。

ヒト腸管感染性ウイルスである、ノロウイルス (NoV) 及びサポウイルス (SaV) に対して、流行ウイルス株のゲノム塩基配列情報の提供及び地方衛生研究所と国立感染症研究所を結ぶ情報交換の場を提供することを目的として、カリシウェブの構築を進めた。カリシウェブの操作性の改善を進めるとともに、カリシウェブ内のプライベートフォーラムを使用し、系統樹作成サービス「楽しカリシ」による、継時的な NoV, SaV の流行 genotype の推移調査を開始した。また、NoV の近年流行株の解析から、高頻度のゲノム組換えが生じている可能性や 3C 様プロテアーゼの病原性における役割を明らかにした。さらに、SaV の河川水における分布の解明と検出系を構築するとともに、SaV 感染症におけるイムノクロマト迅速診断法の開発を試みた。

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等

関係者 (各分担研究報告書を参照)

グループ 2：

片山和彦 (国立感染症研究所)

田中智之 (堺市衛生研究所)

染谷雄一 (国立感染症研究所)

岡 智一郎 (国立感染症研究所)

三瀬敬治 (札幌医科大学)

協力研究者：北島正章、片山浩之（東京大学大学院）、原本英司（山梨大学大学院）、北元憲利（兵庫県立大学）、飯塚節子（島根県保健環境科学研究所）、山下育孝（愛媛県立衛生環境研究所）、森野吉晴（和歌山市衛生研究所）、白土東子（国立感染症研究所）、高橋 幸三、三好 龍也、内野 清子、吉田 永祥、松尾光子（堺市衛生研究所）

A. 研究目的

食品由来感染症の原因病原体となるウイルスや細菌の遺伝学的解析方法について検討し、原因解明のために解析結果を共有して当該感染症の予防や制御に資する情報ネットワークを構築することを目的とする。原因病原体の解析データと疫学情報を含むデータベースをオンラインで利用することにより、食品由来感染症の発生に即応できる情報を提供できる体制を構築する。

B. 研究方法

対象となる病原体別に本研究班を 1) 細菌、2) ウイルスの二グループに分け、それぞれの班を中心に病原体検査法の開発、評価及びネットワークの構築を行う。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 解析の精度管理を継続した。b) 画像等の解析ソフトウェアである BioNumerics (BN) 及び BN server を利用し、全国 6 ブロックの研究分担者が BN server 上のデータベースにアクセスして解析できる

オンラインシステムの構築を行った。c) 発生事例に応用した PFGE によるデータベース構築を継続した。d) EHEC 0157 に対する MLVA や IS 法等の利用による解析手法の検討を行った。

2) ウイルスグループ；a) NoV の流行のメカニズムを解析するために、近年流行した NoV 株の全塩基配列を決定し、ゲノム全長に渡る塩基配列を蓄積すると共に、得られた情報を分子遺伝学的に解析した。ORF1 にコードされるタンパク質の内、3C 様プロテアーゼに注目し、その活性発現機構の解析を行った。SaV については、河川水中の SaV の存在をリアルタイム RT-PCR および RT-PCR を用いて調査した。また、SaV の VLPs 抗原に対するモノクローナル抗体を利用して、イムノクロマト迅速診断法の開発を試みた。さらに、カリシウイルスの情報共有のためのウェブサイトのリニューアルとカリシウェブ内の系統樹作成サービス「楽しカリシ」を開始した。

（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いる。

C. 研究結果

細菌グループ；

1. 感染研における研究

腸管出血性大腸菌 (EHEC) 等の PFGE 解析による遺伝子型別に基づいて、分離株の動向を調べるとともに、分離株の解析情報と疫学情報を共有するためのネットワークである、

PulseNet Japan の機能強化を目的として BioNumerics(BN) server によるオンラインシステムの構築を行った。本システムでは、画像等の解析ソフトウェアである BN 及び BN server を利用し、全国 6 ブロックの研究分担者が BN server 上のデータベースにアクセスして解析できるようになる予定である。2009 年に分離された EHEC の PFGE 解析結果は、BN 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 0157 では、1606 株に対して 2009 年に分離された新しいサブタイプとして 716 種類、2008 年に分離されたことのあるサブタイプが 70 種類、その他が 43 種類見いだされた。また、EHEC 026 では、351 株に対して 163 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 33 種類存在したが、そのうち 6 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 7 種類存在していた。2009 年 9 月に発生した、チェーンレストランにおける共通パターンを示す EHEC 0157 による広域事例では、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た。一方、同時期に発生した、異なるチェーンレストランにおける EHEC 0157 による広域事例では、複数のパターンを示す株が分離された。

