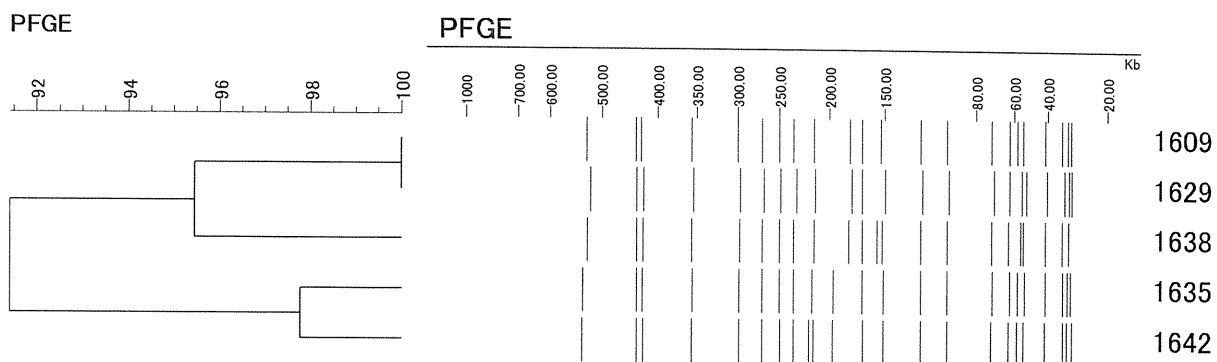
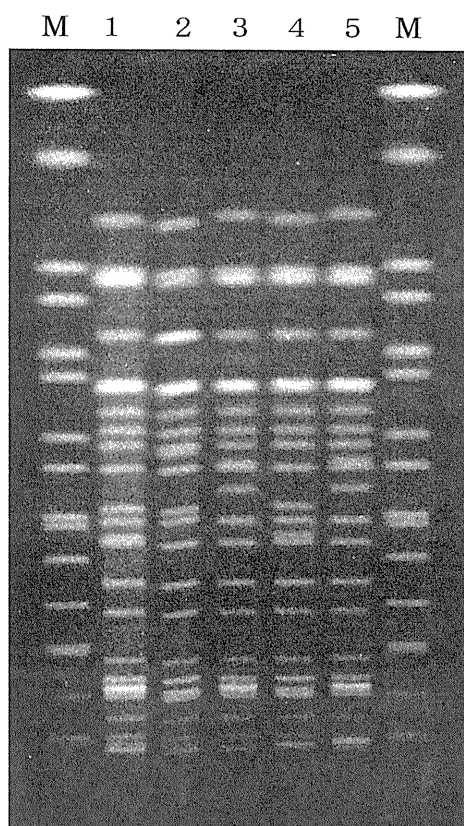


図3 精度管理菌株の PFGE 法による遺伝子解析結果(平成 23 年度)



(A)



レーン 1 : 1609

2 : 1629

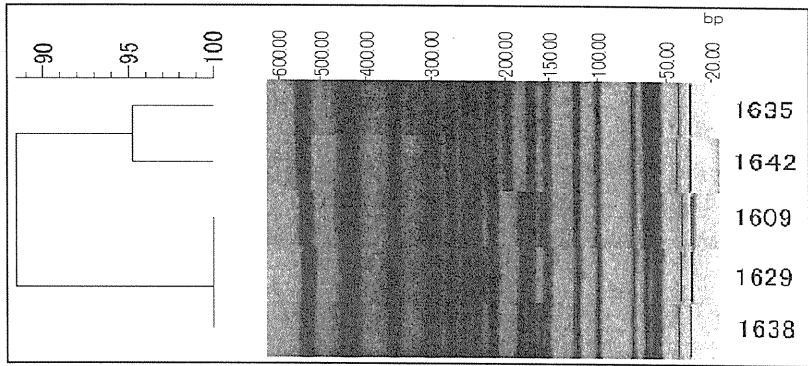
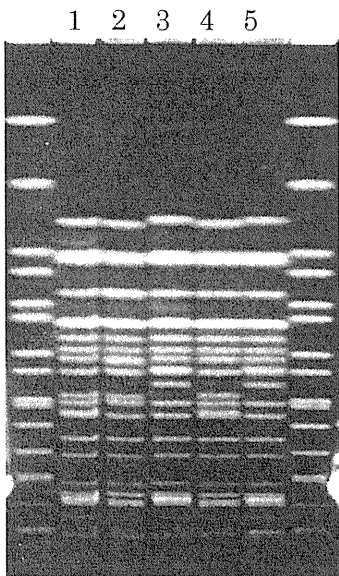
3 : 1635

4 : 1638

5 : 1642

M : マーカー (Salmonella Braenderup H9812 株)

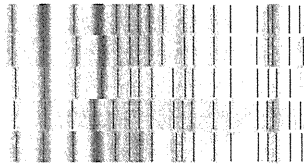
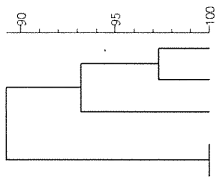
(B)



レーン 1 : 1609
2 : 1629
3 : 1635
4 : 1638
5 : 1642

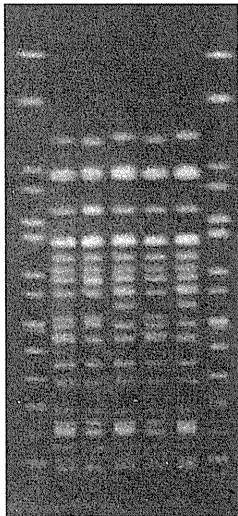
(C)

