

201123003A・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  
(課題番号：H21-新興-一般-003)

平成 23 年度 総括・研究分担報告書  
及び

平成 21～23 年度 総合研究報告書

(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 24(2012)年 4 月

# 目次

## 1. 平成 23 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 23 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

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	12
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	伊豫田 淳 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
	三戸部治郎 国立感染症研究所 細菌第一部
	江藤 良樹 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
	河原 隆二 大阪府公衆衛生研究所 地方衛生研究所

b) 腸管出血性大腸菌の血清型に関する研究	20
研究分担者	伊豫田 淳 国立感染症研究所 細菌第一部
研究協力者	勢戸 和子 大阪府立公衆衛生研究所
	井口 純 宮崎大学
	磯部 順子 富山県衛生研究所
	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
	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
	寺嶋 淳 国立感染症研究所 細菌第一部
	大西 真 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

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 精度管理と精度管理用試料の作成方法の検討について	29
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
	野呂キョウ 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
山口 友美	宮城県保健環境センター
瀬戸 順次	山形県衛生研究所
鈴木 裕	山形県衛生研究所
千葉 一樹	福島県衛生研究所
新井 礼子	新潟県保健環境科学研究所
廣地 敬	札幌市衛生研究所
千葉 久子	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…………… 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	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
	横田 陽子	群馬県衛生環境研究所
	倉園 貴至	埼玉県衛生研究所
	平井晋一郎	千葉県衛生研究所
	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 香星	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
	小西 典子	東京都健康安全研究センター
	齊木 大	東京都健康安全研究センター
	尾畑 浩魅	東京都健康安全研究センター

(Ⅳ) 東海・北陸ブロック

分担研究・東海・北陸地方 11 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) と PCR 型別法である IS printing System の

腸管出血性大腸菌 O157 精度管理と PFGE 解析結果の行政への還元に関する調査…………… 47

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
竹内 由香	豊田市衛生検査所
山本 新也	豊橋市保健所

(V) 近畿ブロック

近畿ブロックにおける腸管出血性大腸菌感染症の分子疫学手法に関する研究…………… 67

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
	福島 敬介	滋賀県衛生科学センター
	浅井 紀夫	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
	下迫 純子	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
	宮本 園子	神戸市環境保健研究所
	川西 伸也	姫路市環境衛生研究所
	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

(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	花原悠太郎	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
	檜本 孝史	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
	山田 裕子	広島県立総合技術研究所保健環境センター
	河村 美登里	広島県立総合技術研究所保健環境センター
	京塚 明美	広島市衛生研究所
	田内 敦子	広島市衛生研究所
	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
下野	生世	徳島県立保健製薬環境センター
石田	弘子	徳島県立保健製薬環境センター
宮本	孝子	香川県環境保健研究センター
松本	純子	愛媛県立衛生環境研究所
藤戸	亜紀	高知県衛生研究所
鍋島	民	高知県衛生研究所

b) 中四国ブロックにおける腸管出血性大腸菌O157を用いた  
パルスフィールドゲル電気泳動システム(PFGE)とIS-printing systemの精度管理…………… 100

研究協力者	花原悠太郎	鳥取県衛生環境研究所
	上田 豊	鳥取県衛生環境研究所

c) 島根県におけるIS printing法を用いた腸管出血性大腸菌O157の分子疫学解析…………… 106

研究協力者	樫本 孝史	島根県保健環境科学研究所
	黒崎 守人	島根県保健環境科学研究所

d) 腸管出血性大腸菌O145の疫学的解析法についての検討…………… 109

研究協力者	河村美登里	広島県立総合技術研究所保健環境センター
	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

e) 広島県で分離された腸管出血性大腸菌O157の

IS-printing System法による疫学的解析— 新しいISコードによる解析の試み —…………… 115

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
	山田 裕子	広島県立総合技術研究所保健環境センター
	河村美登里	広島県立総合技術研究所保健環境センター
	田内 敦子	広島市衛生研究所
	中嶋 洋	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
	石井 学	岡山県環境保健センター
	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
	黒崎 守人	島根県保健環境科学研究所
	樫本 孝史	島根県保健環境科学研究所
	花原悠太郎	鳥取県衛生環境研究所
	宮本 孝子	香川県環境保健研究センター