2. 北海道・東北・新潟ブロック

PFGE 法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で

あり、北海道・東北・新潟ブロックでは、プラグ作成部分の精度管理方法として、各地研が分子マーカーとして使用している *Salmonella* Braenderup H9812 株でプラグを作成し 1 地研に送付して、制限酵素処理、PFGE を行い、泳動像を解析する方法を試みた。その結果、送付によるプラグの破損等は認められず、ブロック内 10 地研のうち 8 地研がクラスター分析（類似係数：Dice、デンドログラムタイプ：UPGMA、トレランス設定：1.0%）で 99%以上の相同性を得ることができた。プラグのやり取りにより PFGE の精度管理を行う方法は、輸送コストの軽減と、生菌を送る場合のリスクをなくすだけでなく、プラグ作成段階と制限酵素処理以降の精度管理とをそれぞれ確認できる利点があることが明らかとなった。2008 年に北海道内で発生した *Campylobacter* 属菌による食中毒事例について PFGE による解析を行った。

3. 関東・甲・信・静岡ブロック

腸管出血性大腸菌 0157 の共通菌株 5 株によるブロック内 11ヶ所の地方衛生研究所において、PFGE 解析の精度管理を行った。泳動用ブロックの作製方法や泳動条件についてはほぼ標準化されたので、今後は染色方法や写真の取り込み方等の統一を図っていく予定である。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。PFGE との不一致点について、今後精査が必要である。2008 年 8~9 月に特定の遺伝子型の 0157 (VT2)による感染事例が千葉県内で多発し、当該 0157 (VT2)菌株について詳細に調査したところ、特定の clone の新興が示唆された。

4. 東海・北陸ブロック

東海・北陸地方9地方衛生研究所（以下施設と略す）において腸管出血性大腸菌3検体（0157:H7）を用い、サルモネラマーカ―使用を統一して精度管理を実施した。その結果、9施設全て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、3株何れにおいても施設間の相同性が89.5%以上（89.5%から100%）と高率であり、良好な結果が得られた。

平成21年度にPFGE解析結果を行政への還元した事例の調査を行ったところ、2施設でPFGEを実施しその結果を行政に還元していた。何れも良質な泳動図が得られていたことから行政への還元もスムーズに進んだものと思われた。対象となった事例の原因菌は0157（2事例）、026（2事例）をはじめ0111（2事例）、レジオネラ菌（1事例）が含まれていた。

東海・北陸6施設において54株の0157を用いてIS printing system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

近畿ブロックで分離されるEHEC、特に血清群0157の関連性を迅速に把握するため、遺伝子解析法であるPFGE法とIS法について、その信頼性を検証し、それぞれの特徴を利用した活用法を検討した。同一のEHEC 0157を用いたPFGE法の精度管理を10施設で実施した

ところ、いずれの施設でも明瞭な電気泳動画像が得られ、4人の解析者による画像解析ではそれぞれ菌株ごとに近似度の高いクラスターを作った。IS法は迅速性に優れ結果を数値化できることから、データベースの構築を目指した。データの信頼性を確保するため、非特異バンドの増幅がみられる株を用いて10施設で精度管理を行い、近接のバンドと明瞭に区別できる電気泳動画像の必要性が確認された。2010年2月12日までに9施設で実施した512株の型別成績が登録されており、レファレンス・データベースとして各施設で閲覧、検索し、疫学情報やPFGE画像の交換が必要な分離株をスクリーニングする手段として活用している。

