

201225055A

病原体解析手法の高度化による効率的な  
食品由来感染症探知システムの構築に関する研究  
(課題番号：H24-新興-一般-005)

平成 24 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 25(2013)年 4 月

## 目次

### 1. 平成 24 年度総括研究報告書

病原体解析手法の高度化による効率的な食品由来感染症探知システムの構築に関する研究……	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 24 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) 病原体解析手法の高度化による

効率的な食品由来感染症探知システムの構築に関する研究……	13
------------------------------	----

研究代表者	寺嶋 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
	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

##### b) 腸管出血性大腸菌の血清型、DNA 型の分布解析

および HUS 患者の血清診断に関する研究……	21
-------------------------	----

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	小嶋 由香	川崎市健康安全研究所
	瀬戸 順次	山形県衛生研究所
	甲斐 明美	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 奈良県保健環境研究センター
	松本 裕子	横浜市衛生研究所
	勢戸 和子	大阪府立公衆衛生研究所
	中嶋 洋	岡山県環境保健センター
	木澤 正人	京都市衛生環境研究所
	黒崎 守人	島根県保健環境科学研究所
	小笠原 準	大阪市立環境科学研究所
	今野 貴之	秋田県健康環境センター
	八柳 潤	秋田県健康環境センター
	田邊 純一	新潟市衛生研究所
	増本 久人	佐賀県衛生薬業センター
	泉谷 秀昌	国立感染症研究所 細菌第一部
	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

病原体解析手法の高度化による

効率的な食品由来感染症探知システムの構築に関する研究…………… 30

研究分担者	八柳 潤	秋田県健康環境センター
研究協力者	清水 俊一	北海道立衛生研究所
	坂本 裕美子	札幌市保健福祉局衛生研究所保健科学課
	武沼 浩子	青森県環境保健センター
	岩渕 香織	岩手県環境保健研究センター
	瀬戸 順次	山形県衛生研究所
	鈴木 裕	山形県衛生研究所
	山口 友美	宮城県保健環境センター
	千葉 久子	仙台市衛生研究所
	千葉 一樹	福島県衛生研究所
	川瀬 雅雄	新潟県保健環境科学研究所
	足立 玲子	新潟市衛生環境研究所
	今野 貴之	秋田県健康環境センター

(III) 関東・甲・信・静岡ブロック

関東ブロックで分離された食中毒起因菌の分子疫学解析法の検討と PFGE 法の精度管理… 37

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	山本 和則	茨城県衛生研究所
	内藤 秀樹	栃木県保健環境センター
	河合 優子	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
	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
	上田ひろみ	長野県環境保全研究所
	柴田 真也	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

研究分担 東海・北陸地方11施設（地方衛生研究所及び衛生試験所）による  
IS printing Systemの実施とデータベースへの登録、  
及びパルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）活用状況調査…………… 46

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
	山田 和弘	愛知県衛生研究所
	加藤 真美	石川県保健環境センター
	白木 豊	岐阜県保健環境研究所
	土屋美智代	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
	多和田光紀	豊田市衛生試験所
	山本 新也	豊橋市保健所衛生試験所

(V) 近畿ブロック

a) 近畿ブロックにおける病原体解析手法の高度化による

効率的な食品由来感染症探知システムの構築に関する研究…………… 79

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
	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
	横山 北斗	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
	松井恵梨子	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
	廣岡真理子	和歌山市衛生研究所
	中岡加陽子	和歌山県環境衛生研究センター
	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

b)加熱用牛レバーの生食による腸管出血性大腸菌 O157、散発 3 事例の関連性調査…… 96

研究協力者	浅井 紀夫	京都府保健環境研究所	細菌・ウイルス課
	杉浦 伸明	京都府保健環境研究所	細菌・ウイルス課
	真田 正稔	京都府保健環境研究所	細菌・ウイルス課
	岡本 裕行	京都府山城北保健所	衛生室
	飯田 貴久	京都府山城北保健所	衛生室
	布野千代美	京都府山城北保健所	衛生室

(VI) 中国・四国ブロック

a) 病原体解析手法の高度化による

効率的な食品由来感染症探知システムの構築に関する研究…… 101

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
	大畠 律子	岡山県環境保健センター
	河合 央博	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
	児玉 実	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
	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) 鳥取県で分離された

腸管出血性大腸菌O157の分子疫学的解析におけるIS-Printing法の検討…………… 129

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) 島根県内で分離された

腸管出血性大腸菌O26の分子疫学解析におけるIS-printing法の有用性の検討…………… 135

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) 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 (第2報) － …………… 139