Dice (Tol 1.0%-1.0%) (H:0.0% S:0.0%) [0.0%-100.0%]
marker_XbaI marker_XbaI



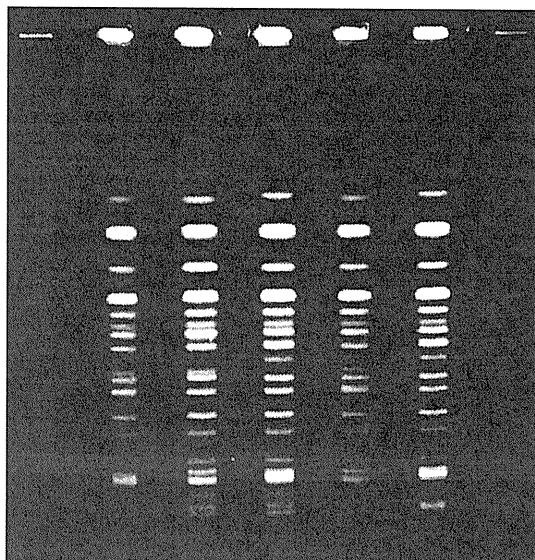
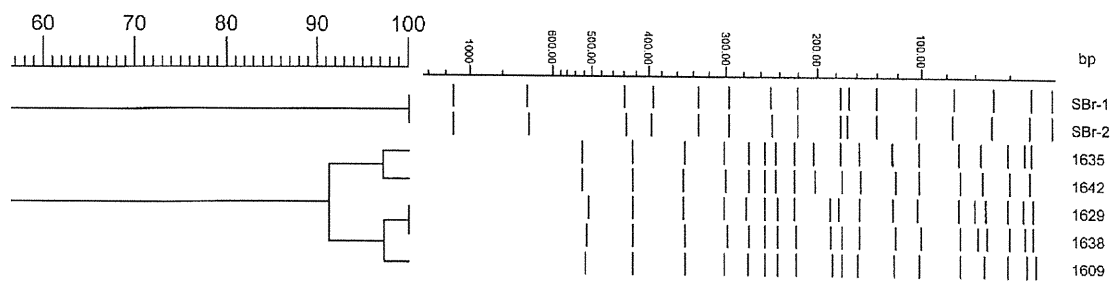
H23パルス精度管理 1635 O157:H7 XbaI VT1.2
H23パルス精度管理 1642 O157:H7 XbaI VT1.2
H23パルス精度管理 1638 O157:H7 XbaI VT1.2
H23パルス精度管理 1609 O157:H7 XbaI VT1.2
H23パルス精度管理 1629 O157:H7 XbaI VT1.2

1 2 3 4 5

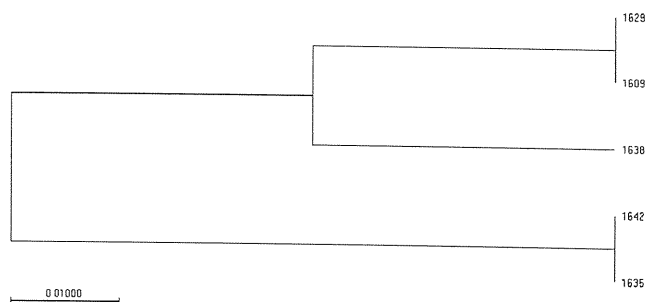
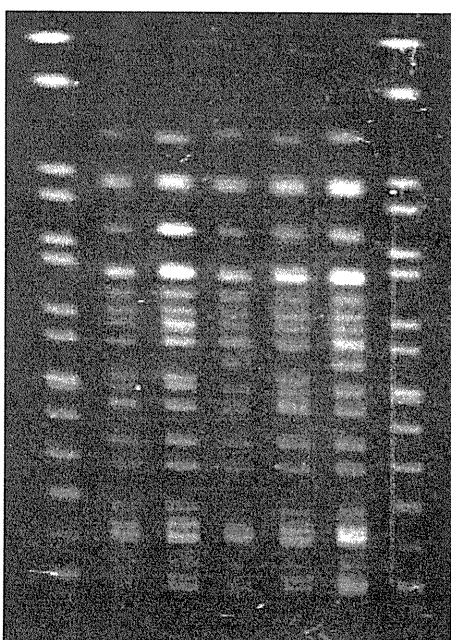


レーン 1 : 1609
2 : 1629
3 : 1635
4 : 1638
5 : 1642

(D)

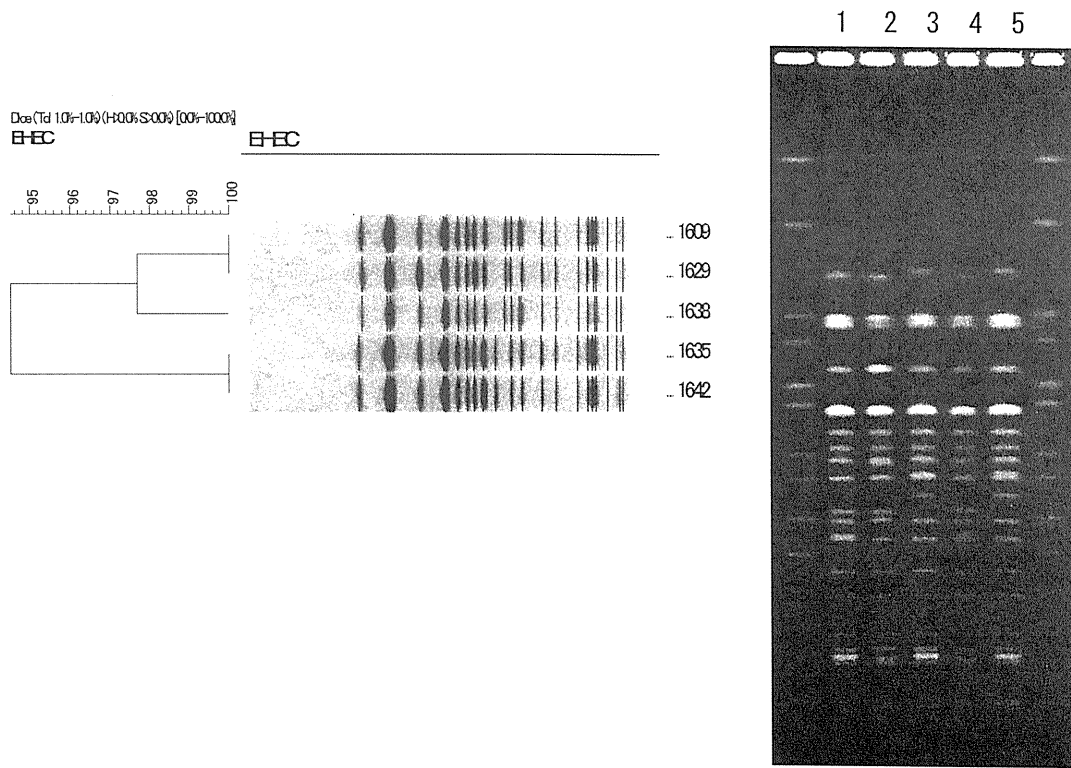


(E)