6. 中国四国ブロック

中四国地域で分離された腸管出血性大腸菌0157株について、IS法による解析と同時に、PFGE型別やMLVA法を用いた疫学解析結果とも比較を行った。これらの結果から、IS法により疫学情報と一致した迅速な疫学解析を行うことが出来た。また、本年度はマイクロチップ電気泳動装置を使用したIS法の迅速化やMLVA法への応用を検討した結果、IS法での使用は今後さらに検討が必要であり、MLVA法においては現状では同一施設内での解析に限定すれば使用可能であることが示された。一方、腸管出血性大腸菌の感染源と考えられている牛の本菌保菌状況を調査した結果、516検体中92検体（17.8%）が陽性であったが、その多くは血清型別不能の株であり、人から多く分離されるO血清群157は、本年度の調査では検出されなかった。

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21 年度は 1) IS法に関する応用研究、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4課題について実施した。IS法については、各地研で分離されたO157 について解析を行い、その有用性を検討した。また、O157 のDNA を配布し、各地研でIS法による解析を実施することにより、IS 法における精度管理を行った。事例検討では、九州地区において発生した腸管出血性大腸菌O157による食中毒事例、保育園及び焼き肉店での集団感染事例、また腸管出血性大腸菌O26による集団感染事例でのPFGE或いはIS法の有用性が確認できた。

ウイルスグループ；

ヒト腸管感染性ウイルス（ノロウイルス（NoV）やサポウイルス（SaV））分野でもカリシウェブが、流行ウイルス株のゲノム塩基配列情報の提供と地方衛生研究所と国立感染症研究所を結ぶ情報交換の場として構築されつつある。NoV、SaV では、汚染食材からの感染に加え、ヒトからヒトへの感染が高頻度で起こること、有症者と同様に大量のウイルスを排泄する無症候性感染者の存在が明らかになった。つまり、不顕性感染者がウイルスリザーバーとして環境中に供給する大量のウイルスが食品を汚染し、NoV、SaV の大流行を起こす可能性がある。また、近縁のウイルスが家畜から発見されていること、本ウイルスが、ゲノムの組換えを高頻度に起こすことから、遺伝子組換えにより、高病原性ウ

イルスが出現する可能性もある。高病原性ウイルス出現を未然に防止し、ウイルスの感染拡大を適切制御するためには、ウイルスゲノム情報を網羅的に捉え、分子進化遺伝学的手法解析と疫学を連結させて解析するためのカリシウェブ構築と解析手法の開発は極めて重要である。

研究分担者、片山は、ノロウイルス（Norovirus; NoV）の流行のメカニズムを解析するため、近年流行した NoV 株の全塩基配列を決定し、ゲノム全長に渡る塩基配列を蓄積すると共に、得られた情報を分子遺伝学的に解析した。その結果、NoV におけるゲノムの組換えが高頻度で起きていることが示唆された。NoV のゲノム組換えは毎年繰り返される NoV の流行と関係する可能性があると思われる。

研究分担者、染谷は、ORF1 にコードされるタンパク質の内、3C 様プロテアーゼに注目し、その活性発現機構について研究した。プロテアーゼ Glu54 残基にアミノ酸置換を導入した結果、基質切断部位の P2 および P4 位に側鎖の大きな疎水性アミノ酸残基を要求することが明らかとなった。また、基質側のアミノ酸変異導入試験の結果、酵素と基質が互いに感知し、プロテアーゼの切断が起きていることが示唆された。プロテアーゼ領域、切断部位のアミノ酸配列の多様性は、ノロウイルスの増殖効率や病原性に影響を与える可能性がある。

研究分担者、岡は、サポウイルス（Sapovirus; SaV）は、近年、急性胃腸炎患者からの検出数が増加しており、公衆衛生上重要なウイルスである。本研究ではリアルタイ

ム RT-PCR および RT-PCR を用いて、河川水中における SaV の存在状況を一年間調査し、中流から下流にかけて SaV 核酸の検出頻度が高くなること、いずれの地点でも冬期にその濃度が上昇すること、河川水中にもヒト糞便中と同様、多様な SaV が検出されることを明らかにした。さらに本研究を通じ、環境水中の SaV 検出率向上に有用な新たな RT-PCR も構築した。