松本	純子	愛媛県立衛生環境研究所
下野	生世	徳島県立保健製薬環境センター
石田	弘子	徳島県立保健製薬環境センター
藤戸	亜紀	高知県衛生研究所

f) 腸管出血性大腸菌O157:H7の分子疫学的解析 ..... 121

研究協力者	田内 敦子	広島市衛生研究所
	京塚 明美	広島市衛生研究所
	築地 裕美	広島市衛生研究所
	井澤 麻由	広島市衛生研究所
	佐藤 真帆	広島市衛生研究所
	国井 悦子	広島市衛生研究所
	坂本 綾	広島市衛生研究所
	伊藤 文明	広島市衛生研究所
	橋本 和久	広島市衛生研究所
	笠間 良雄	広島市衛生研究所

g) 平成23年3月～5月に県内で小規模流行が確認されたO157クレード8菌株のIS-printing、パルスフィールドゲル電気泳動法(PFGE)、MLVAによる解析 ..... 126

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

h) 中四国ブロックIS-printing systemにおける自動電気泳動装置の有用性に関する検討 ..... 137

研究協力者	石田 弘子	徳島県立保健製薬環境センター
	下野 生世	徳島県立保健製薬環境センター

i) 中四国ブロックにおける香川県の腸管出血性大腸菌O157感染事例の分子疫学解析 ..... 140

研究協力者	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
	関 和美	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) 中四国ブロックにおける香川県で発生した*Campylobacter*属菌食中毒事例 ..... 148

研究協力者	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
	関 和美	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

k) 中四国ブロックにおける

香川県で発生した*Salmonella* Enteritidis食中毒疑事例…………… 153

研究協力者	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
	関 和美	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

l) 愛媛県で分離された腸管出血性大腸菌の分子疫学解析について…………… 158

研究協力者	林 恵子	愛媛県立衛生環境研究所
	松本 純子	愛媛県立衛生環境研究所

m) *Salmonella* Thompson による食中毒事例…………… 162

研究協力者	藤戸 亜紀	高知県衛生研究所
	鍋島 民	高知県衛生研究所
	松本 道明	高知県衛生研究所
	塩田 直青子	高知市保健所
	野中 由紀	高知市保健所
	永安 聖二	高知市保健所
	澤田 満	高知市保健所

(VII) 九州ブロック

a) 九州地区における食品由来感染症調査における分子疫学的手法に関する研究

— IS-printing System データの共有化、九州地区の取り組み — …………… 164

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
	緒方喜久代	大分県衛生環境研究センター
	徳岡 英亮	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
	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
	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

b) 九州地区における食品由来感染症調査における分子疫学的手法に関する研究

— IS-printing System の精度管理 — ..... 172

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
	堀川 和美	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
	緒方喜久代	大分県衛生環境研究センター
	徳岡 英亮	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
	吉野 修司	宮崎県衛生環境研究所
	瀧田 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) IS-printing System の活用により

集団事例の解明・感染拡大防止に寄与した2 事例 ..... 179

研究協力者	緒方喜久代	大分県衛生環境研究センター
	佐々木麻里	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

d) IS-printing およびPFGE 解析により,

牛レバー刺しが原因と推定された腸管出血性大腸菌 0157 食中毒事例 ..... 181

研究協力者	麻生嶋七美	福岡市保健環境研究所
	本田己喜子	福岡市保健環境研究所
	樋脇 弘	福岡市保健環境研究所

e) 感染症発生動向調査（菌株収集）事業で探知した

Salmonella Enteritidis Diffuse outbreak について ..... 184

研究協力者	西 桂子	佐賀県衛生薬業センター
	成瀬佳菜子	佐賀県衛生薬業センター
	甘利祐実子	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
	吉原 琢哉	佐賀県衛生薬業センター
	眞子 純孝	佐賀県衛生薬業センター



## グループ2：ウイルス

(I) ノロウイルスゲノムの分子進化	189		
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	村上 耕介	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
(II) ノロウイルスの病原性に関する研究	193		
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	195		
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	三瀬 敬治	札幌医科大学	
	森 功次	東京都健康安全研究センター	
	入谷 展弘	大阪市立環境科学研究所	
	植木 洋	宮城県保健環境センター	
	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	
	片山 和彦	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) 診断法の開発に生じた課題	202		
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	
	岡 智一郎	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
	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) CaliciWebの運用とリニューアル	207		
研究分担者	三瀬 敬治	札幌医科大学	医療人育成センター
3. 研究成果の刊行に関する一覧表 (平成 23 年度)	209		

