

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 21～23 年度総合研究報告書

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	215		
研究代表者	寺嶋 淳	国立感染症研究所	細菌第一部

2. 平成 21～23 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

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	224		
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
	(平成 21, 22 年度)		
	伊豫田 淳	国立感染症研究所	細菌第一部
	(平成 23 年度)		
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
	(平成 21, 22 年度)		
	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

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	230	
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	239	
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
	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
	横田 陽子	群馬県衛生環境研究所
	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
	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
	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
	植松 香星	山梨県衛生環境研究所
	大沼 正行	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
	仲真 晶子	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11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) 及び IS printing Systemを用いた腸管出血性大腸菌O157の精度管理、PFGE解析結果の行政への還元、MRSAのPCR型別法POT法の実施…………… 246

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…………… 263

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
	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
	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
	中嶋 智子	京都府保健環境研究所
	木澤 正人	京都市衛生環境研究所
	平野 隆	京都市衛生環境研究所
	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
	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
	宮本 園子	神戸市環境保健研究所
	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
	田辺 純子	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
	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

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…………… 277

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
	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
	樫本 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
	末永 朱美	広島市衛生研究所
	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
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
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
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
関 和美	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
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

(VII) 九州ブロック

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 …………… 298

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
	本田己喜子	福岡市保健環境研究所
	財津 修一	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
	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
	石原 雅行	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
	徳岡 英亮	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
	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
	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
	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
	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

濱崎 光宏	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

グループ2：ウイルス

(I) ノロウイルスゲノムの分子進化	305
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	312
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	314
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	村上 耕介 国立感染症研究所 ウイルス第二部
	(最終年度)
(IV) サポウイルスImmunochromatography (IC) 診断法の開発	319
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	323
研究分担者	三瀬 敬治 札幌医科大学 医療人育成センター
研究協力者	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 21～23 年度)	327

厚生労働科学研究費補助金（新興再興感染症研究事業）

平成 21-23 年度総合研究報告書

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について、主として DNA 解析手法を用いて病原体解析情報を収集し、その情報を共有化するためにネットワーク上のデータベースを構築した。従来から稼働しているパルスネットでは、PFGE 解析の精度管理と原因菌のデータベース化を継続し、BioNumerics server によるオンライン解析システムを構築した。腸管出血性大腸菌 O157 に関しては、MLVA による解析と共に、IS-printing system (ISPS) による解析結果のデータベースを構築した。大腸菌の O 血清群について、2011 年に新たに追加された 6 種類の新規 O 血清群に該当する株の有無を調べた。

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 : 細菌	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)	渡辺治雄 (国立感染症研究所) (平成 21, 22 年)
甲斐明美 (東京都健康安全研究センター)	伊豫田淳 (国立感染症研究所)
松本昌門 (愛知県衛生研究所)	(平成 23 年)
勢戸和子 (大阪府公衆衛生研究所)	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：ウイルス

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）

協力研究者：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）、北元 憲利（兵庫県立大学環境人間学部）、北島正章、片山浩之（東京大学大学院 工学系研究科 都市工学専攻）、原本英司（山梨大学大学院 医学工学総合研究部）、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）、吉田 徹也（長野県環境保全研究所）、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）、高橋 幸三、西口 智子、三好龍也、内野 清子、吉田 永祥、松尾 光子（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、白土 東子、下池 貴志（国立感染症研究所）

A. 研究目的

食品由来感染症の感染源を究明するためには、各地で分離される病原体相互の関

連性について正確な科学的データを集めることが重要である。病原体の DNA 解析に基づいた分子系統解析方法が病原体の個体識別に威力を発揮することから、DNA 解析を基盤とする病原体解析方法を評価・検証して応用し、分離株に関する解析情報を蓄積すること、さらに分離株に関する疫学情報を共有するシステムを構築することが本研究の目的である。

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) BioNumerics server を用いたオンラインによる PFGE データベース構築を行う。c) MLVA による解析を行うとともに IS-printing system の解析結果のデータベースを構築するために、先行実施している、福岡県及び大阪府における ISPS データベースを基盤として、jpulsenet サーバー内に ISPS データベースを設置する。2011 年にデンマークの血清学研究所（Statens Serum Institut: SSI）が新規に定義した、O182-O186 と O1F1 からなる計 6 種類の新規 O 血清群を調べた。これまでに既存の O 血清群に型別されなかった国内分離の EHEC 株のうち、2007 年以降 2011 年までに分離

