

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 22 年度 総括・研究分担報告書

(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 23(2011)年 4 月

目次

1. 平成 22 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 22 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 共通外部精度管理の実施方法について	24
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
沖村 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 敬	札幌市衛生研究所
勝見 正道	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菌株の解析方法の検討	29
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 白田 忠雄	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
古川 一郎	神奈川県衛生研究所
松本 裕子	横浜市衛生研究所
植松 星香	山梨県衛生環境研究所
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

(IV) 東海・北陸ブロック

研究分担 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) 活用状況調査と

PCR型別法 (IS printing system及びPOT法) の実施…………… 46

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…………… 87

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
	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
	杉浦 伸明	京都府保健環境研究所
	木澤 正人	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
	濱 夏樹	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
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
河原 隆二	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
神吉 政史	大阪府立公衆衛生研究所

b) カンピロバクター食中毒事例での PFGE と RFLP を併用した解析…………… 104

研究協力者	中嶋 智子	京都府保健環境研究所
	河野 通大	京都府南丹保健所
	三谷亜里子	京都府山城北保健所
	杉浦 伸明	京都府保健環境研究所
	浅井 紀夫	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) 腸管出血性大腸菌O157のMLVA解析の改良法…………… 110

研究協力者	榮井 毅	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
	田邊 純子	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…………… 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
	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
	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
	内田 順子	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
	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) 同一飲食店利用者における腸管出血性大腸菌O157:H7 VT1,2感染症の統発事例について…………… 125

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) 腸管出血性大腸菌O157のIS-printing Systemを用いた分子疫学解析…………… 127

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) 島根県におけるIS printing法による腸管出血性大腸菌O157の
分子疫学解析の有用性の検討…………… 132

研究協力者 黒崎 守人 島根県保健環境科学研究所

e) 広島県で分離された腸管出血性大腸菌における疫学的解析指標の検討…………… 136

研究協力者 山田 裕子 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
桑山 勝 広島県立総合技術研究所保健環境センター

f) 腸管出血性大腸菌の分子疫学的解析法の比較検討…………… 142

研究協力者 末永 朱美 広島市衛生研究所
田内 敦子 広島市衛生研究所
宮野 高光 広島市衛生研究所
花木 陽子 広島市衛生研究所
国井 悦子 広島市衛生研究所
京塚 明美 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

g) 腸管出血性大腸菌O157の感染拡大防止における
IS-printing Systemの活用について…………… 149

研究協力者 下野 生世 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

h) IS-printing Systemを用いた
腸管出血性大腸菌O157の分子疫学解析…………… 152

研究協力者 有塚 真弓 香川県環境保健研究センター
関 和美 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
内田 順子 香川県環境保健研究センター

i) 愛媛県内の保育園で発生した腸管出血性大腸菌O157 VT1集団発生事例について…… 156

研究協力者	浅野由紀子	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

j) 腸管出血性大腸菌O157感染症事例での分子疫学的解析……………162

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

k) クレード解析でクレード8と判定されたO157菌株の

IS-printing、パルスフィールドゲル電気泳動法(PFGE)による解析……………166

研究協力者	富永 潔	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
	亀山 光博	山口県環境保健センター

(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 の精度管理— …………… 180

研究分担者	堀川 和美	福岡県保健環境研究所
研究協力者	麻生嶋七美	福岡市保健環境研究所
	寺西 泰司	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
	吉野 修司	宮崎県衛生環境研究所
	濱田 まどか	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
	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) 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

— 九州地区で分離されたO157菌株のIS-printing Systemによる比較検討— …………… 190		
研究分担者	堀川 和美	福岡県保健環境研究所
研究協力者	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
	小野塚大介	福岡県保健環境研究所
	麻生嶋七美	福岡市保健環境研究所
	寺西 泰司	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
	吉野 修司	宮崎県衛生環境研究所
	濱田 まどか	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

c) 「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 “ <i>Shigella sonnei</i> のmultilocus variable-number tandem repeat analysis (MLVA)”…………… 194
--

d) 保育園で発生した2種類の腸管出血性大腸菌 O157 による集団感染事例……………199		
研究協力者	徳岡 英亮	熊本県保健環境科学研究所
	古川 真斗	熊本県保健環境科学研究所
	松本 一俊	熊本県保健環境科学研究所
	原田 誠也	熊本県保健環境科学研究所

グループ2：ウイルス

(I) ノロウイルスゲノムの分子進化…………… 201

研究分担者	片山 和彦	国立感染症研究所	ウイルス第二部
研究協力者	下池 貴志	国立感染症研究所	ウイルス第二部
	ハスマン・グラント	国立感染症研究所	ウイルス第二部
	村上 耕介	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…………… 210