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）

平成 23 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：

食品由来感染症を惹起するウイルスや細菌の解析情報は、疫学情報とともに、原因究明や事例拡大を阻止するうえで重要な因子となる。これらの病原体の解析情報を共有化して利用する一手段として、ネットワーク上で病原体のデータベースを利用するシステム、すなわち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を進めた。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。BioNumerics server を利用した PFGE 及び Multilocus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) のデータベースとともに、腸管出血性大腸菌(EHEC)0157 の解析では、IS-printing system(IS 法)による解析結果のデータベース化も始まった。データベースの拡充に向けて、解析手法の精度管理が必須となっている。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 の病原性の研究により、ノロウイルス遺伝子に存在する 3 つの ORF のうち、ORF1 に細胞毒性を有する非構造タンパク質がコードされていることが明らかになった。ヒト腸管感染性ウイルスの遺伝子情報、流行状況を把握するため、これらのウイルス分子疫学情報を網羅手的に取り扱う Web site, CaliciWeb が構築された。本データベースへのアクセスは、国内からよりも海外からのアクセスが多く、すでに使い勝手の良い、ナショナルデータベースとして稼働している。最終年度には、ロタウイルスのデータ加え、下痢症ウイルスの総合データベースとして本格的に稼働する準備が整ってきた。

研究分担者	中嶋 洋（岡山県環境保健センター）
グループ 1：	堀川和美（福岡県保健環境研究所）
清水俊一（北海道立衛生研究所）	伊豫田淳（国立感染症研究所）
甲斐明美（東京都健康安全研究センター）	研究協力者：泉谷秀昌、伊豫田淳（平成
松本昌門（愛知県衛生研究所）	21, 22 年度）、三戸部治郎（感染研）、お
勢戸和子（大阪府公衆衛生研究所）	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 (札幌医科大学医療人育成センター)

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), 原田 誠也 (熊本県保健環境科学研究所), 三好 龍也、内野 清子、吉田 永祥 (堺市衛生研究)、植木 洋 (宮城県保健環境センター)、森 功次 (東京都健康安全研究センター)、入谷 展弘 (大阪市立環境科学研究所)、村上 耕介、ハンスマン・グラント (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) EHEC 0157 の IS 法結果のデータベースに関しては、福岡県及び大阪府で稼働している同システムを基盤として、全国に対応することを目的として細菌第一部のサーバー内にデータベースの設置を行った。d) 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。e) 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 ; 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。構造タンパク質 P-domain の結晶構造解析を行った。河川水中における SaV の存在状況を RT-PCR 法により調査した。また、RT-PCR によって構造タンパク質領域約 2.5 kb を増幅し、塩基配列を決定した。構造タンパク質全長の塩基配列が明らかな 107 株のサポウイルス株を用いて、Kimura 2 parameter method, NJ tree を用いた解析を行った。カリシウ

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、世界的遺伝子データベースである国立DNAデータバンク (DDBJ) から提供される更新ファイルを用いて行った。各種 genotype クラスターのウイルス様中空粒子 (VLPs) の作出を行い、それらを用いたブロードレンジモノクローナル抗体を作出する。このモノクローナル抗体を用いて IC キットを構築した。

(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 23 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、サーバー上に掲示版を設定し情報共有の補助とした。EHEC 0157 の IS 法のデータベース構築に関しては、福岡県及び大阪府で稼働している同システムを基盤として、全国に対応することを目的として細菌第一部のサーバー内にデータベースの設置を行った。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 及び IS 法データベース運用の鍵と考えられる。2011 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。2011 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、1215 株に対して 2011 年に分離された新しいサブタイプとして 502 種類、2010 年に分離されたことのあるサブタイプが 46 種類、その他が 59 種類見いだされた。また、EHEC 026 では、430 株に対して 164 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 16 種類存在したが、そのうち 5 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。同様に 026 では、7 県の散発事例から同一 XbaI パターンがみいだされ、BlnI 消化でもパターンが一致していた。

### 2. 北海道・東北・新潟ブロック

パルスフィールドゲル電気泳動 (以下 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、その精度管理方法の一つとして、北海道・東北・新潟ブロックではプラグのやり取りによる精度管理方法について検討を行い、一定の成果を得ることができた。

今回、PFGE の精度管理として、各協力地研で分離した腸管出血性大腸菌 0157 菌株を使ってプラグを作成し、このプラグを北海道衛研に送付するとともに、各施設において PFGE を行い、その泳動像をメールに