研究分担者、田中は、サポウイルス感染症におけるイムノクロマト迅速診断法の開発を試みた。サポウイルス VLPs 抗原から作製されたモノクローナル抗体にラテックス粒子を標識し、テストストリップ上で検出する方法で、測定時間は約 20 分ある。現時点では genogroup I の臨床検体では約 60%、その他の genogroup II, IV では二割未満であった。検出感度や特異性を高めるため、より優れたモノクローナル抗体の作製、あるいは genogroup 特異的モノクローナル抗体を混合したカクテル IC 法の構築が今後の課題として残された。

研究分担者、三瀬と片山は、カリシウイルスの情報共有のためのウェブサイト (SNS)、カリシウェブ (<http://teine.cc.sapmed.ac.jp/~calici/ddbj/>) のリニューアル作業、システムレビューから、デザインや使い勝手の改善作業を行った。2010 年 2 月 21 日現在登録データ数 11902 件、2008 年 8 月末から約 2000 アクセスを達成した。また、カリシウェブ内のクローズトなフォーラム (プライベートフォーラム) を使って、系統樹作成サービス「楽しカリシ」を開始し、継時的な NoV、SaV の

genotype の流行の推移調査を開始した。

D. 考察

食品由来感染症を迅速に探知しその拡大を阻止するためには、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。食中毒起因菌の解析が主体であるパルスネットにおいては、地研及び感染研を主体とした情報の共有化が進んでいる。本システムでは、各機関における PFGE 解析等の解析技術における精度管理が重要であり、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。地研等の機関において食中毒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。これらの地域において、解析結果が行政サイドへ還元され有効に利用されている例は枚挙に暇がないが、国内全域に及ぶような広域発生事例においては、その探知の迅速性が極めて重要である。本研究では、研究分担者が感染研のデータベースにオンラインでアクセスして解析を行えるシステムの構築を目指し、BioNumerics (BN) 及び BN server を利用したシステムを導入した。このシステムによるデータベースの構築にあたり、正確なデータの確保を図りつつ、研究分担者からのデータ入力がスムーズに行われるようなシステムの構築が今後の課題である。

NoV の遺伝子組換え体の頻度は GI が 33%、GII は 50%に達し、エンテロウイルスやフラビウイルス、トガウイルスなど、その他のプ

ラス一本鎖RNAウイルスよりも明らかに高い値であった。この組換え頻度は、インフルエンザ等のセグメントRNAウイルスに観察される遺伝子セグメントのリアソートメントに匹敵していた。我々が解析している株は、全てヒトの体内で増殖し、排泄された表現型であることから、多様な選択圧をくぐり抜けた結果であることを考えると、遺伝子の組み換えがNoVの増殖に有利に働いている可能性がある。

サポウイルスのVLPsを用いたモノクローナル抗体を用いたIC法に関する研究から、これまで作成されたサポウイルスモノクローナル抗体を用いて迅速検査のIC法の構築が可能であることが判明した。しかし、その検出率、感度の向上は今後、1. 最良のモノクローナル抗体作製を再度試みること、2. 広範囲反応性の抗体にこだわらず、カクテルIC法の構築を試みること、3. 検出感度向上の工夫を行うこと、等に向けて改良することであり平成22年度の課題である。

カリシウイルスの情報共有のためのウェブサイト(SNS)は、カリシウイルスに特化したデータベースとして構築・改善が進んだ。得られたウイルスの由来や今後の流行予測には、系統樹の作成が重要であることから、カリシウェブ内のプライベートフォーラムを用いて系統樹作成サービス「楽しカリシ」を開始した。今後、情報セキュリティを確保しつつ、利用者への情報共有の場として活用される工夫が必要である。

E. 結論

食品由来感染症の原因病原体に関する解

析情報を共有するシステムとして、細菌感染症起因菌に関してはBN serverを利用したオンラインシステム、NoVやSaVに関してはカリシウェブの構築と改善が開始された。病原体の解析手法として、分子遺伝学的手法に基づいた方法の検討を行いながら、正確な病原体解析情報を蓄積してデータベースを構築してゆくことが今後の課題と考えられる。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Ooka T, Terajima J, Kusumoto M, Iguchi A, Kurokawa K, Ogura Y, Asadulghani M, Nakayama K, Murase K, Ohnishi M, Iyoda S, Watanabe H, Hayashi T.