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…………… 212

研究分担者	岡 智一郎	国立感染症研究所	ウイルス第二部
研究協力者	吉澄 志磨	北海道立衛生研究所	

石田 勢津子	北海道立衛生研究所
斎藤 博之	秋田県健康環境センター
植木 洋	宮城県保健環境センター
岡田 峰幸	千葉県衛生研究所
森 功次	東京都健康安全研究センター
吉田 徹也	長野県環境保全研究所
入谷 展弘	大阪市立環境科学研究所
山下 育孝	愛媛県立衛生環境研究所
飯塚 節子	島根県保健環境科学研究所
原田 誠也	熊本県保健環境科学研究所
岩切 章	宮崎県衛生環境研究所 (現 宮崎県日向食肉衛生検査所)

(IV) サポウイルス感染症におけるImmunochromatography (IC)法の開発…………… 219

研究分担者	田中 智之	堺市衛生研究所
	岡 智一郎	国立感染症研究所 ウイルス第二部
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
	原田 誠也	熊本県保健環境科学研究所
	西口 智子	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

(V) カリシウェブの更新と展開…………… 225

研究分担者	三瀬 敬治	札幌医科大学・医学部・衛生学講座
-------	-------	------------------

3. 研究成果の刊行に関する一覧表 (平成 22 年度) …………… 231

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：

ウイルスや細菌を原因とする食品由来感染症の調査においては、原因となる病原体の遺伝学的解析方法に基づく情報と疫学情報の組み合わせによる総合情報を、迅速に関係機関で共有することが重要である。食品由来感染症を惹起する病原体の解析情報データベースとして、ウイルスではカリシウェブ、細菌ではパルスネットの構築が進みつつある。いずれのデータベースも、オンライン上での正確な病原体解析情報を蓄積することが、システムが有効に機能するためには必須である。実際の解析では、継続的に使用されている PFGE の他に、腸管出血性大腸菌 (EHEC) 0157 の解析で、IS-printing system (IS 法) 及び Multilocus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) が事例解析に有効であることを明らかにしている。

ノロウイルス (NoV) では、全長塩基配列の決定していない標準株の解析から、病原性発現における構造タンパク質の役割や ORF1 の genotype における貢献度を明らかにするとともに、サポウイルス (SaV) では、従来とは異なる遺伝的クラスターに属するウイルス株について構造タンパク質全長領域の塩基配列を決定し、カリシウェブへの登録を行った。カリシウェブについては、デザインと URL を変更し、ウェブ内カリシウイルスデータベースの国立データバンク (DDBJ) からの自動情報更新速度を高速化した。系統樹作成サービスは継続的にデータを蓄積しつつある。Immunochromatography (IC) 法によるサポウイルス迅速診断系では、臨床検体及びサポウイルス特異抗体との反応系は構築されたが、検出感度が低く、Genotype II, IV, V で抗原検出モノクローナル抗体の反応性が極めて低いことが明らかになった。

研究分担者	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)	研究協力者 : 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 (各研究分担報告書を参照)

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)

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), 原田 誠也 (熊本県保健環境科学研究所), 西口 智子、三好 龍也、内野 清子、吉田 永祥 (堺市衛生研究)、吉澄 志磨、石田 勢津子 (北海道立衛生研究所)、斎藤 博之 (秋田県健康環境センター)、植木 洋 (宮城県保健環境センター)、岡田峰幸、(千葉県衛生研究所)、森 功次 (東京都健康安全研究センター)、吉田 徹也 (長野県環境保全研究所)、入谷 展弘 (大阪市立環境科学研究所)、岩切 章 (宮崎県衛生環境研究所 (現宮崎県日向食肉衛生検査所))、下池 貴志、ハンスマン・グラント、村上 耕介 (国立感染症研究所)

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 解析及び 0157 については IS 法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オンラインでデータベースにアクセスできる体制を整えた。c) 分担研究者の統括ブロックにおいて、発生事例に応用した PFGE 或いは IS 法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) 全長塩基配列の決定していない NoV 標準株の全長塩基配列解析を進め、得られた情報を分子遺伝学的に解析した。NoV の P22 タンパク質の機能解析及び P-domain の X 線構造解析により NoV の感染機構を調べた。SaV の分子疫学のための分子系統解析手法の確立を目指し、構造タンパク質領域全長の塩基配列蓄積を行った。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継続した。さらに、カリシウイルスの遺伝子データベースであるカリシウェブを改良し、データ更新の高速化を実現した。カリシウェブ内の系統樹作成サービスである「楽しカリシ」の新規データ登録を継続した。