より送付する方法で比較した。送付されたプラグを北海道衛研で酵素処理し泳動した結果と、各地研で酵素処理後泳動した泳動像を比較したところ 4 地研は 90%以上の相同性を得ることができたが、2 地研で粗動性は 90%以下であった。この 2 地研の泳動像は、肉眼的には、バンドは一致しているものの、バンドの照度が強かったり、写真ファイルのサイズが大きいため縮小等の作業で解像度が下がってしまったため相同性が下がった可能性があった。また、プラグの取り間違いと思われる不一致もあった。

プラグを使った精度管理を行う上で、精度管理用プラグの菌量が重要となる。そこで、プラグ作成時の菌量測定方法として、暗視野顕微鏡を使った菌量測定方法について検討を行った。

### 3. 関東・甲・信・静岡ブロック

腸管出血性大腸菌 0157 の共通菌 5 株を用いて、PFGE 解析を行った結果、いずれも良好な泳動像であった。各施設で実施した PFGE 画像をもとにデンドログラム解析を行った。5 株とも、類似度は 90%以上であったが、全ての施設で 100%一致となった株は無かった。写真は非常に鮮明で、バンドの選択も適切に行なわれているのに近似度が低くなってしまふ株がある。何が問題で近似度が低くなるのか、今後検討していかなくてはならない。

共通株 5 株を IS 法で解析した結果、全ての施設で同じコードを得ることができた。IS 法はサンプルの調整容易で、非常に短時間に結果を得ることができるというメリットがあるため、自治体間で結果を比

較する場合は、非常に有効な手段であることが明らかとなった。

新しい分子疫学解析法の 1 つである MLVA 法の導入を行なうために、2010 年分離株について MLVA 法を実施した。しかし、正確に増幅サイズを読み取れない場合や、蛍光強度が強く解析できない検体等があった。サンプルの調整方法など、更に検討が必要である。

### 4. 東海・北陸ブロック

東海・北陸地方 11 地方衛生研究所及び衛生試験所（施設）による 3 株の腸管出血性大腸菌 0157 を用いた PFGE と IS 法の精度管理を実施した。その結果、PFGE に関しては、検体 1 では 11 施設全体の相同性は 93.8%と 3 検体中最も高率であった。検体 2 は 11 施設の泳動図は全体で 88.6%と 3 検体中最も低い相同性であった。検体 3 の 11 施設の泳動図は全体で 92.1%の相同性であった。従って、何れの検体も相同性約 90%とこれまでと同様に良好な結果であった。また、IS 法の精度管理に関しては、11 施設のうち 8 施設では 3 検体全て正しく型別が行われていた。しかし、3 施設では全てのバンドを正しく認識することが出来なかった。これらの原因として 1) 高分子量領域でバンドが濃くスメアーになっていた。2) 低分子領域のバンドが薄く認識できなかった。3) 全くバンドが認められなかった。4) 泳動時間が短いことが考えられた。従って、来年度以降も精度管理を実施し、IS 法のデータベース化のための技術向上を図りたい。

行政への還元に関する調査では平成 23 年 4 月から 12 月までの間に東海・北陸各地研から 3 件の事例報告があった。具体

的には1) 保育所における腸管出血性大腸菌 026 集団感染事例、2) 介護老人福祉施設における腸管出血性大腸菌 0157 集団感染事例、3) 仕出し弁当を原因とする 026 食中毒事例である。またこれ以外に散発下痢症患者由来サルモネラ属菌 (09:-:-) PFGE 解析結果も報告された。

#### 5. 近畿ブロック

EHEC の型別法である IS 法と PFGE 法について、信頼性確保のため精度管理を実施するとともに、EHEC 0157 の流行菌型を迅速に探知できるよう近畿 IS データベースの充実と活用をはかった。EHEC 0157 を用いた IS 法の精度管理は良好な結果が得られたが、EHEC 026 を用いた PFGE 法ではサイズの近いバンドが多く、画像や解析者によってバンド認識のばらつきが大きい結果となった。近畿 IS データベースは、入力項目の追加や絞り込み検索を可能にしたバージョン 2 に改良し、2012 年 2 月 3 日現在の登録数は 1,550 株である。2011 年 7 月～8 月には同一 IS 型を示す株が多発し、各施設に注意喚起と情報提供を呼びかけた。感染源の解明には至らなかったが、PFGE 法の結果からも diffuse outbreak であったと考えられた。MLVA 法については、使用するサイズマーカーが測定値に大きく影響を与えることが明らかになり、施設間で共通の手法として使用するためには、試薬や反応条件の統一が不可欠であると考えられた。