Development of a multiplex PCR-based rapid typing method for enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 strains.

Journal of Clinical Microbiology, 47:2888-94, 2009

2. Izumiya H, Tada Y, Ito K, Morita-Ishihara T, Ohnishi M, Terajima J, Watanabe H. Characterization of *Shigella sonnei* isolates from travel-associated cases in Japan.

Journal of Medical Microbiology, 58:1486-91, 2009

3. Kitajima M., Oka T., Haramoto E., Katayama H., Takeda N., Katayama K., Ohgaki S.

Detection and genetic analysis of human

- sapoviruses in river water in Japan
Applied and Environmental Microbiology.
In press
4. Iizuka S., Oka T., Tabara K., Omura T.,
Katayama K., Takeda N., Noda M.
Detection of sapoviruses and noroviruses
in an outbreak of gastroenteritis linked
genetically to shellfish
Journal of Medical Virology. *In Press*
5. Yamashita Y., Ootsuka Y., Kondo R.,
Oseto M., Doi M., Miyamoto T., Ueda T.,
Kondo H., Tanaka T., Wakita T., Katayama
K., Takeda N., Oka T.
Molecular characterization of sapovirus
detected in a gastroenteritis outbreak at
a wedding hall.
Journal of Medical Virology. *In Press*
6. Oka T., Yokoyama M., Katayama K.,
Tsunemitsu H., Yamamoto M., Miyashita K.,
Ogawa S., Motomura K., Mori H., Nakamura
H., Wakita T., Takeda N., Sato H.
Structural and biological constraints on
diversity of regions immediately upstream
of cleavage sites in calicivirus precursor
proteins.
Virology. 2009; 394(1):119-129.
7. Kitajima M., Oka T., Tohya Y., Katayama
H., Takeda N., Katayama K.
Development of a broadly reactive nested
reverse transcription-PCR assay to detect
murine noroviruses, and investigation of
the prevalence of murine noroviruses in
laboratory mice in Japan.
Microbiology and Immunology. 2009;
53(9):531-534.
8. Oka T., Miyashita K., Katayama K.,
Wakita T., Takeda N.
Distinct genotype and antigenicity among
genogroup II sapoviruses.
Microbiology and Immunology. 2009
53(7):417-420.
9. Shinkawa N., Noda M., Yoshizumi S.,
Tokutake Y., Shiraishi T., Arita-Nishida
T., Nishio O., Oka T., Hansman GS., Takeda
N., Kimura H.
Molecular epidemiology of noroviruses
detected in food handler-associated
outbreaks of gastroenteritis in Japan.
Intervirology. 2008; 51(6):422-426. Epub
2009 Mar 4.
10. 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.
Surveillance of pathogens in outpatients
with gastroenteritis and characterization
of sapovirus strains between 2002 and 2007
in Kumamoto Prefecture, Japan.
Journal of Medical Virology.
2009 ;81(6):1117-1127.
11. Ootsuka Y., Yamashita Y., Ichikawa T.,
Kondo R., Oseto M., Katayama K., Takeda N.,
Oka T.
Molecular characterization of sapoviruses
detected in sporadic gastroenteritis
cases in 2007 in Ehime Prefecture, Japan.
Japanese Journal of Infectious Diseases.