(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

平成 22 年度は、BN のアップグレード等により全国 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直接解析できるようになるとともに、サーバ上に掲示版を設定し情報共有の補助とした。今後、精度の高いデータを蓄積し得るシステム管理が実用的な BN server 運用の鍵と考えられる。2010 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。2010 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、1819 株に対して 2010 年に分離された新しいサブタイプとして 661 種類、2009 年に分離されたことのある

サブタイプが 48 種類、その他が 75 種類見いだされた。また、EHEC 026 では、350 株に対して 159 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 34 種類存在したが、そのうち 7 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。2010 年 6～7 月に東海地方を中心とした 0157 の広域発生では、共通 PFGE パターンを示す分離株において 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、共通感染源の存在を強く示唆する結果となった。

2. 北海道・東北・新潟ブロック

平成 21 年度における本研究において、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* BraenderupH9812 株 (以下 SB 株) でプラグを作成し北海道衛研に送付させ、制限酵素処理、PFGE を行い、泳動像を解析する方法を試みた。今回、これらの研究で得た結果を元に実際に制度管理を実施して有効性、問題点を検討した。制度管理方法としては、SB 株で菌濃度の異なるプラグを作成し、これを送付して、各地研で作成した SB 株のプラグとともに制限酵素処理を行い、その泳動像を送り返すという方法で行った。各地研の PFGE 泳動像は、ほぼ同様の結果を得ることができたが、一部地研でバンドのピントがあまく、167.1

と 173.4Kbp のバンドの識別がつきづらかった。また1地研で、プラグのマウントでプラグが曲がったためと思われるバンドの乱れが認められた。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せ、定期的な外部制度管理方法として有用であった。

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株を用いて、11施設でPFGE解析を行った。多くのPFGE画像はシャープで明瞭なバンドが得られていたが、一部にはバンドの分離が不十分である施設も認められた。各施設から送られた画像をもとに解析を行った結果、同じ菌株は同じクラスターを形成していた。しかし、いずれも全ての施設で100%一致となった株は無かった。写真を目視で比較すると同じパターンであることは判断できるが、画像解析ソフトを使ってデンドログラム解析をすると100%一致とはならなかった。異なる施設で行ったPFGE画像でも100%一致となるような条件等について今後さらに検討していく予定である。IS-printing system (IS) 法による解析は迅速性かつ異なる施設間での比較が容易であるというメリットがある。また、PFGE解析では比較できない株（スメア株）についてはIS解析が有効であることが確認できた。

4. 東海・北陸ブロック

東海・北陸ブロックでは、9か所の地方衛生研究所等（地研）においてPFGE解析結果の行政への還元に関する調査を行っ

た。8地研で集団事例発生時にPFGE解析結果が行政に還元されており、各地研で年間1~2例の事例解析に成果を挙げていた。これらの集団事例には、腸管出血性大腸菌、サルモネラ、及びエンテロバクタークロアカが含まれており、現在まで継続してきたPFGE解析手法の精度管理が有効であることが証明された。また、PFGEの精度管理においても、食中毒菌や院内感染原因菌も含むより広範な病原菌についても対象として取り組むべきだと考えられた。PFGE以外の型別方法として、腸管出血性大腸菌0157に対するPCR型別法であるIS-printing system及び黄色ブドウ球菌に対するPCR型別法であるPOTをそれぞれの地研で実施しPFGEとの識別能について比較を行った。今回の供試菌の結果から、両方法ともPFGEとほぼ同程度の解析力があることが示唆され、簡便性、迅速性については優っていた。

5. 近畿ブロック

近畿ブロックでは、腸管出血性大腸菌の中で最も分離頻度の高い血清群0157について、IS-printing System (IS) 法とパルスフィールド・ゲル電気泳動 (PFGE) 法の信頼性確保のため精度管理を実施するとともに、ブロック内ISデータベースの充実を図った。IS法の精度管理では、電気泳動像の品質不良から誤判定になる場合があったものの、データベースについては、2011年3月4日までに1,134株の型別成績が登録された。今後は、患者発生からIS型登録までの日数短縮や疫学情報の交換に踏み込む条件の設定が課題である。PFGE法で