#### 6. 中国四国ブロック

中四国ブロックでは、平成 23 年度に PFGE 法 および IS 法による腸管出血性大

腸菌 (EHEC) 0157 菌株の精度管理を実施した。ほとんどの施設は、両法による解析結果がほぼ一致し良好であったが、一部施設では、PFGE および IS 法の泳動像が不明瞭であった。精度管理は、事例対応において正確で安定した結果を得るために、今後も継続して実施することが必要である。各県で発生した事例に分子疫学手法を応用し、IS 法の解析結果および PFGE 型を含む疫学情報を、中四国ブロックの各施設が共有して、中四国地域の発生状況を把握できるよう試みた。本年度は、メールにより情報を回収したのち、それらをまとめてブロック内の各施設に還元した。発生事例をタイムリーに把握するためには、将来的にデータベースによる疫学情報の管理と、それへの個別のアクセスを可能にすることが必要である。

#### 7. 九州ブロック

九州ブロックでは、平成 23 年度は 1) IS-printing System (ISPS) のデータ共有化システムの構築、および 2) ISPS の精度管理について実施した。さらに、3) 大分県および 4) 福岡市にて発生した腸管出血性大腸菌 0157 (0157) 集団事例における ISPS 応用事例、および 5) 佐賀県で発生したサルモネラ事例のパルスフィールドゲル電気泳動法 (以下、PFGE 法) による分子疫学的手法を応用事例について報告する。平成 23 年度は、本研究の目的である感染症・食中毒の早期探知および二次拡大防止のために、各地方衛生研究所管内の患者および保菌者から分離された 0157 の ISPS 情報のリアルタイムでの共有

化を開始した。その結果、複数自治体に跨る事例の探知がより容易となり、行政に対し速やかな情報提供が可能となった。しかしながら、共有化するためには ISPS 検査結果の正確性および結果判定の統一が不可欠であること、研修および精度管理を継続的に実行していくことが必要であると考えられた。ISPS の精度管理では、九州ブロック 12 施設を対象として、判定困難な「明瞭なエクストラバンド」をもつ 7 株の DNA を参加施設に配布した。その結果、精度管理に使用した 7 株の ISPS 型別は、12 施設のうち 8 施設が期待される結果と異なっていた。原因は、明瞭なエクストラバンドの誤判定、PCR エラー、薄いエクストラバンドの誤判定、アガロースゲル電気泳動におけるバンドの出現位置のズレ、及び、単純入力ミスの 5 項目であった。

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を起こすことから、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。NoV の病原性の研究により、ノロウイルス遺伝子に存在する 3 つの ORF のうち、ORF1 に細胞毒性を有する非構造タンパク質がコードされていることが明らかになった。NoV は、ORF1-2 ジャンクションにあるブレイクポイントを機転にゲノムの組み替えを起こすことが知られている。つまり、NoV は、病原性に関係する ORF1 と抗原性、免疫性に関与する ORF2-3 を、遺伝子組み換えによって入れ替えることで、その性質を劇的に変化させることが明らかになった。さらに、ゲノムの組み換え体（キメラウイルス）は、全長塩基配列の決定された NoV の約 50% に上ることが明らかになり、セグメントゲノムを有する RNA ウイルスのリアソータントの出現頻度に匹敵する進化速度を示すことが明らかになった。

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。

一方で、ヒト腸管感染性ウイルスの遺伝子情報、流行状況を把握するため、これらのウイルス分子疫学情報を網羅手的に取り扱う Web site, CaliciWeb が構築された。CaliciWeb は、ヒト腸管感染性ウイルスの遺伝子情報を、世界 3 大ゲノムデータベース、Genbank, DDBJ, EMBL から、オートパイロットシステムによって収集し、蓄積し

ており、その更新は、毎日行われている。本データベースへのアクセスは、国内からよりも海外からのアクセスが多く、すでに使い勝手の良い、ナショナルデータベースとして稼働している。最終年度には、ロタウイルスのデータ加え、下痢症ウイルスの総合データベースとして本格的に稼働する準備が整ってきた。今後の充実に、力を入れていきたい。