された 99 株についてこれらの O 血清群に該当するかどうか解析した。

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

2009 年～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。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 か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。BN server によるオンラインシステム (PulseNet Japan: URL <http://jpulsenet.nih.go.jp/>) において、全国 6 ブロックの分担研究者からのアクセスを確立した。EHEC 0157 の ISPS 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。

これまでに既存の O 血清群に型別されなかった国内分離の EHEC 株のうち、2007 年以降 2011 年までに分離された 99 株について新規の O 血清群に該当するかどうか解析した。その結果、集団事例を含む 28 株が血清型 O183:H18 であることが明らかとなり、分離頻度としては O157, O26, O111, O103, O145, O91, O121, O165 について国

内で9番目に多いEHECのO血清群であることが判明した。

2. 北海道・東北・新潟ブロック

北海道・東北・新潟ブロックでは、生菌にかわる精度管理方法としてプラグを送付する方法での精度管理方法を検討した。平成21年度には、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*

BraenderupH9812株（以下SB株）でプラグを作成し、これを北海道衛研に送付して、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。しかし、残り2地研のうち1地研は310.1Kbpのバンドが2本に別れ、他の1地研は、452.7Kbpのバンドがずれていた。この2施設については、保存株の変異が考えられた。平成22年度には、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を行った。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。平成23年度には、各地研で分離された腸管出血性大腸菌を使用してプラグ

を作成しPFGEを行い、また、同時に作成したプラグを北海道衛研に送付しPFGEを行い、それぞれの泳動像を比較する方法で精度管理を実施した。また、精度管理用プラグ作成時の菌量測定方法の検討として、暗視野顕微鏡による菌数測定とMisra法によるコロニー数を比較し、簡易菌数測定法について検討した。

3. 関東・甲・信・静岡ブロック

PFGE解析法の技術レベルを各地研間で一定に保つことを目的として、毎年共通株を用いてPFGE解析を実施し、成績を東京都健康安全研究センターに送付して比較検討した。多くのPFGE画像はシャープなバンドが得られており、良好な泳動像であった。解析ソフトを用い、泳動像の類似度を比較した結果、同じ菌株では、同じクラスターを形成していた。

共通株を用いたIS法（IS-printing system）での解析では、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が容易で、非常に短時間で結果を得ることができるというメリットがある。また、複数の自治体で発生した食中毒事例では、PFGE画像と合わせてISコードを交換することで、迅速に分子疫学解析情報を比較できることが確認された。

次に、MLVA法の導入を行なうために、分離株を用いて検討を開始した。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例等があった。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

平成21年度：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（O157:H7）を用い実施した。その結果、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%）と高率であった。6施設において54株のO157を用いてPCR型別法である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。平成22年度：PFGE解析結果の行政への還元に関する調査：8施設でPFGEの結果が集団事例発生時に行政に還元されていた。黄色ブドウ球菌のPCR型別法であるPOTの実施：6施設で行った検討ではPOT型とエンテロトキシン型及びコアグラゼ型はよく一致し、その解析力はPFGEと同程度と考えられた。さら簡便性、迅速性に関してはPOTの方がPFGEより優っていた。平成23年度：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O157を用いたPFGEとIS printing System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。また、IS printing System 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。

5. 近畿ブロック

EHEC 感染症の原因究明と感染拡大防止に向け、近畿ブロックの地方衛生研究所で実施されている分離株の遺伝子解析法について検討した。EHEC O157の迅速な遺伝子型別法であるIS-printing System (IS) 法については、精度管理の実施により非特異バンドの誤判定が解消され、信頼性を確保できた。さらに、O157の流行菌型を迅速に探知するため、近畿 IS データベースを構築してその充実と活用をはかったところ、diffuse outbreakだけでなく、溶血性尿毒症症候群（HUS）発症率が高いと言われている clade 8の探知にも有用であると考えられた。パルスフィールド・ゲル電気泳動（PFGE）法は、EHEC O157とEHEC O26を用いて精度管理を実施し、異なる10施設で実施した電気泳動画像の解析で、O157は同一菌株が高い近似度を示したが、O26は近似度の低い画像もみられた。PFGE法は汎用性の高い手法であり、O157以外の血清群に使用できるようプロトコールの再確認と電気泳動装置の維持管理が必要である。Multilocus variable-number tandem repeat analysis (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、施設間で共通の分子疫学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ともに、測定機器による差を補正するため、多くの菌株についてデータを蓄積することが求められる。