は、継続的な精度管理が施設間差を最小にとどめていると考えられ、10施設から電送されたPFGE画像は、4人の解析者によって菌株ごとに高い近似度が得られた。Multilocus variable-number tandem repeat analysis法の導入に向け、4施設で同一のテンプレートを解析したところ、1施設で測定値が小さくなる傾向がみられたものの他の3施設では同一の結果が得られ、近畿ブロックで共通の疫学指標として使用可能であると考えられた。しかしながら、6~18bpのrepeat unitのくり返し数の違いで型別するため、わずかな測定値の差が判定結果に影響を与えることもあり、問題点の再現性を確認し原因を究明することが必要である。

6. 中国四国ブロック

中四国ブロックでは、腸管出血性大腸菌0157株を用いてPFGEとIS-printing Systemによる型別方法の精度管理を行った。また、各県での事例において両方法の有用性を評価した。各施設における精度管理では、両方法の結果がほぼ一致したものの、一部施設においてIS-printing Systemにおける結果で相違が生じたことから、ブロック内での結果を比較可能とするためにも、継続的な精度管理を行う必要がある。各県の事例発生時におけるIS-printing Systemの利用から、本法の簡単・迅速な疫学解析ツールとしての有用性が再確認された。MLVA法については、今後実施可能となった他県も加えて検討を行う予定である。また、本年度はインターネット経由で国立感染症研究所に設けたPFGEデータ用

サーバーへのアクセスを検討し、接続可能であることを確認した。

7. 九州ブロック

九州ブロック（12施設参加）では、

- 1) IS-printing System (IS) の精度管理および有用性検討、
- 2) 九州地区で分離された0157菌株のIS-printing Systemによる比較検討、
- 3) 研修（新規遺伝子解析法：*Shigella sonnei* の multilocus variable-number repeat analysis (MLVA)、
- 4) 事例検討（1事例） を実施した。

ISの九州ブロック地方衛生研究所間の精度管理は、腸管出血性大腸菌0157、4株のDNAを配布し参加施設でISを実施しその結果を比較するものであり、有用性の検討は各参加機関の分離株を用いてISを実施しその結果を比較するものである。その結果、精度管理では共通して用いた腸管出血性大腸菌0157、4株のIS型別は、4施設の結果が期待される結果と異なっていた。原因は、PCR産物の増幅ができていない、エキストラバンドの誤判定、バンドの誤判定などが挙げられた。

ウイルスグループ；

昨年までの研究で、NoV、SaVでは、汚染食材からの感染に加え、高頻度のヒトからヒトへの感染や、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。しかし、無症候性感染者に由来するウイルスに関する研究は進んでおらず、症状の有無はウイルス側の問題なのか、宿主側の問題なのかは明らかにされていない。無症候性感染者に由来する

ウイルスが食品を汚染し、大流行を起こす可能性は否定できない。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制御するためには、ウイルスの感染拡大を制御するためには、ウイルスゲノム情報を網羅的に捉えると同時に、ウイルスの病原性発現機構を解析し、分子進化遺伝学的手法による疫学を融合させて解析する必要がある。カリシウイルスの情報基盤となる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。

分担研究者、片山和彦は、全長塩基配列の決定していない標準株の全長塩基配列解析を進め、ORF2-3の構造タンパク質領域の genotype クラスタは、GI で 17 以上、GII で 19 以上が報告されているが、ORF1 領域のクラスタ解析を行うと、GI, GII ともにそれよりも数が少ないことが明らかになった。ORF1 領域には、6 種類の非構造タンパク質、N-terminal protein, NTPase, 3A-like protein, VPg, protease, RNA dependent RNA polymerase が存在しており、これらがヒト細胞内におけるウイルス増殖、RNA の複製などに密接に関係していると考えられる。3A-like protein (p22) は、COP によるタンパク質輸送、ゴルジ体の再生機構に著しい影響を与えていることが明らかになった。この研究結果から、ORF1 は、宿主とのより密接なインタラクションが、それらの働きに関係している可能性があり、宿主細胞内で宿主からの選択圧

を強く受けている可能性が示唆された。ORF1 と ORF2-3 では、機能的な制約の性質が異なっており、別々の進化様式を取っていると考えられることから、ORF1, ORF2-3 は別々に配列の解析を行う必要がある。

無症候者の NoV 遺伝子型は、GII/2, GII/4, GI/4, GI/7 であった。無症候者に特徴的な NoV の genotype は無く、有症者と同様な genotype 分布を示していた。しかし、無症候者の GII/2, GII/4, GI/4, GI/7 と有症者の GII/2, GII/4, GI/4, GI/7 の塩基配列を比較すると、塩基配列の差が複数見つかった。今後、ORF1 にコードされている非構造タンパク質の機能と構造などの情報を加味しながら、注意深く有症者と無症候者との塩基配列の差、アミノ酸配列の違いを調べていく必要がある。