#### D. 考察

食品由来感染症調査においては、疫学情報と原因病原体の正確な解析情報が重要である。本研究では、原因病原体の解析情報を共有するために、解析方法の標準化と解析結果のネットワーク上での共有システムを構築してきた。その結果、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。パルスネットでは、主たる解析方法である PFGE の精度管理が各地方衛生研究所で継続的に実施されており、技術の継承・標準化が行われている。PFGE 解析以外の手法として、EHEC 0157 においては IS 法が汎用され、各ブロック内で IS 法による解析結果のデータベース化が進んできている。そこで、福岡県保健環境研究所及び大阪府公衆衛生研究所の協力のもとに、全国からのアクセスに対応するデータベースを感染研のサーバー内に設置した。データ更新等を含めた管理とともに使いやすさを高めることが課題となる。IS 法のみならず MLVA 等の

利用も進みつつあり、一部機関においてははあるが基礎的解析データの蓄積が行われている。

NoV の病原性の研究により、ノロウイルス遺伝子に存在する 3 つの ORF のうち、ORF1 に細胞毒性を有する非構造タンパク質がコードされていることが明らかになった。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。一方で、ヒト腸管感染性ウイルスの遺伝子情報、流行状況を把握するため、これらのウイルス分子疫学情報を網羅手的に取り扱う Web site, CaliciWeb が構築された。本データベースへのアクセスは、国内からよりも海外からのアクセスが多く、すでに使い勝手の良い、ナショナルデータベースとして稼働している。最終年度には、ロタウイルスのデータ加え、下痢症ウイルスの総合データベースとして本格的に稼働する準備が整ってきた。

#### E. 結論

病原体解析情報のデータベースをネットワーク上で共有・利用することにより、食品由来感染症の探知・感染源究明に利用できるシステムが構築されつつある。ウイルスのカリシウェブ、細菌のパルスネットにおいて、解析情報の正確さを保持するための精度管理と解析情報の更新が継続されている。今後も、分子遺伝学的手法に基づいた病原体解析手法を継続的に評価し



て利用することが、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. Masakado Matsumoto, Masahiro Suzuki, Kaoru Hirose, Reiji Hiramatsu, Hiroko Minagawa, Masaaki Minami, Ichiro Tatsuno, Akira Okamoto, Michio Ohta, Tadao Hasegawa. Variation in M protein production among *Streptococcus pyogenes* strains according to *emm* genotype. *Microbiol Immunol.* 2011; 55: 379-387.
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*. *Curr Microbiol.* 2011; 62: 884-887
3. Masahiro Suzuki, Kazuhiro Yamada, Miki Nagao, Etsuko Aoki, Masakado Matsumoto, Tatsuya Hirayama, Satoshi Ichiyama, Yoshitsugu Yamamoto, Reiji Hiramatsu, Hiroaki Iinuma. Antimicrobial ointments and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300. *Emerg Infect Dis.* 2011 Oct;17(10):1917-20.
4. Kanki M, Seto K, Harada T, Yonogi S, Kumeda Y: Comparison of four enrichment broths for the detection of non-0157 Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* 091, 0103, 0111, 0119, 0121, 0145 and 0165 from pure culture and food samples. *Lett. Appl. Microbiol.* 53: 167-173, 2011.
5. Harada T, Sakata J, Kanki M, Seto K, Taguchi M, Kumeda Y: Molecular epidemiological investigation of a diffuse outbreak caused by *Salmonella enterica* serotype Montevideo isolated in Osaka prefecture, Japan. *Foodborne Pathog. Dis.* 8: 1083-1088, 2011.
6. Iguchi A, Shirai H, Seto K, Ooka T, Ogura Y, Hayashi T, Osawa K, Osawa R: Wide distribution of 0157-antigen biosynthesis gene clusters in *Escherichia coli*. *PLoS ONE* 6: e23250, 2011.
7. Iguchi A, Iyoda S, Seto K, Ohnishi M: Emergence of a Novel Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* O-serogroup Cross-reacting with *Shigella boydii* Type 10. *J. Clin. Microbiol.* 49: 3678-3680, 2011.
8. Murakami K, Suzuki S, Aoki N, Okajima T, Nadano D, Uchida K, Yamashita K, Oka T, Katayama K, Takeda N, Matsuda T. Binding of Norovirus virus-like particles (VLPs) to human intestinal Caco-2 cells and the suppressive effect of pasteurized bovine colostrum on this VLP binding. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry.* 74(3): 541-547. 2010.