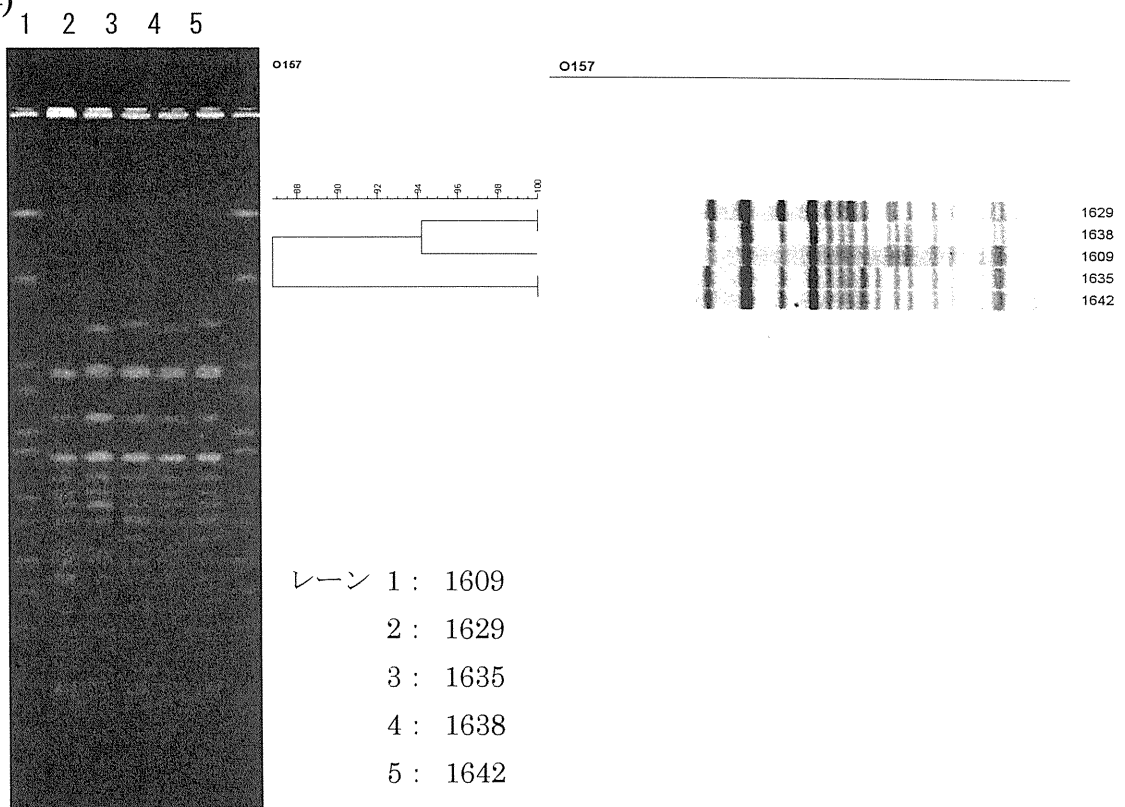


レーン 1 : 1609
2 : 1629
3 : 1635
4 : 1638
5 : 1642

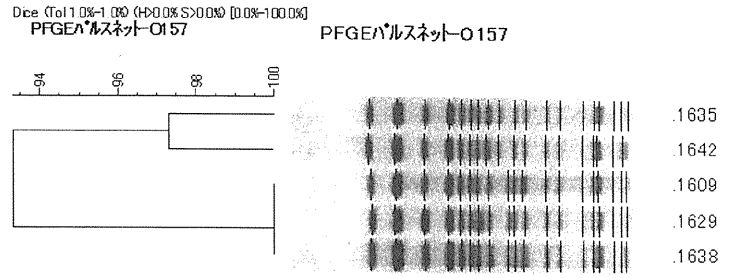
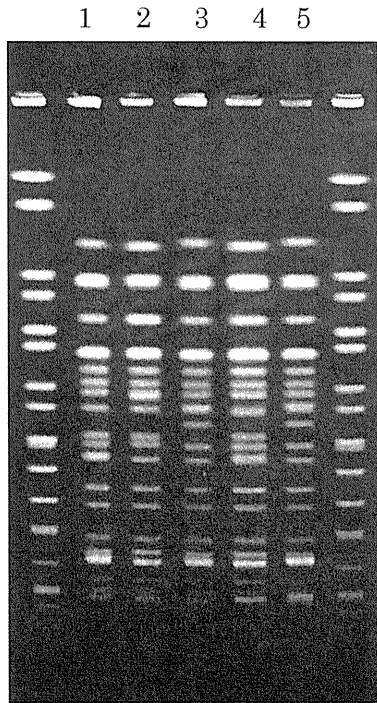
(F)



(G)

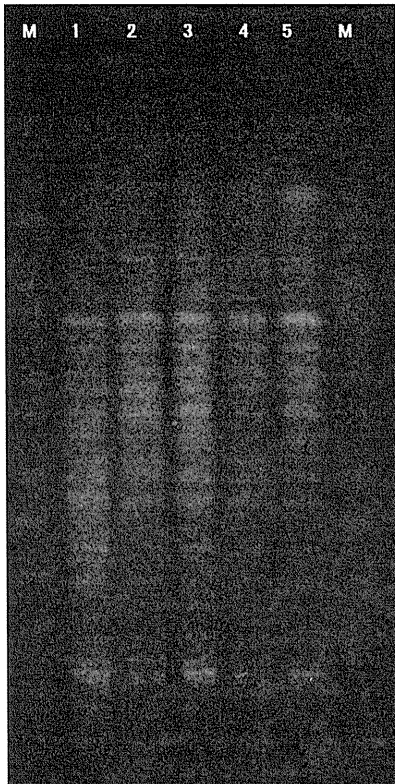


(H)



レーン 1 : 1609
2 : 1629
3 : 1635
4 : 1638
5 : 1642

(I)



レーン 1 : 1609
2 : 1629
3 : 1635
4 : 1638
5 : 1642

表4 各施設のデンドログラムによるPFGEパターンの解析結果とPFGE型

施設記号	PFGEパターンが一致した菌株No				
	1609	1629	1638	1635	1642
A	●	●			
B	●	●	●		
C	●	●			
D		●	●		
E	●	●		◎	◎
F	●	●		◎	◎
G		●	●	◎	◎
H	●	●	●		
感染研PFGE型	g120	d342	g163	g161	g159