構造タンパク質 P-domain の結晶構造解析により、HBGA との結合様式を解析した結果、全てのタイプの HBGA は、 $\alpha 1-2$ フコースが P protein dimer の最上部に認められる結合サイトに同じ角度かつ同じ強さで結合することが明らかになった。 $\alpha 1-2$ フコースは、ヒト消化管上皮に多量に発現されているムチンに含まれていることから、感染性粒子を消化管上にアンカーするために使用されている可能性を示唆した。

分担研究者、染谷雄一は、さらなるノロウイルス粒子と組織血液型抗原（糖鎖）との相互作用に関する生化学的、構造生物学的情報を得ることを目的に、いくつかの株のウイルス様中空粒子を調製し、結晶化を

試みている。

分担研究者、岡智一郎は、地方衛生研究所ほかの研究協力者とともに、サポウウイルスの分子疫学のための分子系統解析手法の確立を目指し、構造タンパク質領域全長の塩基配列蓄積を行った。本年度の研究では SaV の遺伝子タイピング法確立を目指し、国内で検出された SaV のうち、従来報告されている SaV 株と遺伝的クラスターが異なると考えられる株を含めた合計 21 株を選択し、構造タンパク質全長領域の塩基配列の決定を行うとともにカリシウェブへの登録を行った。

分担研究者、田中智之は、Immunochemistry (IC) 法によるサポウウイルス迅速診断系の構築を試みた。臨床検体及びサポウウイルス特異抗体との反応系は構築されたが、検出感度が低いことが判明した。その理由として抗原検出モノクローナル抗体の反応性が、特に遺伝子型別 Genotype II、IV、V で極めて低いことが判明した。今後、pVL 系発現ベクター、カイコ蛹による発現システムなどを用いて、良い抗原性の担保される精製度の高い SaV-VLP の獲得、抗体の作製を目指す。

分担研究者三瀬啓治は、カリシウェブをデザインから新しくし、URL も <http://teine.cc.sapmed.ac.jp/~calicinew/> に変更した。カリシウェブ内に構築した、カリシウイルスに特化した遺伝子データベースは、国立 DNA データバンク (DDBJ) から提供される更新ファイルのデータ形式が変更となり、必要なカリシウイルスの情報を取り出すためのプログラムに大幅

な変更を加えた。また DDBJ に登録される情報に、長大なものが増加してきたため、昨年度よりも更なる高速化が必要とされ、毎日のデータ更新を行うプログラムを全面的に見直し、約 5 倍の高速化を達成した。この改良により、毎日の更新データ 1 ギガあたり 40 分で対応可能となった。デザインも新カリシウェブとの統一性を持つものとした (平成 23 年 3 月 2 日現在登録データ数 14967 件、平成 20 年 8 月末から約 5500 アクセス)。また、カリシウェブ内のクローズトなフォーラムにおける、系統樹作成サービスは順調に登録データ数を増やし、解析データ数は昨年報告より 40 増加の、57 となった。

D. 考察

食品由来感染症を惹起する病原体の解析情報をデータベース化して共有することにより、当該感染症を迅速に探知しその拡大を阻止することに役立つシステムの構築が継続されている。本研究では、その目的を達成するためのシステムとして、ウイルスではカリシウェブ、細菌ではパルスネットの構築が進みつつある。いずれのデータベースも、オンライン上での正確な病原体解析情報を蓄積することが、システムが有効に機能するためには必須である。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、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、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。PFGE 解析以外の手法として、IS、MLVA 等におい

でも実施可能である機関において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。2010年に発生した事例においても、各機関における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。

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。NoVのORF1は、宿主とのより密接なインタラクションが、それらの働きに関係している可能性があり、宿主細胞内で宿主からの選択圧を強く受けている可能性が示唆された。ORF1とORF2-3では、機能的な制約の性質が異なっており、別々の進化様式を取っていると考えられることから、ORF1、ORF23は別々に配列の解析を行う必要がある。無症候者のNoV遺伝子は、有症者のそれとの比較で、多数の塩基配列の差が見つかった。今後、無症候者との塩基配列の差、アミノ酸配列の違いを調べていく必要がある。構造タンパク質P-domainの結晶構造解析により、 $\alpha 1-2$ フコースが結合に主要な役割を果たしていることが明らかになった。 $\alpha 1-2$ フコースは、ヒト消化管上皮に多量に発現されているムチンに含まれていることから、感染性粒子を消化管上にアンカーするために使用されている可能性が示唆された。