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
	児玉 実	広島市衛生研究所
	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
	大畠 律子	岡山県環境保健センター
	石井 学	岡山県環境保健センター
	河合 央博	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
	鍋島 民	高知県衛生研究所

e) 広島市で分離された腸管出血性大腸菌O157の分子疫学的解析…………… 146

研究協力者	田内 敦子	広島市衛生研究所
	児玉 実	広島市衛生研究所
	築地 裕美	広島市衛生研究所
	佐多 俊子	広島市衛生研究所
	石村 勝之	広島市衛生研究所

- f) 2012年1月、8月、9月に県内の3市で発生した  
同一遺伝子型O157:H7 stx1+2産生株による腸管出血性大腸菌感染症のIS-printing、  
パルスフィールドゲル電気泳動法(PFGE)、MLVAによる解析…………… 153
- |       |       |             |
|-------|-------|-------------|
| 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 |
- g) 黄色ブドウ球菌食中毒事例におけるPFGE法及びPOT法の検討…………… 165
- |       |       |                |
|-------|-------|----------------|
| 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 |
|       | 嶋田 啓司 | 徳島県立保健製薬環境センター |
- h) 香川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…………… 168
- |       |       |               |
|-------|-------|---------------|
| 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 |
- i) 愛媛県で分離された腸管出血性大腸菌O157の分子疫学解析について…………… 173
- |       |       |             |
|-------|-------|-------------|
| 研究協力者 | 松本 純子 | 愛媛県立衛生環境研究所 |
|       | 林 恵子  | 愛媛県立衛生環境研究所 |
- j) 中四国ブロックにおける高知県での食中毒疑2事例での分子疫学解析…………… 177
- |       |       |          |
|-------|-------|----------|
| 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 一繁 | 高知県衛生研究所 |
|       | 松本 道明 | 高知県衛生研究所 |
- (VII) 九州ブロック
- a) 九州地区における食品由来感染症調査における分子疫学的手法に関する研究  
— IS-printing Systemのデータ共有化と九州地区での非O157EHEC検出状況 —…………… 182
- |       |       |               |
|-------|-------|---------------|
| 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   |
|       | 成瀬佳菜子 | 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
江藤 良樹	福岡県保健環境研究所
前田詠里子	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 — ..... 190

研究協力者	江藤 良樹	福岡県保健環境研究所
	前田詠里子	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
	成瀬佳菜子	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) EHEC O157の同時多発時における疫学調査の一助としての役割

「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事例」..... 198

研究協力者	緒方喜久代	大分県衛生環境研究センター	微生物担当
	佐々木麻里	大分県衛生環境研究センター	微生物担当
	成松 浩志	大分県衛生環境研究センター	微生物担当

d) IS-printing およびPFGE 解析により,

宅配弁当が原因と推定された腸管出血性大腸菌 O157 食中毒事例..... 202

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
	佐藤 正雄	福岡市保健環境研究所



e) 2011年沖縄で発生した食中毒由来 <i>Salmonella</i> Enteritidisのファージ型と パルスフィールド電気泳動法による遺伝子解析……………	206
研究協力者	久高 潤 沖縄県衛生環境研究所 衛生化学班
	平良 勝也 沖縄県衛生環境研究所 衛生化学班
	喜屋武向子 沖縄県衛生環境研究所 衛生化学班
	仁平 稔 沖縄県衛生環境研究所 衛生化学班
	岡野 祥 沖縄県衛生環境研究所 衛生化学班
	高良 武俊 沖縄県衛生環境研究所 衛生化学班
	玉那覇康二 沖縄県衛生環境研究所 衛生化学班
	泉谷 秀昌 国立感染症研究所 細菌第一部
f) 毒素原性大腸菌が複数検出された集団感染事例……………	214
研究協力者	黒木真理子 宮崎県衛生環境研究所 微生物部
	吉野 修司 宮崎県衛生環境研究所 微生物部
	大浦 裕子 宮崎県衛生環境研究所 微生物部
g) 平成24年6月に発生した黄色ブドウ球菌（エンテロキシンA型） を原因とする食中毒事件について……………	218
研究協力者	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
	藤田 景清 北九州市環境科学研究所
	市川 睦 北九州市保健所西部生活衛生課
	後川賀津子 北九州市保健所西部生活衛生課
	世戸 伸一 北九州市保健所東部生活衛生課
	土井 史朗 北九州市保健所東部生活衛生課
	安田未知子 北九州市保健所東部生活衛生課