* ●、◎:PFGEパターンが同じ印同士で一致した。

図4 精度管理菌株の IS-printing System による遺伝子解析結果(平成 23 年度)
IS-printing System 電気泳動像の比較

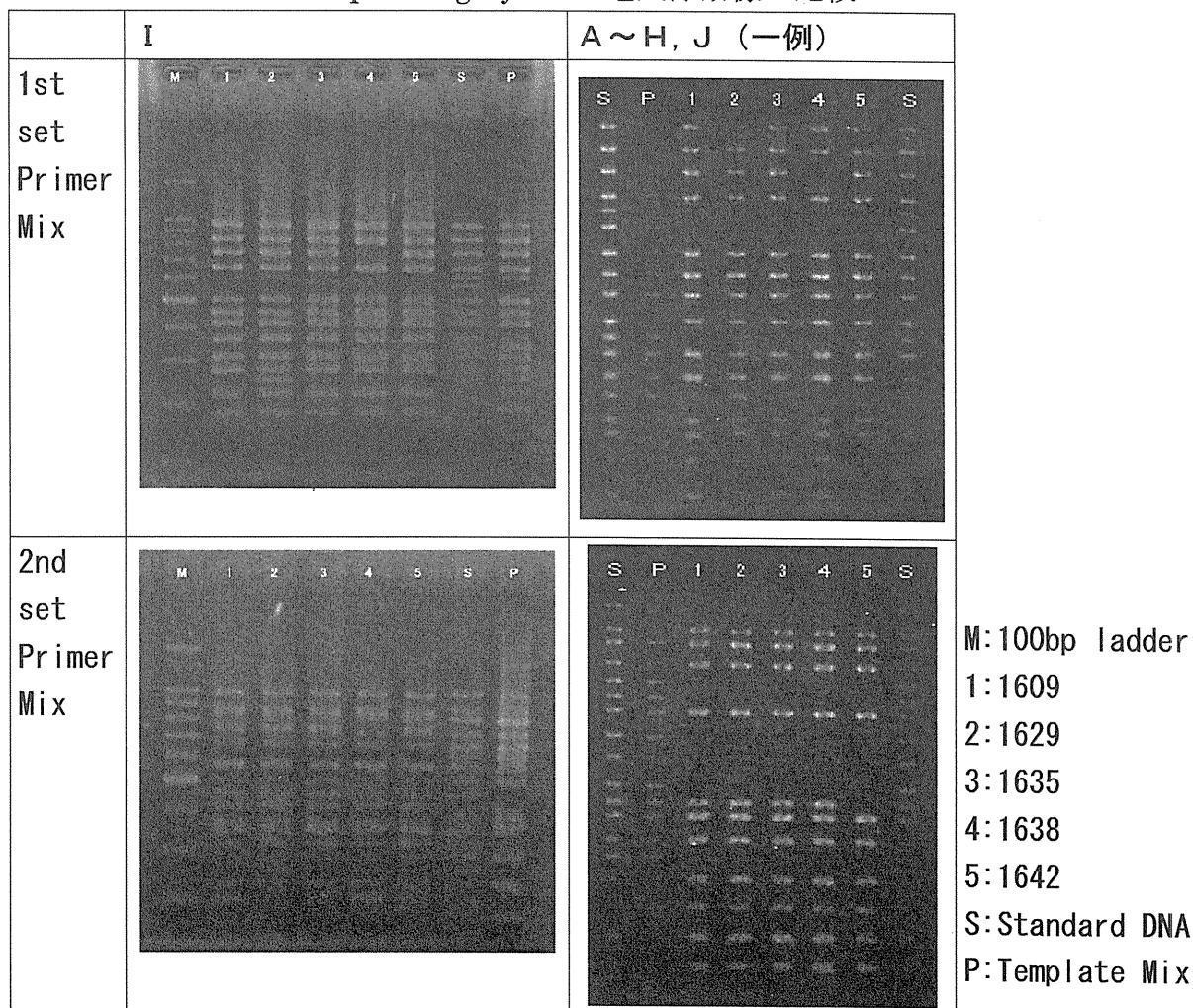


表5 各施設のIS-printing System結果

菌株No		1609																	
1st code		1-01	1-02	1-03	1-04	1-05	1-06	1-07	1-08	1-09	1-10	1-11	1-12	1-13	1-14	1-15	eae	1-16	hlyA
1施設	717552	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-
他施設	717557	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-
2nd code		2-01	2-02	2-03	2-04	2-05	2-06	2-07	2-08	2-09	2-10	2-11	2-12	2-13	2-14	2-15	2-16	stx2	stx1
1施設	737737	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
他施設	611657	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+

菌株No		1629																	
1st code		1-01	1-02	1-03	1-04	1-05	1-06	1-07	1-08	1-09	1-10	1-11	1-12	1-13	1-14	1-15	eae	1-16	hlyA
1施設	717552	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-
他施設	717557	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-
2nd code		2-01	2-02	2-03	2-04	2-05	2-06	2-07	2-08	2-09	2-10	2-11	2-12	2-13	2-14	2-15	2-16	stx2	stx1
1施設	737777	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
他施設	611657	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+

菌株No		1635																	
1st code		1-01	1-02	1-03	1-04	1-05	1-06	1-07	1-08	1-09	1-10	1-11	1-12	1-13	1-14	1-15	eae	1-16	hlyA
1施設	717552	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-
他施設	717557	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-
2nd code		2-01	2-02	2-03	2-04	2-05	2-06	2-07	2-08	2-09	2-10	2-11	2-12	2-13	2-14	2-15	2-16	stx2	stx1
1施設	737737	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
他施設	611657	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+

菌株No		1638																	
1st code		1-01	1-02	1-03	1-04	1-05	1-06	1-07	1-08	1-09	1-10	1-11	1-12	1-13	1-14	1-15	eae	1-16	hlyA
1施設	317552	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-
他施設	317557	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-
2nd code		2-01	2-02	2-03	2-04	2-05	2-06	2-07	2-08	2-09	2-10	2-11	2-12	2-13	2-14	2-15	2-16	stx2	stx1
1施設	737737	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
他施設	611657	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+

菌株No		1642																	
1st code		1-01	1-02	1-03	1-04	1-05	1-06	1-07	1-08	1-09	1-10	1-11	1-12	1-13	1-14	1-15	eae	1-16	hlyA
1施設	717552	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-
他施設	717557	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-
2nd code		2-01	2-02	2-03	2-04	2-05	2-06	2-07	2-08	2-09	2-10	2-11	2-12	2-13	2-14	2-15	2-16	stx2	stx1
1施設	737737	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
他施設	611457	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+

表6 中四国地域の県別患者等由来EHEC O157株数

県名	分離株数
島根	8
岡山	25
広島県	30
広島市	18
山口	17
徳島	10
香川	5
愛媛	12
高知	2
計	127

表7 中四国地域の患者等由来EHEC O157のISコード一覧

ISコード(1st)	ISコード(2nd)	株数
012057	214442	4
012057	214443	2
013057	214443	2
101457	310457	1
104057	303403	1
106577	201657	1
113577	600657	1
114057	303443	1
115057	303443	2
117175	201757	1
117175	601547	1
117177	201757	1
145047	303442	1
155047	341446	1
155047	343443	2
175247	303445	1
300457	110406	1
305057	311443	1
305457	611242	1
305457	611642	1
307575	211757	1
311057	310457	1
311557	710413	1
312577	610657	2
313575	610655	1
317477	611755	1
317477	611756	2
317557	611657	4
317575	611756	1
317575	611757	1
317577	211757	4
317577	611755	1
317577	611756	2
317577	611757	3
345057	311652	7
345457	311652	5
517557	601657	1
613571	610446	1
613575	610446	5
613577	610646	2
615457	311656	1
617575	231547	1
713557	610457	1
715577	611257	1
717557	611457	1
717557	611653	5
717557	611657	15
717575	611657	9
717577	251457	2
717577	611653	1
717577	611657	17
ISコード計:	51種類	127