SaVのRT-PCRによる核酸検出には主にポリメラーゼ領域と構造タンパク質コード領域の2種類がターゲット領域として用いられている。我々の検討では、構造タ

ンパク質コード領域をターゲットとするPCR系の方がサポウイルスの検出率が高い。これまでの我々の研究グループの検討により、構造タンパク質コード領域の塩基配列に基づく系統樹解析で異なる遺伝子クラスターになる株間では、ウイルスの抗原性が異なることが明らかになりつつある。

検出率の高さと、抗原性との関連という観点から、SaVの場合もノロウイルスと同様、構造タンパク質の塩基配列に基づくgenotypingを行うのが妥当と考えられる。

サポウイルス迅速診断系の確立に関して、標識抗体をカクテル化することによりIC法反応ラインが明瞭に目視できるようになった。しかし、検出感度は微増の状況である。サポウイルスVLPsの大量発現の技術的改良が積極的に行われているが、多量のVLPsの入手によりIC法の改良は可能である。

E. 結論

食品由来感染症を惹起する病原体の解析情報データベースとして、ウイルスではカリシウェブ、細菌ではパルスネットの構築が継続されている。いずれのデータベースも、オンライン上での正確な病原体解析情報を蓄積することが、システムが有効に機能するためには必須である。分子遺伝学的手法に基づいた詳細な病原体解析手法の評価と開発が、有用なデータベース構築に必要だと考えられる。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 誌上发表

1. Izumiya H, Pei Y, Terajima J, Ohnishi M, Hayashi T, Iyoda S, Watanabe H. New system for multilocus variable-number tandem-repeat analysis of the enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains belonging to three major serogroups: O157, O26, and O111.

Microbiol Immunol. 2010, 54, 569-577.

2. Masaaki Minami, Mariko Ichikawa, Hideyuki Matsui, Nanako Hata, Naoki Wakiyama, Masakado Matsumoto, Michio Ohta, Tadao Hasegawa Prevalence of a Streptococcal Inhibitor of a Complement-Mediated Cell lysis-like Gene (sicG) in *Streptococcus Dysgalactiae subsp. Equisimilis*. Current Microbiology Nov 4 (2010) [Epub ahead of print]

3. Tadao Hasegawa, Akira Okamoto, Takuya Kamimura, Ichiro Tatsuno, Sin-Nosuke Hashikawa, Mitsutaka Yabutani, Masakado Matsumoto, Keiko Yamada, Masanori Isaka, Masaaki Minami, Michio Ohta Detection of invasive protein profile of *Streptococcus pyogenes* M1 isolates from pharyngitis patients. Acta Pathologica Microbiologica et Immunologica Scandinavica 118(3): 167-178 (2010)

4. Masaaki Minami, Yukio Wakimoto, Masakado Matsumoto, Hideyuki Matsui,

Yasue Kubota, Atsushi Okada, Masanori Isaka, Ichiro Tatsuno, Yasuhito Tanaka, Tadao Hasegawa Characterization of *Streptococcus pyogenes* isolated from balanoposthitis patients presumably transmitted by penile-oral sexual intercourse. Current Microbiology 61(2): 101-105 (2010)

5. Sukhumungoon P, Nakaguchi Y, Ingviya N, Pradutkanchana J, Iwade Y, Seto K, Son R, Nishibuchi M, Vuddhakul V : Investigation of *stx2⁺ eae⁺* *Escherichia coli* O157:H7 in beef imported from Malaysia to Thailand, Int. Food Res. J., 18: 381-386, 2011

6. Sakai, T., Ohmae, H. and Kitahori, Y. : New Modified Method of Multiple-Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157, Japanese Journal of Infectious Diseases, 63(3) : 217-219 (2010)

7. Oka T, Takagi H, Tohya Y, Murakami K, Takeda N, Wakita T, Katayama K. Bioluminescence technologies to detect calicivirus protease activity in cell-free system and in infected cells. Antiviral Research. [Epub ahead of print]

8. Sharp, T. M., Guix, S., Katayama K, Crawford, S. E., Estes, M. K. Inhibition of Cellular Protein Secretion by Norwalk Virus Nonstructural Protein p22 Requires a