9. 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.
10. 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 Res.* vol. 90, 9-16, 2011.
11. Oka, T., Murakami, K., Wakita, T., Katayama, K. Comparative site-directed mutagenesis in the catalytic amino acid triad in calicivirus proteases. *Microbiol Immunol.* Vol. 55, 108-14. 2011.
12. Kitajima, M., Oka, T., Haramoto, E., Phanuwat, C., Takeda, N., Katayama, K., Katayama, H. Genetic diversity of genogroup IV noroviruses in wastewater in Japan. *Letters in applied microbiology.* Vol. 52, 181-4, 2011.
13. Hansman, G. S., Biertumpfel, C., Georgiev, I., McLellan, J. S., Chen, L., Zhou, T., Katayama, K., Kwong, P. D. Crystal structures of GII.10 and GII.12 norovirus protruding domains in complex with histo-blood group antigens reveal details for a potential site of vulnerability. *Journal of virology* vol. 85, 6687-701, 2011.
14. Hansman, G. S., Shahzad-Ul-Hussan, S., McLellan, J. S., Chuang, G. Y., Georgiev, I., Shimoike, T., Katayama, K., Bewley, C. A., Kwong, P. D. Structural basis for norovirus inhibition and fucose mimicry by citrate. *J of Virol.* Vol. 86, 284-92, 2012.
15. Matsuhira, T. Kaji, C. Murakami, S. Maebashi, K. Oka, T. Takeda, N. Katayama, K. Evaluation of four antiseptics using a novel murine norovirus. *Exp Anim.* Vol. 61, 35-40, 2012
16. Hansman G. S., Taylor D. W., McLellan J. S., Smith T. J., Georgiev I., Tame J. R. H., Park Sam-Yong., Yamazaki M., Gondaira F., Miki M., Katayama K., Murata K., Kwong P. D. Structural basis for broad detection of genogroup II noroviruses by a monoclonal antibody that binds to a site occluded in the viral particle. *J. Virol.* published ahead of print 25 Jan. 2012.
17. Y. Someya, H. Shirato, K. Hasegawa, T. Kumasaka and N. Takeda. (2011) Assembly of Homogeneous Norovirus-like Particles Accomplished by Amino Acid Substitution. *J. Gen. Virol.* 92(10), 2320-2323.
18. Yuichi Someya. (2012) From head to toe of the norovirus 3C-like protease. *BioMol. Concepts* (in press)
19. Oka T, Mori K, Iritani N, Harada S, Ueki Y, Iizuka S, Mise K, Murakami K, Wakita T, Katayama K. Human sapovirus classification based on complete capsid