表8 中四国地域で患者等から多数分離されたEHEC O157のISコード

ISコード(1st)	ISコード(2nd)	発生月	分離県	株数
613575	610446	7~8	C	1
			D	1
			G	3
717557	611657	7~9	A	2
			B	1
			C	3
			E	6
			F	2
			G	1
717575	611657	7~10	A	3
			B	4
			C	1
			H	1
717577	611657	6~9	A	2
			B	13
			C	1
			I	1

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)

分担研究報告書

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

(平成 21 年度～23 年度 総括)

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、本田己喜子、財津修一 寺西泰司、久保田勉 西 桂子 右田雄二、石原雅行 江原裕子 徳岡英亮、松本一俊 杉谷和加奈 緒方喜久代 河野喜美子、吉野修司 濱田まどか、上野伸広 久高潤 大岡唯祐 ¹ 、林 哲也 ^{1,2} 江藤良樹、市原祥子、小野塚大介 濱崎光宏、村上光一、竹中重幸	福岡市保健環境研究所 北九州市環境科学研究所 佐賀県衛生薬業センター 長崎県環境保健研究センター 長崎市保健環境試験所 熊本県保健環境科学研究所 熊本市環境総合研究所 大分県衛生環境研究センター 宮崎県衛生環境研究所 鹿児島県環境保健センター 沖縄県衛生環境研究所 宮崎大学・医学部 ¹ 、フロンティア ² 福岡県保健環境研究所

研究要旨

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。

A. 研究目的

パルスフィールド・ゲル電気泳動(PFGE)法による遺伝子解析は、病原細菌の疫学調査に有用な手段である。しかし、プラグに含まれる DNA 量や電気泳動の環境温度などの要因によって泳動毎に泳動像が僅かに異なるため、DNA パターンを比較するには、「安定した PFGE マーカーの供給、良好な泳動および画像の保存」などが必須である。また、PFGE は解析結果を得るまでに最短 3 日以上を要し、迅速性に欠ける。これらの理由から、迅速・簡便な遺伝子解析法の開発が望まれていた。腸管出血性大腸菌 O157(O157)については、2009 年に宮崎大学医学部林教授のグループにより、O157 株のゲノム構造多型を利用した株識別システム、IS-printing System (ISPS)が報告された¹⁾。この手法は、迅速かつ簡便であり、また、容易に結果を数値化することが可能であった。

そこで、九州ブロックでは、ISPS の結果を地方衛生研究所(地研)間で共有することで、広域に発生している O157 食中毒事例をリアルタイムに探知できると考え、データ共有システムの構築に取り組んだ。

その他に、各地研内で発生した食中毒および感染症事例について報告を行い、今後の対応策の参考とした。さらに、将来的に導入・整備すべき新規遺伝子解析法について、専門家による研修会を開催し、技術の習得・研鑽することを図った(表 1)。

B. 研究方法

1. ISPS のデータ共有システムの構築

(1) ISPS の有用性についての検討

[平成 21 年度]

ISPS 結果をデジタル化するためには、統一した方法が必要であるため、解析ソフトを開発した。本解析ソフトは Excel の Visual Basic for Applications (VBA)を用いて作成した。36 種の標的遺伝子によって得られた PCR 増幅の有無を 1、0 の 2 進数で表現し、さらに 10 進数に変換して 11 桁の整数

(ISPS code)に数値化するものである。また、本ソフトには、ISPS パターンの解析(相同性、相違性が数値により表示される)、クラスター解析(NJ tree)、バンドパターン入力支援機能およびフィルター機能が付加されている。そこで、本ソフトを各地研に配布し、その使用性、操作性および有効性について検討した。

ISPS の有用性の検討には、各地研で得られた ISPS code と感染症研究所(感染研)で実施された PFGE サブタイプを用いて解析した。

(2) ISPS のデータ共有化に関する試行

[平成 22 年度]

ISPS データを九州管内で共有することについては、行政への説明および文書による手続きを踏み、登録を試みた。なお、登録は、ホームページ上に構築した共有データベースを用いた。本システムの利用は、ホームページ上に作成したデータベースにインターネットを経由して各地研から直接行うものである。抛って、ユーザーID とパスワードにより管理し、関係者のみの登録・閲覧とした。さらに登録内容には個人情報を含まないよう配慮した。

(3) ISPS データ共有システムの運用

[平成 23 年度]

菌株の入手後、速やかに ISPS 結果を登録するよう努めた。

2. ISPS の精度管理

精度管理に使用した O157 は、平成 21 年度 4 株、22 年度 4 株および 23 年度 7 株、計 15 株である。ISPS に使用する DNA は、同一サンプルを小分けして、各地研に配布した。

3. 食中毒および感染性胃腸炎事例の検討

平成 21 年度から 23 年度の 3 ヶ年に、九州地区地研管内で発生した食中毒および感染症事例について、ISPS あるいは PFGE を用い、原因究明がなされた事例について、報告した。

4. 新規遺伝子検査法の整備

研究期間において、研修会を2回開催した。

C. 研究結果

1. ISPS のデータ共有システムの構築

(1) ISPS の有用性についての検討

[平成 21 年度]

ISPS 解析ソフトは、多様な利用者によって利用した結果、使用性および操作性において問題はなかった。各地研管内で発生した事例の解析にも有用であると評価された。平成 21 年度に分離された 311 株は、ISPS で 74 種の ISPS code に、PFGE では 158 パターンに分けられた。ISPS は、PFGE とは原理が全く異なる手法であることから、単純に両者の比較はできないが、検討の結果、ISPS の識別能力は、PFGE の半分程度であった。しかしながら、ISPS は迅速性に優れ、数値化による結果の共有が容易に行える利点があり、PFGE では困難であった迅速な情報共有ができる可能性があることが分かった。

(2) ISPS のデータ共有化に関する試行

[平成 22 年度]

インターネット経由で ISPS データ共有システムに、各地研から直接、平成 22 年度に分離された 280 株の ISPS 情報の登録がなされ、問題なく登録できることを確認した。登録された O157 の ISPS 情報は、72 種の ISPS code に分けられた。このうち、20 種は、複数の施設から報告され、情報(分離日・発症日・備考など)を元に、関連性を精査した。その結果、複数の地研に跨る事例の関連性が強く疑われた。しかし、事後の登録であり、関連性を特定するには至らなかった。事例の早期探知のためには、リアルタイムな登録が不可欠であると考えられた。