- Mimic of an Endoplasmic Reticulum Export Signal. PLoS ONE 5(10) e13130, 2010.
9. Oka T, Murakami K, Wakita T, Katayama K. Comparative site-directed mutagenesis in the catalytic amino acid triad in calicivirus proteases. *Microbiol Immunol.* 2011; Feb; 55 (2): 108-114.
10. Kitajima M, Oka T, Haramoto E, Phanuwat C, Takeda N, Katayama K, Katayama H. Genetic Diversity of Genogroup IV Noroviruses in Wastewater in Japan. *Lett Appl Microbiol.* 2011 Feb; 52 (2): 181-184.
11. Kitajima M, Oka T, Takagi H, Tohya Y, Katayama H, Takeda N, Katayama K. Development and application of a broadly reactive real-time reverse transcription-PCR assay for detection of murine noroviruses. *J. Virol. Methods.* 2010 Nov;169(2):269-73.
12. Kitajima M, Oka T, Haramoto E, Takeda N, Katayama K, Katayama H. Seasonal distribution and genetic diversity of genogroups I, II, and IV noroviruses in the Tamagawa River, Japan. *Environ Sci Technol.* 2010 Sep 15;44(18):7116-22.
13. Ueki Y, Shoji M, Okimura Y, Miyota Y, Masago Y, Oka T, Katayama K, Takeda N, Noda M, Miura T, Sano D, Omura T. Detection of Sapovirus in oysters. *Microbiol Immunol.* 2010 Aug;54(8):483-6.
14. Motomura K, Yokoyama M, Ode H, Nakamura H, Mori H, Kanda T, Oka T, Katayama K, Noda M, Tanaka T, Takeda N, Sato H; Norovirus Surveillance Group of Japan. Divergent evolution of norovirus GII/4 by genome recombination from May 2006 to February 2009 in Japan. *J. Virol.* 2010 Aug;84(16):8085-97.
15. 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. *J. Med. Virol.* 2010 Jul;82(7):1247-54.
16. 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. *Appl Environ Microbiol.* 2010 Apr;76(8):2461-7
17. 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. *J. Med. Virol.* 2010 Apr;82(4):720-6.
18. 勢戸和子：食水系感染症病原体の検査法8 腸管出血性大腸菌（志賀毒素産生性大腸菌），モダンメディア，56：337-340，2010
19. 勢戸和子：食品の微生物検査法と食中毒発生時の疫学調査法 5. 下痢原性大

腸菌, 防菌防黴誌, 38: 339-350, 2010

20. 勢戸和子: 食品検体からの下痢原性大腸菌の分離・同定, NEXT 食品安全・衛生学実験(岡崎眞, 大澤朗, 川添禎浩 編集), 講談社, 東京, 2010

21. 岡智一郎, 片山和彦, 小林慎一, 飯高順子, 野田衛 “愛知県と川崎市の食中毒事例から検出されたサポウイルス GI/2 の塩基配列の比較” 病原体微生物情報(IASR) Vol. 31 No. 11 (No. 369), 2010年11月号 p13-p14

2) 学会発表

1. 寺嶋 淳 食中毒事件の原因究明やディフューズアウトブレイクの早期発見に向けた検査技術開発と全国ネットワーク—腸管出血性大腸菌感染症を例に— 第69回日本公衆衛生学会総会、東京、2010

2. 伊豫田淳, 寺嶋淳, 大西真 腸管出血性大腸菌におけるLEE遺伝子群のマスターレギュレーターPchのグローバル発現制御機構の解析 第92回日本細菌関東支部総会、東京、2010

3. 寺嶋 淳、伊豫田淳、泉谷秀昌、三戸部治郎、石原朋子、大西 真 腸管出血性大腸菌の分子疫学と広域ネットワーク 第59回日本感染症学会東日本地方会学術集会、東京、2010

4. 伊豫田 淳、本田尚子、寺嶋 淳、大西 真 LEE遺伝子群のマスターレギュレーターPchの分別発現制御機構の解析 第14回腸管出血性大腸菌感染症シンポジウム、宮崎市、2010

5. 寺嶋 淳、伊豫田淳、泉谷秀昌、

三戸部治郎、石原朋子、大西 真 最近の腸管出血性大腸菌感染症の動向について 第14回腸管出血性大腸菌感染症シンポジウム、宮崎市、2010

6. 寺嶋 淳、伊豫田淳、泉谷秀昌、三戸部治郎、石原朋子、渡辺治雄
Molecular epidemiological investigation of Enterohaemorrhagic Escherichia coli infection in Japan; Perspectives and problems. 腸管出血性大腸菌感染症の分子疫学研究の現状と課題、第83回日本細菌学会総、横浜市、2010