- 2009; 62(3):246-248.
12. Yoshida T., Kasuo S., Azegami Y., Uchiyama Y., Satsumabayashi K., Shiraishi T., Katayama K., Wakita T., Takeda N., Oka T.
Characterization of sapoviruses detected in gastroenteritis outbreaks and identification of asymptomatic adults with high viral load.
Journal of Clinical Virology. 2009; 45(1):67-71.
13. Iwakiri A., Ganmyo H., Yamamoto S., Otao K., Mikasa M., Kizoe S., Katayama K., Wakita T., Takeda N., Oka T.
Quantitative analysis of fecal sapovirus shedding: identification of nucleotide substitutions in the capsid protein during prolonged excretion.
Archives of Virology. 2009; 154(4):689-693.
14. Y. Someya, and N. Takeda. (2009) Insights into the Enzyme-Substrate Interaction in the Norovirus 3C-like Protease. J. Biochem. 146(4), 509-521.
15. 田中 智之. 改良ノロウイルス抗原検出EIAキットの評価.
医学と新薬 61(1):93-98, 2009
16. 田中智之、田尻 仁、奥田真珠美、後藤泰浩、豊田 茂、佐藤雅久、五十嵐隆夫、田村 務、西川 眞. ノロウイルス抗原迅速診断試薬クイックナビ™ - ノロの評価.
医学と新薬 61(5):779-785, 2009
17. 田中智之、三好龍也、内野清子. ノロウイルス迅速診断法. 診断と治療 97(9); 1728-1731, 2009
18. 田中智之. ロタウイルス、ノロウイルス、エンテロウイルス. 小児の市中感染症パーフェクトガイド, 分光堂 p147-p156, 2009年
19. 片山和彦
ノロウイルス対策
「高校保健ニュース」, 2009年11月18日号.
株式会社少年写真新聞社
20. 片山和彦
ノロウイルスについて
「健康教室」, 2010年1月号 通巻 894号
東山書房 p 74-79
21. 片山和彦
ノロウイルス、ロタウイルス
ザ特集 最新学校保健安全ハンドブック (書籍) p77-80
22. 片山和彦、岡智一郎、高木弘隆
「ノロウイルス研究の現状とマウスノロウイルス」 LABI021 No.39 p20~26, 2010
23. 岡 智一郎: ノロウイルス、サポウイルス感染症:「臨床検査」2009; 53(6): 665-672.
24. 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: 東京都内の3保育園で発生した腸管出血性大腸菌 O26 感染事例, 病原微生物検出情報 (国立感染症研究所), 30, 5, 9-10, 2009
25. 勢戸和子, 田口真澄, 原田哲也, 川津健太郎, 神吉政史, 依田知子, 井上清, 柴田敏之, 萩原粒子, 山本サエコ, 中田栄子, 長澤登美代, 伊吹てるみ, 濱石裕紀: 保育所におけるEHEC O157 集団感染事例、2008年一大阪府, 病原微生物検出情報, 30: 77-78, 2009
26. 勢戸和子: STEC, 食品由来感染症と食品微生物 (仲西寿男, 丸山務監修), 中央法規

出版, 東京, 2009

2) 学会発表

1. Jun Terajima, Sunao Iyoda, Tomoko Morita-Ishihara, Jiro Mitobe, Hidemasa Izumiya, Haruo Watanabe

Molecular Epidemiological investigation of enterohemorrhagic E. coli isolates in Japan 2006-2007

7th International Symposium on Shiga Toxin (Verocytotoxin)-Producing *Escherichia coli* Infections, Buenos Aires, 2009

2. Jun Terajima, Sunao Iyoda, Jiro Mitobe, Hidemasa Izumiya, Eiji Arakawa, Masatomo Morita, Tomoko Ishihara, Haruo Watanabe
Japanese PulseNet

6th Annual International Collaboration of Enteric Disease 'Burden of Illness' Studies Meeting, Tokyo, 2009

3. Sunao Iyoda, Naoko Honda, Shoji Yamamoto, Jun Terajima, Haruo Watanabe :
LysR-type regulator A (LrhA) controls expression of LEE and non-LEE encoded virulence factors in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. 7th International Symposium on Shiga Toxin (Verocytotoxin)-Producing *Escherichia coli* Infections, Buenos Aires, 2009

4. 寺嶋 淳、伊豫田淳、泉谷秀昌、三戸部治郎、石原朋子、渡邊治雄
最近の腸管出血性大腸菌感染症の動向について

第 82 回日本細菌学会総、名古屋、2009

5. 伊豫田 淳、本田尚子、山本章治、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多重発現制御機構。