## グループ2：ウイルス

- (I) 下痢症ウイルスの総合データベース構築総括…………… 221  
研究分担者 片山 和彦 国立感染症研究所 ウイルス第二部
- (II) PAGEによるロタウイルスゲノムのバンドパターン解析…………… 230  
研究分担者 村上 耕介 国立感染症研究所 ウイルス第二部
- (III) ロタウイルスのRNA-PAGE泳動パターンによる流行株分類法の検討…………… 236  
研究分担者 藤井 克樹 国立感染症研究所 ウイルス第二部
- (IV) GutVirus Webの構築…………… 240  
研究分担者 三瀬 敬治 札幌医科大学 医療人育成センター
- (V) ロタウイルスにおける遺伝子再集合による進化機構の解明…………… 242  
研究分担者 鈴木 善幸 名古屋市立大学 大学院システム自然科学研究科
- (VI) ノロウイルスタンパク質の構造解析…………… 246  
研究分担者 朴 三用 横浜市立大学  
朴 英斌 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24年度）…………… 250

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 24 年度総括研究報告書

病原体解析手法の高度化による効率的な食品由来感染症探知システムの  
構築に関する研究

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：

食品由来感染症に由来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である。また、解析情報を共有化することにより、効率的に情報を利用することが可能となる。平成 23 年度までの厚生労働科学研究事業で、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てきた。パルスネットのシステムを有効に機能させるため継続的な精度管理を実施するとともに、BioNumerics server を利用した PFGE 及び Multilocus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) のデータベース構築を継続した。さらに、腸管出血性大腸菌 (EHEC) 0157 の解析では、IS-printing system (IS 法) による解析結果データベースの分担研究者からの直接入力も行った。一方、ウイルスでは、構造生物学とウイルスタンパク質の機能解析と分子疫学を融合させ、単なる直鎖状の配列ばかりでなく、立体構造のデータ、タンパク質の機能も加味した分子疫学ツールである、GutVirusWeb の構築を目指す。本年度は、ノロウイルスの多機能タンパク質 VPg, VP2 の発現、結晶解析へのアプローチを開始した、また、ロタウイルスの分子疫学基盤構築のため、RNA-PAGE による簡便かつ網羅的スクリーニング手法の確立を開始した。さらにセグメントウイルスのゲノムリアソートメントを計算し、進化を予測可能な新たなアルゴリズムの開発にも着手した。CaliciWeb は、ロタウイルスの遺伝子情報を加え、GutVirusWeb としてリスタートした。

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）
八柳 潤（秋田県健康環境センタ	堀川和美（福岡県保健環境研究所）
ー）	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、三戸部治郎（感
松本昌門（愛知県衛生研究所）	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）

村上耕介（国立感染症研究所）

藤井克樹（国立感染症研究所）

朴英斌（国立感染症研究所）

三瀬敬治（札幌医科大学）

鈴木善幸（名古屋市立大学）

朴三用（横浜市立大学）

#### 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、高度な解析能を有する手法に基づく病原体対解析を行い、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、平成 23 年度までの厚生労働科学研究事業で構築してきたデータベースを基盤に、全国に対応することを目的として分担研究者からのデータを蓄積した。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；ノロウイルスにおいて、ORF1 にコードされる VPg, ORF3 にコードされる VP2 は、構造タンパク質と非構造タンパク質の性質を併せ持つことが予測されている興味深い多機能タンパク質である。分子構造の明らかにされていないこれら 2 種類のタンパク質の X 線結晶構造解析を行うため、大腸菌で発現させ、結晶化することを試みた。ロタウイルスのゲノムは 11 本の分節二本鎖 RNA (double-stranded RNA: dsRNA) で、ポリアクリルアミドゲル電気泳動

(RNA-PAGE) により分節ごとに分離される。RNA-PAGE の泳動パターンは、群および遺伝子型ごとに特徴があることから、泳動パターンから大まかな分類が可能である。RNA-PAGE は安価で多検体を処理できる方法として有用であるが、泳動条件の違いにより泳動パターンに差が生じることから、異なる施設間での比較が容易でない。この問題点を解決するため、本分担研究では、施設間誤差の小さいマイクロチップ電気泳動装置に着目し、この手法によるロタウイルス dsRNA の分離を