6. 中国四国ブロック

平成 21 年度は、前年度まで検討してきた IS-printing System による検査法を用いて、中四国地域で分離された腸管出血性大腸菌 0157 株について迅速な疫学解析を行い、感染予防や感染拡大防止に役立てた。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-printing System 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、マイクロチップ電気泳動装置を使用した、IS-printing System の迅速化や MLVA 法への応用を検討した結果、IS-printing System 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。平成 22～23 年度は、PFGE 法 および IS-printing System による腸管出血性大腸菌 0157 菌株の精度管理と、各県で発生した事例においてこれらの分子疫学手法を応用して解析し、その有用性を評価した。精度管理では、各施設とも両方法によりほぼ同様の結果を示し、おおよそ良好であった。IS-printing System は、簡単・迅速な疫学解析ツールとして有用性が確認され、特殊な機器も不要なことから、応用の場が広がるものと考えられる。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-printing System 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。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。一部の県で検討しているシークエンサーを用いた MLVA 法については、特別な機器が必要であるため、今後機器等の整備ができた県を加えながら、順次検討していく予定である。

7. 九州ブロック

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について、九州ブロック 12 地方衛生研究所の参加により、平成 21 年、22 年、および 23 年の 3 年間実施した。本研究では、1) IS-printing System (ISPS) データ共有システムの構築、2) ISPS の精度管理、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 および 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および経過は次のとおりである。1) ISPS のデータ共有システムの構築：平成 21 年度に解析ソフトの開発、22 年度に共有化試行、23 年度から共有化を開始した。これにより、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。2) 精度管理：ISPS 検査技術における質の向上を図った。3) 各機関で遺伝子解析法により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報告を行い、情報を提供した。4) ISPS による遺伝子解析 および *Shigella sonnei* の multilocus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) について研修会を

行い、新規遺伝子検査法導入および整備を行った。

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。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ークポイントを機転にゲノムの組み換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、免疫源性に関与する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

上が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

病原体の解析情報をネットワーク上で共有し、広域で発生する食品由来感染症を迅速に探知し感染源の解明、拡大阻止に利用するシステムを構築することが本研究班の目的である。地研及び感染研を主体と

したネットワークとして、細菌性食中毒に関しては、パルスネット、ウイルス性食中毒に関しては、カリシネットが整備されてきた。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ー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きた。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、担当者へ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。

病原体の解析方法としては、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 の使用が進みつつある。IS-printing system では、福岡県保健環境研究所及び大阪府衛生研究所においてそれぞれのブロックに対応したデータベースが構築されてきたが、最終年度には、両地研の協力のもと、全国からのアクセスに対応するデータベースを感染研サーバー内に設置した。今後の運用等で有効性を検証し改良してゆく予定である。MLVA についても、試験的に実施している機関が増えつつあるので、手法等に関する標準化が必要になるものと考えられる。

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

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。ウイルスや細菌等の病原体解析情報のデータベースをネットワーク上で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なと考えられる。

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

厚生労働科学研究費補助金（新興再興感染症研究事業）

平成 21-23 年度分担研究総合報告書

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
研究分担者	渡辺治雄（平成 21, 22 年度）	国立感染症研究所 細菌第一部
研究分担者	伊豫田 淳（平成 23 年度）	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（平成 21, 22 年度）	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		地方衛生研究所

研究要旨 国立感染症研究所（感染研）に送付された腸管出血性大腸菌（EHEC）等の分離株に対して PFGE 解析を行い結果のデータベース化を継続するとともに、EHEC 0157 の広域分離株や集団発生事例由来株については IS-printing system や Multilocus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) 法での解析を行った。BioNumerics server を用いたデータベース構築を行い、6 ブロックの分担研究者がオンラインでサーバーにアクセスして解析できるシステムを構築した。腸管出血性大腸菌 0157 については、IS-printing system によるデータベースを jpulsenet 上に設置した。0157 の広域分離株において、遺伝学的に同一と考えられる株が存在し、共通な感染源により多数の散発事例を含めた unrecognized outbreak を形成している可能性が示唆された。