(3) ISPS データ共有システムの運用

[平成 23 年度]

各地研で分離された患者および保菌者由来の ISPS 情報についてリアルタイムな登録を開始した。その結果、複数自治体に跨る事例の早期探知がより容易となり、行政に対し速やかに二次拡大防止

に繋がる情報提供が可能となった。

2. ISPS の精度管理

表 2 に 3 年間の精度管理の概要とその結果を示した。最終年度は難易度が高く、正解率が低かったが、ISPS の問題点を明確にでき、技術の向上に繋がった。

【平成 21 年度】

精度管理の結果、12 地研のうち、エクストラバンドによる読み違いが 1 地研、PCR エラーにより期待する増幅産物が検出できなかった事例が 1 地研で認められた。この 2 点についての対策として、地研内におけるバンド判定方法の工夫および PCR 機器の点検が必要と考えられた。一方で、ISPS キットに含まれる primer の一部は改善が必要と考えられ、製造元に情報を提供した。

【平成 22 年度】

12 地研のうち 4 地研が期待される結果と異なっていた。結果の異なった原因については、① PCR エラー、② エクストラバンドによる誤判定、③ 単純入力ミスであった。①の解決策は、原因が PCR 機器本体、使用器材などであることから、平素から標準 DNA を用いた内部精度管理の実施が必要であることが判明した。②および③については、実験者の慎重な確認を促すとともに、ISPS 解析ソフトに付加された「バンド確認システム」の利用により、回避できるものと考えられた。

【平成 23 年度】

12 地研のうち 8 地研が期待される結果と異なっていた。結果の異なった原因は、① 明瞭なエクストラバンドによる誤判定、② PCR エラーによる誤判定、③ 薄いエクストラバンドによる誤判定、④ PCR 増幅産物の DNA 量が濃すぎる為に起きた誤判定、⑤ 単純入力ミス であった。難易度の高い問題であったが、正解率が 100%であった 4 地研では、泳動時間が 90 分以上であった。このことから、紛らわしい明瞭なエクストラバンドが観察される試料の誤判定を防ぐためには、可能な限り泳動時間を長くすることが有効だと思われた。また、誤解答のあ

った地研では、電気泳動のバンドが太く、また、スメアである地研が見られたことから、誤判定を最小限に抑えるためには、増幅産物の泳動量の調整（例えば、希釈）など行い、電気泳動像をより鮮明にすることや、2～4 レーンごとに陽性コントロールを置くなどの工夫が必要であると考えられた。さらに、判定する際には、明瞭なエクストラバンドが稀に出現することを、常に意識し慎重に判定することが重要であることが再認識された。

3. 食中毒および感染性胃腸炎事例の検討

平成 21 年度から 23 年度の 3 ヶ年間における事例検討は、表 3 に示す 9 事例であった。うち 6 事例（②、③、④、⑥、⑦および⑧）は、ISPS によって迅速に原因究明がなされた事例であった。O157 による他 1 事例（①）は、同一施設を利用した患者 10 名由来株について、PFGE および ISPS を実施し、PFGE ではバンド 1 本から 3 本違いであるが ISPS code は同一であった。行政的には牛生レバーが共通食であることおよびその他疫学情報から食中毒事例として対応され、ISPS が有用であると示唆される報告であった。その他 2 事例、腸管出血性大腸菌 O26 の保育園での事例（⑤）および *Salmonella* Enteritidis Diffuse outbreak（⑨）事例は、PFGE により原因究明がなされた。O26 の事例（⑤）では、保育所にて園児に提供された給食保存食および原材料（レタス）から患者と同じ PFGE パターンの O26 が検出された興味深い事例であった。*Salmonella* Enteritidis Diffuse outbreak 事例（⑨）では、PFGE および *Salmonella* Enteritidis ファージ型別試験結果から、同時期に散発的に複数発生した事例の原因は同一菓子店から提供された製品であることが究明された。

4. 新規遺伝子検査法の整備

新規遺伝子解析法の整備・導入のため、平成 21 年度および 22 年度に、それぞれ「ISPS による遺伝子解析」および「*Shigella sonnei* の MLVA」に関する研修を実施した（表 4）。これらの研修により、

各地研の新規遺伝子検査法の理解および整備の足掛かりとなった。

D. 考察

九州ブロックではインターネットを經由して ISPS データを共有するシステムを構築した。その結果、各地研において、自他の O157 発生动向を参照することが可能となった。しかしながら、本システムを有効に活用するためには、ISPS code および関連情報をリアルタイムに登録することが必要である。一方で、ISPS は PCR や増幅産物のサイズ判定が正確に行われることが前提であり、同一サンプルによる外部精度管理、施設内での内部精度管理を恒常的に実施し、検査の質を一定水準に担保しなければならない。

しかし、食肉をはじめとする O157 の原因食品の流通は全国規模であるため、ブロック単位に留まらず、全国的な ISPS データ共有システムの構築が喫緊の課題と考えられた。

E. まとめ

九州ブロックでは、O157 の早期探知および二次拡大防止のため、ISPS データ共有システムを構築した。本システムを有効に活用するためには、ISPS code および関連情報をリアルタイムに登録することが必要である。さらには、全国的な ISPS データ共有システムの構築が不可欠であり、実現のためには、次の要件が必要と考えられた。

1. ISPS code の全国統一
2. ISPS の定期的な精度管理の実施
3. ISPS の定期的な研修の実施

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.

- 2) 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.
 - 3) 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.
2. 学会発表
- 1) 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).
 - 2) 江藤良樹、九州ブロックパルスネット研究協力者、堀川和美、寺嶋 淳、「腸管出血性大腸菌 O157 事例における **IS-printing** の応用」、第 31 回全国衛生微生物協議会 (2010.5.25-26).
 - 3) 市原祥子、江藤良樹、濱崎光宏、村上光一、竹中重幸、小野塚大介、堀川和美、福岡県で分離された腸管出血性大腸菌 O157 の **stx** 型について、第 14 回腸管出血性大腸菌感染症研究会、(2010.7.22-23).
 - 4) 江藤良樹、千々和勝己、堀川和美、筒井博之、腸管出血性大腸菌 O157 による集団発生病事例における **IS-printing** の有用性、第 69 回日本公衆衛生学会、(2010.10.28-29).
 - 5) 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).
 - 6) 市原祥子、江藤良樹、濱崎光宏、竹中重幸、堀川和美: O157、O26、O111 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).
 - 7) 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).
- G. 文献
- 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, and Hayashi T: Development of a multiplex PCR-based rapid typing method for enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 strains. *J Clin Microbiol.* 2009, 47:2888-94.