検討した。施設間誤差を検証するため、NT-9 を 3 台の装置で測定した。装置 1 台につき 4 枚のマイクロチップをセットし、各チップ 3 回ずつの測定を行った。ロタウイルスにおける遺伝子再集合による進化機構を解明するために、ロタウイルスと同様に分節型のゲノムを持ち同様の遺伝子再集合による進化機構を有すると考えられ、ロタウイルスよりも国際塩基配列データベースに登録されている配列数が多いインフルエンザウイルスについても並行して解析を行うことは有用であると考えられる。ノーウォークウイルス（ノロウイルス、NoV）、サッポロウイルス（サポウイルス、SaV）等のカリシウイルスを対象としたデータベース、疫学情報サイト CaliciWeb を引き継ぐだけでなく、ロタウイルスなどの下痢症ウイルスを新たに加えて GutVirus Web を中心として拡大整備し、流行予測プログラムの開発・ページへの組み込みを行いつつさらなる充実を図る。

### C. 研究結果

#### 細菌グループ；

##### 1. 感染研における研究

平成 24 年度は、感染研の PFGE データベースへの入力結果がリアルタイムで 6 分担研究者に利用できる状況となった。EHEC 0157 の IS 法のデータベース構築に関しては、6 ブロックの分担研究者からサーバーへの試験的なアクセスによるデータ入力を行った。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なる。2012 年に分離された腸管出血性大腸菌（EHEC）について、PFGE 解析

に基づく遺伝子型及び血清型別に基づいて分離株の動向について調べた。EHEC 0157 では、1422 株に対して 2012 年に分離された新しいサブタイプとして 628 種類、2011 年に分離されたことのあるサブタイプが 35 種類、その他が 28 種類見いだされた。また、EHEC 026 では、388 株に対して 188 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 32 種類存在したが、そのうち 6 ヶ所以上の都道府県で分離されたパターンは 6 種類存在していた。同様に 026 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 2 種類あり、うち 1 種類では 7 府県の散発事例から同一 XbaI パターンを示す株が分離されていた。EHEC の O 血清群については、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 0157, 026, 0111, 0103, 0145, 091, 0121, 0165 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・新潟ブロックの地方衛生研究所に IS-printing system を普及させると共に、国立感染所研究所に構築された IS-printing データベースシステムへの参画を可能とすることを目的として、ブロック内地方衛生研究所における IS-printing system の基礎的な精度管理

に関する共同研究を実施した。秋田県で分離された EHEC 0157 分離株 4 株から抽出した DNA 溶液を供試し、キット付属のプロトコールに従い IS-printing を実施した結果、高分子側のバンドで増幅断片の量が過剰となり、判定が困難となる傾向がみられた。また、条件により hly が陰性と判定される問題も確認された。各 set の電気泳動に 2 枚のゲルを使用し、ゲル濃度、アプライ量、泳動時間を最適化することにより、高分子側と低分子側どちらの断片の判定も容易となることが山形県の検討により示され、判定困難な場合はこの条件を試行することが推奨される。今後もブロック内における IS-printing system の条件検討と精度管理を継続する必要がある。

### 3. 関東・甲・信・静岡ブロック

腸管出血性大腸菌 (EHEC) の分子疫学的解析を関東ブロックの地方衛生研究所間で、相互に行うために、PFGE 法及び IS-printing system (IS) 法の精度管理を実施した。EHEC 0157 の共通株 2 株を用いて PFGE 解析を行った結果、概ね良好な泳動像が得られたが、染色が薄くバンドがはっきりしない写真もあった。約 100kb 以下の小さいサイズのバンドは不明瞭な場合が多く、BioNumerics での解析でバンドの選択が困難な施設が多かった。近年、地方衛生研究所では職員の異動も頻繁に行なわれ、一定技術の確保が課題となっている。本研究班を通じて精度管理を実施することで、各地研の PFGE 解析技術の向上と情報交換が行われ、非常に有意義であった。

EHEC 0157 の新しい解析法である IS 法

について、共通菌株を用いて地研間でその有用性の検討を行なった。本法は、PCR 法を基本とした解析法であり、その結果判定は遺伝子バンドの有無で行なうため、非常に迅速、簡便に菌株の解析を行うことが可能であり、地研間で相互比較を容易に行うことができた。しかし、菌株によっては同じ IS パターンでも PFGE 型が異なる株が存在するので、結果の解釈には注意が必要である。

### 4. 東海・北陸ブロック

東海・北陸地方 11 施設（地方衛生研究所及び衛生試験所）において各施設で検出された 0157 について IS printing System を実施した（合計 124 株）。このうち 10 施設由来 112 株について IS printing System データベースへの登録を行った。本データベースを用いて解析を行ったところ、10 施設中 9 施設で他の都縣市と同一の IS 型が検出された。さらに東海・北陸地方以外の東京都、岡山県から検出された 0157 と同一の IS 型も検出された。これらの結果は既に PFGE を用いた「パルスネットジャパン」でも明らかにされているが、複数の都縣市から 2 から 3 ヶ月の比較的短い期間に検出される特定の 0157 の存在を明らかにした。最も多くの都縣市から検出された IS 型は AA039 であった。この型は東海・北陸、東京都を含む 6 都縣市から検出され、その期間は 6 月から 10 月であった。