- nucleotide sequences. Arch Virol. 2011 Nov 11. [Epub ahead of print]
20. 田中智之. 消化器症候群 ノロウイルス ウイルス感染症の検査・診断スタンダード 羊土社発行 P129-133, 2011
  21. 勢戸和子: 下痢原性大腸菌の検査. 検査と技術 39: 659-664, 2011.
  22. 寺嶋 淳、伊豫田淳、泉谷秀昌、三戸部治郎、石原明子、大西 真; 腸管出血性大腸菌感染症の最近の動向。食品衛生研究、61、7-15、2011
  23. 寺嶋 淳、伊豫田淳、泉谷秀昌、三戸部治郎、石原明子、大西 真、渡辺治雄; 腸管出血性大腸菌サーベイランス 感染症サーベイランス—その役割と展望 臨床と微生物、38、59-63、2011
  24. 寺嶋 淳; 生食と腸管出血性大腸菌特集 生食のリスク。公衆衛生 76 巻、19-23、2012
  25. 市原祥子、江藤良樹、濱崎光宏、村上光一、竹中重幸、堀川和美: 稀な O 血清群の志賀毒素産生性大腸菌検出における CHROMagar™ STEC の有用性の検討、福岡県保健環境研究所年報第 38 号、62-65、2011.
  26. 市原祥子、竹中重幸、江藤良樹、濱崎光宏、村上光一、堀川和美、泉谷秀昌: Multilocus variable-number tandem-repeat analysis (MLVA) を用いた *Shigella sonnei* のクラスター解析の試み、福岡県保健環境研究所年報第 38 号、85-86、2011
- 2) 学会発表
1. 寺嶋 淳; 最近の腸管出血性大腸菌感染症の動向について 第32回日本食品微生物学会学術総会、東京、2011
  2. Jun Terajima, Sunao Iyoda, Hidemasa Izumiya, Takehito Saitoh, Jiro Mitobe, Tomoko Morita-Ishihara, Makoto Ohnishi, Haruo Watanabe Molecular Epidemiological Investigation of Enterohemorrhagic *E. coli* Isolates in Japan IUMS Sapporo, 2011
  3. 寺嶋 淳、伊豫田淳、泉谷秀昌、三戸部治郎、石原明子、大西 真 2010年の腸管出血性大腸菌感染症の動向について 第15回腸管出血性大腸菌感染症研究会、大阪市、2011
  4. 小西典子、尾畑浩魅、齋木大、門間千枝、仲真晶子、甲斐明美: 多種類の PFGE パターンを示す腸管出血性大腸菌 O157 による Diffuse outbreak について、第 85 回日本感染症学会総会、2011 年、東京.
  5. Masahiro Suzuki, Masakado Matsumoto, Kazuhiro Yamada, Reiji Hiramatsu, Hiroko Minagawa. Evaluation of a novel *Staphylococcus aureus* genotyping called phage open reading frame typing by detecting phage-derived open reading frames, Staphylococcal cassette chromosome *mec*, and genomic islets. IUMS Sapporo, 2011
  6. 勢戸和子、田口真澄、河原隆二、伊豫田淳、寺嶋淳: 大阪府における STEC O157 クレド8の分離状況、第85回日本感染症学会総会、2011年4月、東京
  7. 勢戸和子、神吉政史、原田哲也、田口真澄: 市販食品から分離された志賀毒素産生性大腸菌 (STEC) の性状—ヒト由来株と

の比較, 第50回感染性腸炎研究会、2011年6月, 東京

8. 江藤良樹、市原祥子、堀川和美、大岡唯祐、林哲也、寺嶋淳: 「IS-printing において観察されたエクストラバンドの検討」、第15回腸管出血性大腸菌研究会 2011, 7, 15-16.

9. 市原祥子、江藤良樹、濱崎光宏、竹中重幸、堀川和美: 0157、026、0111 以外の O 群血清型腸管出血性大腸菌における病原遺伝子 特に *aggR* の保有状況について、第15回腸管出血性大腸菌研究会 2011, 7, 15-16.

10. 市原祥子、竹中重幸、江藤良樹、濱崎光宏、村上光一、堀川和美、泉谷秀昌: Multilocus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) を用いた *Shigella sonnei* のクラスター解析の試み、第37回九州衛生環境技術協議会 2011, 10, 6-7.

11. Y. Someya, H. Shirato, A. Kumagai, H. Ito, S. Furukawa, T. Wakita, K. Ishii, H. Narimatsu, and T. Kubota “Structural Basis for recognition of Lewis a antigen by Norovirus” The IUMS 2011 Sapporo Congress, XV International Congress of Virology, Sapporo, Japan 2011年9月

12. K. Higo-Moriguchi, H. Horikoshi-Shirato, Y. Someya, Y. Okuno, Y. Kurosawa, and K. Taniguchi “Isolation of cross-reactive human monoclonal antibodies against human noroviruses” The IUMS 2011 Sapporo Congress, XV International Congress of Virology, Sapporo, Japan 2011年9月

13. Oka T, Hansman GS, Murakami K, Todaka R, Wakita T, Katayama K, sapovirus study group of Japan.

Human sapovirus classification scheme based on pairwise distance analysis of complete capsid nucleotide sequences. IUMS 2011、2011年9月、札幌

14. Tomoyuki Tanaka, Noritoshi Kitamoto, Tomoichiro Oka, Tomoko Nishiguchi, Tatsuya Miyoshi, Kiyoko Uchino, Hisaaki Yoshida, Setsuko Iizuka, Yoshiharu Morino, Yasutaka Yamashita, Seiya Harada, Naokazu Takeda and Kazuhiko Katayama:

Rapid Detection kit For Norovirus and Sapovirus With Specific Monoclonal Antibodies.

The 5<sup>th</sup> China Medicinal Biotech Forum 2011. 11. 7-9, Beijing, China

15. 内野清子、三好龍也、田中智之。感染性胃腸炎 2 症例から分離された Saffold Cardiovirus.

第52回日本臨床ウイルス学会、2011. 6. 津市

#### 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