表 1. 研究報告

年度	解析法
平成 21 年度	1. IS-printing System の分子疫学的解析法としての有用性について 2. IS-printing System の精度管理 3. 事例報告 4. 新規遺伝子技術研修
平成 22 年度	1. 九州地区で分離された O157 菌株の IS-printing System による MST 解析 2. IS-printing System の精度管理 3. 事例報告 4. 新規遺伝子技術研修
平成 23 年度	1. IS-printing System データの共有化、九州地区の取り組み 2. IS-printing System の精度管理 3. 事例報告

表 2. ISPS の精度管理の概要と結果

年度	O157 菌株名	ISPS code	正解地研数
H21	1 sakai strain_RIMD0509952	66462677967	11
	2 FIHES09E036	12887773320	11
	3 FIHES09E116	56643812046	10
	4 FIHES09E036	65012745593	10
	全問正解地研数	9 地研	
H22	A FIHES01E023	25839632392	10
	B FIHES02E045	66462612431	11
	C FIHES08E110	65012745585	11
	D FIHES09E128	66630959361	7
	全問正解地研数	7 地研	
H23	① FIHES04E053	57733536074	6
	② FIHES06E032	27384601163	9
	③ FIHES02E024	66322101185	10
	④ FIHES97E8-1	30418917704	7
	⑤ FIHES04E116	40551307593	8
	⑥ FIHES10E134	25789717323	11
	⑦ FIHES03E030	18792830979	5
全問正解地研数	4 地研		

表 3. 事例報告

平成 21 年度 5 事例			
No.	事例名	衛生研究所	発表者
①	平成 21 年 5 月に発生した腸管出血性大腸菌感染 O157:H7 (VT1&2 陽性) を原因とする食中毒事件について	北九州市環境科学研究所 北九州市保健所保健予防課 北九州市保健所東部生活衛生課	久保田 勉、清水寧、村瀬浩太郎、下原悦子 境 美津枝、永富あかね、小川真由美、佐藤 優 刀根誠一、北村尚男、太田宏一、稲富秀敏
②	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	大分県衛生環境研究センター	緒方喜久代 若松正人 成松浩志
③	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	福岡県保健環境研究所 福岡県保健医療介護部保健衛生課 福岡県嘉穂・鞍手保健福祉環境事務所	濱崎光宏、江藤良樹、市原祥子、村上光一、竹中重幸、堀川和美 石田一義 梅崎由佳、甲斐田美菜
④	保育園で発生した腸管出血性大腸菌 O157 集団感染事例	福岡市保健環境研究所	尾崎延芳、財津修一、樋脇弘
⑤	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	佐賀県衛生薬業センター 唐津保健福祉事務所	西 桂子、諸石早苗、福富由美子、増本 久人 角 典子、野田日登美、川内保典
平成 22 年度 1 事例			
No.	事例名	衛生研究所	発表者
⑥	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	熊本県保健環境科学研究所	徳岡英亮 古川真斗 松本一俊 原田誠也
平成 23 年度 3 事例			
No.	事例名	衛生研究所	発表者
⑦	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	大分県衛生環境研究センター	緒方喜久代、佐々木麻里、成松浩志
⑧	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 O157 食中毒事例	福岡市保健環境研究所	麻生嶋七美、本田己喜子、樋脇弘
⑨	感染症発生動向調査(菌株収集)事業で探知した <i>Salmonella Enteritidis</i> Diffuse outbreak について	佐賀県衛生薬業センター	西桂子、成瀬佳菜子、甘利祐実子、諸石早苗、吉原琢哉、眞子純孝

表 4. 新規遺伝子解析法の解析

研修内容	講師	開催年月日	開催場所
腸管出血性大腸菌感染症の動向 IS-printing system による遺伝子解析	伊豫田淳(国立感染症研究所・細菌第一部) 大岡唯祐(宮崎大学・医学部・医学科)	平成 22 年 2 月 12 日、13 日	熊本市環境総合研究所
<i>Shigella sonnei</i> の multilocus variable-number tandem repeat analysis (MLVA)	泉谷秀昌(国立感染症研究所・細菌第一部)	平成 23 年 2 月 3 日、4 日	福岡県保健環境研究所

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

ノロウイルスゲノムの分子進化

研究分担者	片山 和彦	国立感染症研究所	ウイルス第 2 部
研究協力者	村上 耕介	国立感染症研究所	ウイルス第 2 部
研究協力者	ハンスマン・グラント	国立感染症研究所	ウイルス第 2 部

要旨：ノロウイルス (Norovirus; NoV) は、冬季非細菌性胃腸炎や冬季非細菌性集団症中毒の主因ウイルスとして知られている。本研究で以下の事項が明らかになった。NoV におけるゲノムの組換えは、非構造蛋白質領域 (ORF1) 構造蛋白質領域 (ORF23) とのジャンクション領域をブレイクポイントとして高頻度で起きている。ORF1 は細胞のタンパク質輸送を止める作用のあるタンパク質をコードしており、ウイルスの病原性に関与する。ORF2-3 は粒子を構成する構造タンパク質をコードしており、レセプターとの結合、抗原性に関与する。NoV のゲノム組換えは、NoV の病原性と抗原性を劇的に変化させており、毎年繰り返される NoV の流行と関係する。NoV ゲノム組換えを検出可能な新規 genotyping 法は、年余にわたる NoV の流行とゲノム進化をモニターすることを可能とし、NoV の流行を予測に利用できる。

A. 研究目的

ノロウイルス (Norovirus; NoV) は直径約 38nm の小型球形ウイルスで、冬季非細菌性胃腸炎や冬季非細菌性集団症中毒の主因ウイルスとして知られている。NoV のゲノムはプラス 1 本鎖の RNA で、3 つの ORF を持つ。ORF1 には非構造蛋白質、ORF2 と 3 には構造タンパク質がコードされている。NoV は、ORF2 の塩基配列に基づき 5 つの genogroup (GI, GII, GIII, GIV, GV) に分類され、このうち GI, GII, GIV がヒトに感染する。GI, GII にはそれぞれ 15 以上の遺伝的に異なる genotype が存在する。ヒト由来の NoV は細胞培養系や実験動物

系が確立されていない。そのため、NoV の抗原性は、バキュロウイルスに NoV の構造蛋白質領域を組み込み、昆虫細胞発現系で発現して作製したウイルス様中空粒子 (VLPs) を用いて調べられた。その結果、NoV の genotype 間の抗原性は互いに異なっていることが明らかになった。現在、NoV の genotyping は、ノロウイルスの抗原性に関する情報を蓄積し、抗原検出系の作出や、分子疫学に利用するため、構造蛋白質コード領域の N 末端側約 300 塩基の塩基配列を用いて行われている。しかし、NoV は、ゲノムの ORF1 と ORF2 のジャンクション領域にゲノム組換えのホットスポットがあり、非構造蛋白質領域と構造蛋白質領域では