平成 24 年度東海・北陸 11 施設の行政への還元に関する調査では 4 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。これら 4 施設の泳動図は疫学調査等に活用されるに十分な画質を有し

ていたことから行政への還元もスムーズに進んだものと思われる。行政に還元された集団事例由来病原菌は 0157、0121 等の腸管出血性大腸菌であった。また、1 施設では病院から分与された 0157 を含めた集団事例の解析を PFGE を用いて実施していた。

#### 5. 近畿ブロック

腸管出血性大腸菌 (EHEC) 0157 の遺伝子型別法である IS-printing System (IS) 法とパルスフィールドゲル電気泳動 (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、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。IS 法の精度管理は 10 施設で実施したが、*eae* や *hlyA* といった増幅されるべきバンドが陰性と判定された施設があり、PCR 反応の成否が重要であることを再認識する結果となった。また、一部の株で「バンドあり」を非特異バンドと判定した施設が 2 箇所あり、泳動量の影響が考えられたが、さらなる検証が必要である。PFGE 法は、11 施設から提出された電気泳動画像について 3 人がデンドログラムを作成した。コントラストが不明瞭な画像ではバンド認識が難しく、近似度が低くなる傾向がみられた。近畿 IS データベースの 2012 年 3 月 1 日現在の登録数は 1,769 株で、2012 年分離株は 184 株登録された。このうち 10 株以上登録されたタイプは 2 タイプで、大きく流行したタイプは見られなかった。Multilocus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) 法については、0157 だけでなく 0111 や 026 の遺伝子型別も可能な Izumiya らの方法(新規 MLVA 法)

に変更し、共通の疫学指標として実施できるかどうか検討した。新規 MLVA 法では、2 組の Multiplex PCR で増幅産物が十分に得られない locus があり、テンプレート調整法や PCR 条件等についてさらに検討が必要であると考えられた。

#### 6. 中国四国ブロック

中四国ブロックの調査では、データベースの構築に不可欠なデータの精度を維持・向上させることを目的として、腸管出血性大腸菌 (EHEC) 0157 菌株を用いたパルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE 法) および IS-printing System による精度管理を実施した。その結果、本年度は IS-printing system による解析で、異なった結果を報告した施設が例年より多かった。PFGE 法による結果は、ほとんどの施設で良好であった。中四国地域の EHEC 0157 による感染事例について、IS-printing system による解析データを利用して疫学解析を行った結果、同一 IS コードの菌による感染で、複数の県で多数の患者が発生していたことが確認された。本年度から全国規模での IS-printing system データベースの試行が始まったことにより、さらに広域な発生事例についても、迅速な解析が可能になるものと思われる。

#### 7. 九州ブロック

九州ブロックでは、1) IS-printing System (ISPS) のデータ共有化、2) 九州地区での非 0157 腸管出血性大腸菌 (EHEC) 検出状況の解析、3) ISPS 精度管理について取り組んだ。さらに、4) 大分県および 5) 福岡市で発生した EHEC 0157 集団事例における ISPS での解析事例、6) 沖縄県

でのサルモネラ食中毒事例のパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) による分子疫学的解析、7) 宮崎県での毒素原性大腸菌の PFGE による分子疫学的解析、および 8) 北九州市で発生した黄色ブドウ球菌食中毒事例に関して報告する。

九州地区における ISPS データ登録数 (平成 24 年 12 月現在) は 207 件であった。ISPS の結果および疫学調査により、7 事例が集団発生と確認された。一方、九州地区で検出または収集された非 0157 は 343 株であった。非 0157 による集団発生事例は、0103 が 5 事例、026 および 0111 が各 4 事例、0145 が 2 事例、および 0186 が 1 事例、計 16 事例であった。

ウイルスグループ；

NoV の 2 種類のタンパク質の結晶化では、ヒトノロウイルス (HuNoV) GII.3 U201 株の VPg、VP2、マウスノロウイルス

(MNV) S7 株の VPg、VP2 のコドンが大腸菌用に最適化して遺伝子人工合成を行った。人工合成フラグメントは、pCold ベクターにクローニングレコードショックによる大量発現をおこなった。VPg、VP2 タンパク質共に不要化画分へ移行しやすく、可溶化画分に回収されたタンパク質も、透析中に析出しやすい傾向があった。マイクロチップ電気泳動装置の測定では、合計 36 回の試験について各セグメントの移動度を比較したところ、標準偏差は 0.5 以下であり、測定値間で大きな誤差が認められなかった。しかし、セグメント 1-4 はお互いに距離が近く、各セグメントのエラーバーが重複していた。セグメント 1-4 のエラーバーが重複していたことから、移動度のみでは比較が難しくなると