第82回日本細菌学会総会、名古屋、2009

6. 大岡唯祐、小椋義俊、井口 純、Md Asadulghani、中山恵介、小林秀樹、寺嶋 淳、渡邊治雄、林 哲也：腸管出血性大腸菌

(EHEC) 及び腸管病原性大腸菌 (EPEC) におけるLEE領域の多様性解析。第82回日本細菌学会総会、名古屋、2009

7. 寺嶋 淳、伊豫田 淳、泉谷秀昌、三戸部治郎、石原朋子、渡邊治雄

地研・感染研のネットワークによるEHEC感染症の動向把握

第 13 回腸管出血性大腸菌感染症シンポジウム、泉佐野市、2009

8. 勢戸和子、田口真澄、坂田淳子、原田哲也、寺嶋 淳

IS-printingによる志賀毒素産生性大腸菌 0157の遺伝子型別

第 13 回腸管出血性大腸菌感染症シンポジウム、泉佐野市、2009

9. 杉本典彦、寺嶋 淳、伊豫田淳、嶋 謙介、呉 育羅、日野根谷 淳、朝倉昌博、渡邊治雄、山崎伸二

志賀毒素ファージを標的とした腸管出血性大腸菌026及び0111の簡便・迅速なDNAフィンガープリンティング法の開発

第13回腸管出血性大腸菌感染症シンポジウム、泉佐野市、2009

10. 横山栄二：腸管出血性大腸菌 0157 の分子系統学的解析，第 13 回腸管出血性大腸菌感染症シンポジウム，2009，大阪府

11. 倉園貴至，砂押克彦，大島まり子，小野一晃，大塚佳代子，青木敦子，野口貴美子，

- 中川俊夫: ステーキチェーン店でのSTEC 0157 発生事例, 第22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, 2010, 前橋市
12. A群レンサ球菌の産生するMタンパク産生量の多様性 松本昌門、鈴木匡弘、皆川洋子、岡本 陽、太田美智男、長谷川忠男 第46回日本細菌学会、中部支部総会 2009 10. 23 名古屋市
13. 田辺純子, 大前壽子, 橋田みさを 榮井毅, 吉田孝子, 北堀吉映: 飲食チェーン店の角切りステーキが原因と推察された腸管出血性大腸菌0157 による食中毒事例, 第30 回奈良県公衆衛生学会 (2009 年12 月, 奈良)
14. 大前壽子, 橋田みさを, 榮井毅, 田辺純子, 吉田孝子, 北堀吉映: 奈良県における角切りステーキによる腸管出血性大腸菌0157 食中毒事例の報告, 第36 回地方衛生研究所全国協議会近畿支部細菌部会研究会 (2009 年11月, 京都)
15. 江藤 良樹、市原 祥子、濱崎 光宏、村上 光一、竹中 重幸、堀川 和美、「腸管出血性大腸菌検査の現状と遺伝子解析について」、第35 回九州衛生環境技術協議会 (2009. 10. 8-9) .
16. 中村 祥子、江藤 良樹、濱崎 光宏、村上 光一、竹中 重幸、堀川 和美、福岡県で分離された稀な血清型の志賀毒素産生性大腸菌について、福岡県保健環境研究所年報、2008、35、59-64.
17. 岡智一郎、高木弘隆、遠矢幸伸、武田直和、脇田隆字、片山和彦 バイオセンサー発現細胞を用いたネコカリシウイルス感染検出系の構築
- 第 32 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2009 年 12 月.
18. 本村和嗣、横山勝、大出裕高、中村浩美、守宏美、岡智一郎、片山和彦、神田忠仁、田中智之、武田直和、佐藤裕徳 ノロウイルスGII/4 ゲノムとキャプシド構造の自然界での進化
- 第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009 年 10 月.
19. 中西章、Benoit Chapellier, 片山和彦、岡智一郎、武田直和 ノロウイルスを利用した経口ワクチン用ベクター作成の試み
- 第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009 年 10 月.
20. 片山和彦、岡智一郎、脇田隆字 ノロウイルスリバーシジェネティックシステムのプロテアーゼを利用した制御
- 第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009 年 10 月.
21. 岡智一郎、高木弘隆、遠矢幸伸、武田直和、脇田隆字、片山和彦 カリシウイルス増殖阻害物質スクリーニング系の構築
- 第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009 年 10 月.
22. 北島正章、岡智一郎、遠矢幸伸、高木弘隆、片山浩之、武田直和、片山和彦 Nested RT-PCR および Real-time RT-PCR によるマウスノロウイルス核酸検出系の構築
- 第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009 年 10 月.
23. 北島正章、岡智一郎、原本英司、片山浩