異なる genotype となるゲノム組換え体の存在が明らかにされている。NoV の流行のメカニズムや、病原性、宿主特異性などを調べるためには、ウイルスの複製に関わる酵素群をコードしている ORF1 の塩基配列情報と、遺伝子組み換えを考慮に入れた NoV の分子進化的解析が必要である。

NoV の genotype の内、約半数の genotype の全塩基配列が決定されていない。本研究では、全塩基配列の決定されていない genotype を中心に、全塩基配列の解析を試み、得られたゲノム全長塩基配列を用いて分子遺伝学的解析を施行した。

B. 研究方法

材料:1998年4月～2011年3月に採取された、NoV 陽性を呈した糞便サンプルを用いた。埼玉県衛生研究所より譲渡を受け、国立感染症研究所ウイルス第二部第一室で補完管理している NoV 陽性糞便パネルも用いた。本パネルには、現在までに報告されているすべてのヒトノロウイルスの genotype が含まれる。

方法:

塩基配列解析:糞便サンプルを超純水に懸濁し、10000g, 20分間の遠心操作により、上清を採取し、約10%の便懸濁液を作製した。便懸濁液から RNA を抽出し、逆転写反応により cDNA を合成し PCR, long distance PCR の鋳型として用いた。Genotyping は、NoV GI に対しては GISK シリーズプライマー、NoV GII に対しては GIISK シリーズプライマーを用いて Capsid N/S (ORF2 の N 末端) 領域を RT-PCR

で増幅し、塩基配列情報を得、ClustalW、Kimura 2 parameter 法、Neighbor-Joining 法による分子系統解析によって行った。Genotyping によりデータベースに全長塩基配列の報告されていない NoV genotype, GI.13, GI.10, GI.19, GII.5, GII.6, GII.11, GII.12, GII.14, GII new genotype HK299, Yuzawa2011 の他、無症候性感染者より採取された genotype GII.2, GII.4, GI.4, GI.7 ほか 2 株の合計 18 株を選択し、全長塩基配列を決定した。全塩基配列解析は、NoV GI ゲノム 5' 末端及び、ORF1, 2 ジャンクションに保存されている GTGAATGATGATGGCGTC、NoV GII ゲノム 5' 末端及び、ORF1, 2 ジャンクションに保存されている GTGAATGAAGATGGCGTC を基点に ORF1 領域 5 kb、ORF2-3 領域 2.6 kb を増幅し、増幅断片をプライマーウォーキング法で sequence して得た。遺伝子組換えの疑われた株は、ORF1, ORF2 ジャンクション領域を含む約 2Kb を全塩基配列情報に基づいて合成した株特異的 sense primer, antisense primer を用いて、増幅し、ジャンクション領域の塩基配列を確認した。得られた全塩基配列は、DDBJ に登録された NoV の全長塩基配列と ClustalW を用いてアライメントし、前述と同様に分子系統解析を行った。遺伝子の組み換えの検出には SimPlot を用いた。

P22 タンパク質の機能解析:GI.1 Norwalk virus prototype NV68, GII.3, U201, GII.4/3 chimeric strain TCH04-577, GII.4 Saga1 の 3A-like protein, p22 領域を哺乳類細胞プロ

モーターベクターにクローニングし、細胞内で発現させて免疫染色によって発現後の挙動と細胞に対する影響を解析した。

P-domain の X 線構造解析: NoV GII/10, GII/12 の P 領域を大腸菌で発現させ、分離精製した後、結晶化処理によって P の結晶を得た。

P-domain に結合することが知られており、NoV のレセプター候補とされている組織血液型抗原 (HBGA) を P-domain とともに共結晶化し、HBGA と P-domain との結合様式を X 線結晶構造解析した。

C. 結果及び考察

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。ヒトに感染する NoV には、GI, GII, GIV の genogroup が存在し、構造タンパク質領域の塩基配列情報を用いた genotype は、GI で 17 以上、GII で 19 以上が報告されている。しかし、非構造タンパク質領域で genotyping を行うと、GI, GII と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 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ことを明らかにした。

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。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ことを明らかにした。

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。

新たに 18 株の NoV 全塩基配列解析に成功した。18 株には、データベースに報告され

ていない NoV genotype, GI.13, GI.10, GI.19, GII.5, GII.6, GII.11, GII.12, GII.14, GII new genotype HK299, Yuzawa2011 が含まれている。これらの全長配列の解析により、全 GI, GII genotype クラスターの内、約 70%の全長配列が明らかにされた。また、これらの配列を国際協調の元、CaliciWeb等のウイルスデータベース上に公開した。さらに、NoV のゲノム組み替えの解析に必要な、ORF1 にコードされる RdRp 領域の YGDD モチーフ上流の塩基配列のアライメントが可能となり、新規プライマーセットを設計した。RdRp 領域から Capsid N/S 領域の RT-PCR による増幅が可能となった。ORF1 内部には組み替えを起こすポイントはなかった。本研究により構築された、RdRp 領域から Capsid N/S 領域の塩基配列を決定し、RdRp 領域と Capsid N/S 領域とを別々に分子系統解析する方法は、病原性変化と、抗原性変化を追跡することを可能とする。今後、新たなノロウイルスの分子疫学手法として広く普及することが期待される。

D. 結論

本研究で NoV の遺伝子組換え体の頻度は GI, GII 共に 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。ヒトに感染する NoV は、培

養細胞を用いて増速させることができず、モデル動物も存在しない。そのため、ORF1 と ORF2, 3 が高頻度で組み変わることで、ノロウイルスの増殖や宿主細胞への様な影響を与えており、病原性や、流行とどの様な関係があるかは、不明である。しかし、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、遺伝子に組み換えが NoV の増殖に有利に働いている可能性がある。また、ORF1 にコードされている非構造蛋白質と、ORF2, 3 にコードされている構造蛋白質には、異なる種類の選択圧がかかり、異なる理由と、速度で進化している可能性がある。今後、全長塩基配列が決定されていない NoV の genotype の塩基配列解析を継続し、年余にわたってデータを蓄積し、時間軸を考慮した分子疫学を推進することで、NoV の流行予測が可能となるかもしれない。

本研究により行われた、ノロの分子遺伝学的解析は、Norovirus scientific committee ; NSC との共著で新規 genotyping 法としてまとめられ、論文投稿される。また、Fields Virology 第 6 版に成果が記載される (in press)。

E 研究発表 (英文論文のみ)

1. Motomura K, Oka T, Yokoyama M, Nakamura H, Mori H, Ode H, Hansman GS, Katayama K, Kanda T, Tanaka T, Takeda N, Sato H, 2008. Identification of