予想された。これを解決する方法として、セグメント間の距離を算出し、この数値を組み合わせて評価することも考えられた。今後はさらに多くのサンプルデータを蓄積することで、セグメント 2,3 およびセグメント 7-9 が未分離の状態でも、高精度に群・遺伝子型を分類できるような条件を検討する。インフルエンザウイルス 506 株のゲノム配列を Influenza Virus Resource より取得しそれぞれのゲノム分節の両端の相補性を検討したところ、4-7 塩基が相補的であること、相補的な塩基対はゲノム分節ごとに特異的であることが明らかになった。インフルエンザウイルスのそれぞれのゲノム分節の両末端は塩基対を形成していることが確かめられ、株間で遺伝子組換えが生じている可能性が示唆された。GutVirus Web の構築に関して、本年度は、ロタウイルスの分子疫学の基盤構築のため、データベースにロタウイルスの情報を収載し、利用できるようにした。

#### D. 考察

食品由来感染症に由来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である。また、解析情報を共有化することにより、効率的に情報を利用することが可能となる。平成 23 年度までの厚生労働科学研究事業で、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てきた。システム担当者の交代等があるため、本システムを有効に機能させるためには継続的な精度管理が必須である。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。今後 IS サーバーの全国的な利用に向けてデータの更新や精度管理が課題となる。ノロウイルスタンパク質の構造解析における VPg, VP2 タンパク質単独の発現は、難しく、困難が予想された。次年度は、protease 等結晶構造が解析された安定した構造を持つタンパク質と組み合わせた融合タンパク質として発現させ、可溶化と結晶化を試みる。PAGE によるロタウイルスゲノムのバンドパターン解析では、セグメント 1-4 のエラーバーが重複していたことから、移動度のみでは比較が難しくなると予想された。これを解決する方法として、セグメント間の距離を算出し、この数値を組み合わせて評価することも考えられた。今後はさらに多くのサンプルデータを蓄積することで、セグメント 2, 3 およびセグメント 7-9 が未分離の状態でも、高精度に群・遺伝子型を分類できるよう条件を検討する。また、キアゲン社のキャピラリー電気泳動装置”QIAexcel”との比較検討を行う予定である。GutVirus Web の構築に関して、来年度以降は、英語でのフォーラム運用を行い、GutVirusWeb を国際的情報交換の場として運用する予定である。

#### 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てきた。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

##### 1. 誌上发表

1. Masakado Matsumoto, Reiji Hiramatsu, Kazuhiro Yamada, Masahiro Suzukil, Yoshio Miwa, Mitsutaka Yabutani, Yuhki Nagai, Michiyo Tsuchiya, Makiko Noda, Akihiro Nagata, Keiko Kawakami, Tomoko Shima, Norio Tatsumi and Hiroko Minagawa. Phenotypic and Genetic Analyses of *Campylobacter jejuni* Lior Serotype 76 Isolated from Chicken Meat and Clinical Specimens. Jpn. J. Infect. Dis., 66, 72-75, 2013.

2. Taguchi M, Kawahara R, Seto K, Harada T, Kumeda Y: Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase- and AmpC  $\beta$ -Lactamase-Producing *Salmonella enterica* Strains Isolated from Domestic Retail Chicken Meat from 2006 to 2011. Jpn. J. Infect. Dis. 65: 555-557, 2012.

3. Ooka T, Seto K, Kawano K, Kobayashi H, Etoh Y, Ichihara S, Kaneko A, Isobe J, Yamaguchi K, Horikawa K, Gomes TAT, Linden A, Bardiau M, Mainil JG, Beutin L, Ogura Y, Hayashi T: Clinical