A. 研究目的

食品由来感染症の感染源を究明するためには、各地で分離される病原体相互の関連性について正確な科学的データを集めることが重要である。病原体の DNA 解析に基づいた分子系統解析方法が病原体の個体識別に威力を発揮することから、DNA 解析を基盤とする病原体解析方法を評価・検証して応用し、分離株に関する解析情報を蓄積すること、さらに分離株に関する疫学情報を共有するシステムを構築すること

が本研究の目的である。

B. 研究方法

平成 21 年から 23 年に感染研に送付された株に対して、PFGE 解析を行った。PFGE では *Salmonella* Braenderup H9812 株を基準株としてデータベースの構築を継続し、BioNumerics (Applied Maths 社) による系統樹作成、また、これらの結果に基づいた遺伝子型別名の付与を行った。デンドログラムの作成では、クラスター解析を行う方

法として UPGMA (Unweighted pair group method using arithmetic averages) 法を用い、近似度の計算には Dice 係数を使用した。これらの解析結果に対してはデータベース化を行い、新規パターンを示す株が即時に探知できるシステムの構築を継続した。また、全国における分離株の動向を感染研と地研で共有するために、PFGE 解析結果、デンドログラム及び新サブタイプ名については、感染研のサーバーを利用して従来と同様ほぼ 1 ヶ月おきにインターネット上の「PulseNet Japan」で公開し、疫学調査等のための還元資料とした。

「PulseNet Japan」では地研の担当者を対象として ID とパスワードによる管理を行った。広域食中毒事例などへの迅速な対応が必要であると考えられる場合には、本研究班の構成機関を各基点として Internet 経由の PFGE 画像配信を行った。EHEC 0157 の ISPS 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。MLVA に関しては、米国 CDC が中心となって進められている MLVA の標準化に関する validation project で使用された、9 種類の primer を選定し用いた。9 種類の primer は 3 種の蛍光色素（青、緑、黄色）で標識したものであり、既報に基づいて Applied Biosystems 社により作成されたものを使用した。PCR 反応は、GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems 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-3130x1 Genetic Analyzer 及び解析ソフトとして GeneMapper (Applied Biosystems 社) を用いた。

C. 研究結果

2009 年に分離された EHEC 0157 では、1606 株に対して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。2010 年に分離された EHEC 0157 では、1819 株に対して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。2011 年に分離された EHEC 0157 では、1215 株に対して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。

D. 考察

複数の都道府県から分離され PFGE パターンが同一となる EHEC 0157 は、毎年数十種類見出される。2010 年には、TN f93 を示す株が生レバーを原因とする広域食中毒事例から分離されたが、この年には散発事例においても f93 を示す株が多数分離されていた。TN f93 の株は、2011 年にはさらに広域で分離されており、MLVA ではほぼ同一のタイプになり、2010 年分離株と 2011 年分離株は大部分が single locus variant であることが明らかになった。同一クローンではなくとも、極めて類似した EHEC 0157 が長期間に出現することから、このような EHEC の恒常的な供給源が存在すると考えられ、広域流行株の出現阻止に向けて、感染源の解明と EHEC 拡散の予防対策が必要である。

E. 結論

複数年度にわたり広域から分離され PFGE パターンが同一の EHEC 0157 が存在す

ことが明らかになった。さらに、これらの広域流行株では、MLVA でも同一タイプの極めて均一性の高い株とわずかではあるが MLVA タイプの異なる変異株があった。いずれの株も遺伝子構成は極めて類似していることから、これらは散発事例由来株を含めた規模の大きな集団発生を形成していた可能性が示唆された。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. 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* 0157 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. 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.
4. 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
 5. 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
 6. 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
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. 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
 3. 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
 4. 寺嶋 淳、伊豫田淳、泉谷秀昌、三戸部治郎、石原明子、渡辺治雄：最近の腸管出血性大腸菌感染症の動向について。第82回日本細菌学会総会、名古屋、2009
 5. 伊豫田 淳、本田尚子、山本章治、寺嶋 淳、渡辺治雄：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、渡辺治雄、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、石原明子、渡辺治雄：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O157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O26及びO111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. 寺嶋 淳 食中毒事件の原因究明やデファイユ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
11. 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
12. 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
13. 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
14. 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
15. 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
16. 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
17. 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
18. 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
19. 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
20. 寺嶋 淳、伊豫田淳、泉谷秀昌、三戸部治郎、石原朋子、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