7. 勢戸和子、田口真澄、寺嶋 淳
Molecular typing of Shiga toxin-producing Escherichia coli O157 by using the IS-printing System. IS-printing Systemによる志賀毒素産生性大腸菌O157遺伝子型別の有用性、第83回日本細菌学会総、横浜市、2010

8. 伊豫田淳、寺嶋 淳、泉谷秀昌、大西 真、渡邊治雄 腸管出血性大腸菌ワーキンググループ Virulence traits of EHEC O157:H7 clade 8, a possible high virulent lineage、第83回日本細菌学会総、横浜市、2010

9. 山崎 貢、松本昌門、青木日出美、山本弘明、山田和弘、平松礼司、皆川洋子、岩出義人 増菌培養と LAMP 法を組み合わせた腸炎ビブリオ高感度検出法の検討 第 31 回日本食品微生物学会学術総会 平成 22 年 11 月 11 日～12 日 滋賀県大津市

10. 勢戸和子、神吉政史、原田哲也、田口真澄: 市販食品からの志賀毒素産生性大腸菌 (STEC) 検出法法の検討と分離株の

- 性状, 第14回腸管出血性大腸菌感染症シンポジウム (2010年7月, 宮崎)
11. 神吉政史, 勢戸和子, 原田哲也, 久米田裕子: チーズにおける腸管出血性大腸菌の増菌培養法の比較, 第31回日本食品微生物学会 (2010年11月, 大津)
 12. 中嶋智子, 杉浦伸明, 浅井紀夫, 柳瀬杉夫, 河野通大, 三谷亜里子: カンピロバクター食中毒の疫学解析事例について, 第37回地方衛生研究所全国協議会近畿支部細菌部会研究会 (2010年11月, 神戸)
 13. 柴井 毅, 田邊純子, 橋田みさを, 北堀吉映: 310 Genetic Analyzerによる腸管出血性大腸菌O157のMLVAについて, 第37回地方衛生研究所全国協議会近畿支部細菌部会研究会 (2010年11月, 神戸市)
 14. Harada S, Nishimura K, Kiyota N, Matsumoto K, Yahiro S, Okada M, Katayama K, Oka T. Surveillance of pathogens in outpatients with gastroenteritis and genetic analysis of sapovirus strains between 2002 and 2009 in Kumamoto Prefecture, Japan 16th Federation of Asian Veterinary Associations Congress 2011 February 16-18, 2011. Cebu City, Phillipines
 15. 岡智一郎, 横山勝, 高木弘隆, 本村和嗣, 村上耕介, 佐藤裕徳, 脇田隆宇, 片山和彦. カリシウイルスプロテアーゼ catalytic triad 形成残基のポリプロテイン切断活性への重要性. 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会. 2010年12月7~10日, 神戸
 16. 村上耕介, 岡智一郎, 脇田隆宇, 松田幹, 片山和彦. ノロウイルスのヒト腸管由来培養細胞への結合様式. 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会. 2010年12月7~10日, 神戸
 17. 野田衛, 片山和彦, 石井孝司, 岡智一郎, 多田有希, 山下和予, 三瀬敬治, 地方衛生研究所, 中村奈緒美, 島田智恵, 岡部信彦. 「塩基配列情報共有化の食品媒介ウイルス感染症の疫学調査への応用」第31回日本食品微生物学会総会, 2010年11月11日~12日, 滋賀
 18. 斎藤博之, 東方美保, 岡智一郎, 片山和彦, 田中智之, 野田衛. 食品検体のノロウイルス検査を目的としたパンソルビン・トラップ法の開発. 第31回日本食品微生物学会総会, 2010年11月11日~12日, 滋賀
 19. 北元憲利, 岡智一郎, 片山和彦, Hansman GS, 三好龍也, 田中智之. サポウイルスに対する単クローン抗体の解析. 第58回日本ウイルス学会学術集会, 2010年11月7日~9日, 徳島
 20. 野田衛, 入谷展弘, 中田恵子, 斎藤博之, 田中忍, 西川篤, 北堀吉映, 三谷亜里子, 三瀬敬治, 山下和予, 岡智一郎, 片山和彦, 岡部信彦. 関西で同時多発的に発生したノロウイルス食中毒事例の解析. 第58回日本ウイルス学会学術集会, 2010年11月7日~9日, 徳島
 21. 高木弘隆, 北島正章, 遠矢幸伸, 岡智一郎, 片山浩之, 片山和彦, 杉山和良. マウスノロウイルス(MNV)のマウス由来培養細胞での増殖性についての検討. 第