- Significance of *Escherichia albertii*. Emerg. Infect. Dis. 18: 488-492, 2012.
4. Fujii Y, Shimoike T, Takagi H, Murakami K, Todaka-Takai R, Park Y, Katayama K: Amplification of all 11 RNA segments of group A rotavirus based on reverse transcription polymerase chain reaction. Microbiol Immunol. 2012; 56:630-638.
  5. Kitaura K, Fujii Y, Matsutani T, Shirai K, Suzuki S, Takasaki T, Shimada S, Kametani Y, Shiina T, Takabayashi S, Katoh H, Ogasawara K, Kurane I, Suzuki R: A new method for quantitative analysis of the T cell receptor V region repertoires in healthy common marmosets by microplate hybridization assay. J Imm Method 2012, 384:81-91
  6. Yoshiyuki Suzuki and Yuki Kobayashi: Evolution of complementary nucleotides in 5' and 3' untranslated regions of influenza A virus genomic segments. Infection, Genetics and Evolution 2013, 13:175-179.
  7. 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. Journal of virology vol. 86, 284-92, 2012.
  8. Grant S. Hansman, David W. Taylor, Jason S. McLellan, Thomas J. Smith, Ivelin Georgiev, Jeremy R. H. Tame, Sam-Yong Park, Makoto Yamazaki, Fumio Gondaira, Motohiro Miki, Kazuhiko Katayama, Kazuyoshi Murata, and Peter D. Kwong. Structural Basis for Broad Detection of Genogroup II Noroviruses by a Monoclonal Antibody That Binds to a Site Occluded in the Viral Particle Journal of virology vol. 86, 3635-3646, 2012.
  9. Seiya Harada, Tomoichiro Oka , Eisuke Tokuoka, Naoko Kiyota, Koichi Nishimura, Yasushi Shimada, Takehiko Ueno, Shigeru Ikezawa, Takaji Wakita, Qihong Wang, Linda J. Saif, and Kazuhiko Katayama. A confirmation of sapovirus re-infection gastroenteritis cases with different genogroups and genetic shifts in the evolving sapovirus genotypes, 2002-2011. Arch Virol DOI 10.1007/s00705-012-1387-7, 2012 online.
  10. Matsuhira, T., Kaji, C., Murakami, S., Maebashi, K., Oka, T., Takeda, N. and Katayama, K. Evaluation of four antiseptics using a novel murine norovirus. Exp Anim. vol. 61, 35-40, 2012.
  11. Oka, T., Mori, K., Iritani, N., Harada, S., Ueki, Y., Iizuka, S., Mise, K., Murakami, K., Wakita, T., and Katayama, K. Human sapovirus classification based on complete capsid nucleotide sequences. Arch Virol., vol157, 349-52, 2012.
  12. Tyler M Sharp, Sue E Crawford, Nadim J Ajami, Frederick Neill, Robert L

Atmar, Kazuhiko Katayama, Budi Utama, Mary K Estes. Secretory pathway antagonism by calicivirus homologues of Norwalk virus nonstructural protein p22 is restricted to noroviruses. *Virology Journal* 2012, 9:181 (3 September 2012)

13. Masaru Yokoyama, Tomoichiro Oka, Hirotatsu Kojima, Tetsuo Nagano, Takayoshi Okabe, Kazuhiko Katayama, Takaji Wakita, Tadahito Kanda and Hironori Sato. Structural basis for specific recognition of substrates by sapovirus protease. *Frontiers in Microbiology* 3: Article 312, 1-10, 2012.

14. Motohiro Miki and Kazuhiko Katayama. *In silico* 3D structure analysis accelerates the solution of a real viral structure and antibodies docking mechanism. *Frontiers in Microbiology* 3: Article 387, 1-6, 2012

15. Kitamoto N, Oka T, Katayama K, Li TC, Takeda N, Kato Y, Miyoshi T, Tanaka T. Novel monoclonal antibodies broadly reactive to human recombinant sapovirus-like particles. *Microbiol Immunol.* 56(11):760-770, 2012.

16. Iguchi A, Iyoda S, Seto K, Ohnishi M; EHEC Study Group. Emergence of a novel Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O serogroup cross-reacting with *Shigella boydii* type 10. *J Clin Microbiol.* 2011. 49: 3678-3680. 8.

2) 学会発表

1. 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. 8th International Symposium on Shiga Toxin Producing Escherichia coli Infections, 2012

2. Chinen, I., Stroika, S.G., Terajima, J., Zolezzi, G., Iyoda, S., D' Astek, B., Ohnishi, M., Watanabe, H., Gerner-Smidt, P., Rivas, M. International clones of STEC O157 studied by PFGE and virulence profile in three Pulsenet countries : USA, Japan and Argentina. 8th International Symposium on Shiga Toxin Producing Escherichia coli Infections, 2012

3. 上田ひろみ, 笠原ひとみ, 宮坂たつ子, 藤田 暁, 小野倫子, 他 : 飲料水が原因となった複数の腸管出血性大腸菌による食中毒事例—長野県, 病原微生物検出情報 (国立感染症研究所) 33, 5, 120-121, 2012.

4. 内藤秀樹, 船渡川圭次, 人見美子, 石川信一, 豊田史郎, 他 : 腸管出血性大腸菌O157, O145 の混合感染が認められた食中毒事例—栃木県, 病原微生物検出情報 (国立感染症研究所) 33, 5, 122-123, 2012.

5. 松本昌門ら 臨床検体及び市販鶏肉由来カンピロバクター菌株の血清型別及び遺伝子検査等による疫学的解析 第60回日本化学療法学会西日本支部総会、第55回日本感染症学会中日本地方会学術集

会、第 82 回日本感染症学会西日本地方会  
学術集会 平成 24 年 11 月 5 日、福岡市

6. 山田和弘ら 愛知県における糞便から  
の ESBL 遺伝子陽性大腸菌分離状況 第  
33 回日本食品微生物学会学術総会 平成  
24 年 10 月 26 日 福岡市

7. 鈴木匡弘ら 市中獲得型メチシリン  
耐性黄色ブドウ球菌 USA300 の市販抗菌  
薬軟膏耐性 第 86 回日本感染症学会総  
会・学術講演会 平成 24 年 4 月 25 日 長  
崎市

8. 勢戸和子：近畿ブロック IS データベ  
ースを用いた EHEC 0157 の流行株の探知、  
衛生微生物技術協議会第 33 回研究会  
(2012 年 7 月, 横浜)

9. 勢戸和子, 田口真澄, 原田哲也：大  
阪府における STEC 感染症への抗菌薬治療  
の現状, 第 16 回腸管出血性大腸菌感染症  
研究会 (2012 年 7 月, 秋田)

10. 藤井克樹、下池貴志、高木弘隆、  
Dennis Francis、村上耕介、朴英斌、戸  
高玲子、脇田隆字、片山和彦：RT-PCR に  
よる A 群ロタウイルスの全 11 セグメント  
の増幅法の構築 第 60 回日本ウイルス学  
会学術集会 (大阪) 2012 年 11 月 13-15  
日

11. 高木弘隆、藤井克樹、村上耕介、戸  
高玲子、下池貴志、小林宣道、片山和彦：  
A 群ロタウイルス (RVA) の分離・増殖にお  
ける感受性細胞株のクローニングによる  
検討 第 60 回日本ウイルス学会学術集会  
(大阪) 2012 年 11 月 13-15 日

12. 村上耕介、岡智一郎、下池貴志、藤  
井克樹、朴英斌、戸高玲子、脇田隆字、  
松田幹、片山和彦：ノロウイルス VLP の  
Caco-2 細胞への結合に参与するタンパク  
質の探索 第 60 回日本ウイルス学会学術

集会 (大阪) 2012 年 11 月 13-15 日

13. 戸高玲子、村上耕介、岡智一郎、高  
木弘隆、朴英斌、下池貴志、藤井克樹、  
脇田隆字、中西章、片山 和彦：カリシ  
ウイルスのユニバーサルなプラスミドベ  
ースリバーズジェネティクスシステム  
第 60 回日本ウイルス学会学術集会 (大阪)  
2012 年 11 月 13-15 日

14. 下池貴志、高木弘隆、岡智一郎、村  
上耕介、戸高玲子、朴英斌、藤井克樹、  
脇田隆字、片山和彦：マウスノロウイル  
ス感染細胞内のウイルス蛋白質とそのゲ  
ノム RNA の局在 第 60 回日本ウイルス学  
会学術集会 (大阪) 2012 年 11 月 13-15  
日

15. 戸高玲子、岡智一郎、村上耕介、下  
池貴志、藤井克樹、朴英斌、高木弘隆、  
脇田隆字、中西章、片山和彦：  
Development of plasmid DNA  
transfection-based reverse genetics  
system for murine norovirus and feline  
calicivirus 第 35 回日本分子生物学会  
年会 (福岡)、平成 24 年 12 月 11-14 日

16. 村上耕介、岡智一郎、下池貴志、藤  
井克樹、朴英斌、戸高玲子、脇田隆字、  
松田幹、片山和彦：Screening for  
candidate receptor on Caco-2 involved  
in norovirus binding by mass  
spectrometry from different approaches  
第 35 回日本分子生物学会年会 (福岡)、  
平成 24 年 12 月 11-14 日

17. YoungBin Park, Reiko Todaka,  
Takashi Shimoike, Kosuke Murakami,  
Yoshiki Fujii, Takaji Wakita, Kazuhiko  
Katayama: Evaluation of two newly  
developed human norovirus detection  
system direct RT-PCR and BLEIA 第 35  
回日本分子生物学会年会 (福岡)、平成  
24 年 12 月 11-14 日