

- Clinical and Food Samples, and from Broiler Carcasses in Southern Brasil. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.* 45: 1-4, 2003.
- 7) S A Fernades, et al. Phenotypic and Molecular Characterization of Salmonella Enteritidis Strains Isolated in Sao Paulo, Brasil. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.* 45: 59-63, 2003.
- 8) J Zheng et al. Enhanced Subtyping Scheme for Salmonella Enteritidis. *Emerg Infect Dis.* 13: 1932-1935, 2006.
- 9) 病原微生物検出情報. 国立感染症研究所. 18; 51-52, 1996.
- 10) 病原微生物検出情報. 国立感染症研究所. 21; 162-163, 2000.
- 11) 病原微生物検出情報. 国立感染症研究所. 24; 179-180, 2003.
- 12) 病原微生物検出情報. 国立感染症研究所. 27 191-192, 2006.
- 13) 病原微生物検出情報. 国立感染症研究所. 30; 203-204: 2009.
- 14) Health Protection Agency. Salmonella (non typhoid/paratyphoid) - 2009 update. Travel and Migrant Health, HPA, 2011. Available from http://www.hpa.org.uk/webc/HPAwebFile/HPAweb_C/1317131650560.
- 15) R Khakhria, et al. Distribution of Salmonella Enteritidis phage types in Canada. *Epidemiol. Infect.* 106; 25-32, 1991.

表 1. 2011 年に沖縄県で発生した *S. Enteritidis* による食中毒と解析に用いた分離株

事件No	発生日	摂食者数	患者数	死者数	原因食品	原因施設	株名	由来
1	J総菜店	6月18日	不明	32	ガーリックチキン	惣菜製造	11-044	厨房シンク
							11-045	鶏肉原材料、他2株、計3株
							11-046	チキン摂食残品(17日購入)
							11-047	患者(17日購入)、他6名由来、計7株
							11-050	患者便(24日購入)他由来、計3株
2	Oレストラン	6月24日	50	28	不明 (6月24日の昼食)	飲食店	11-056	ハンドミキサー
							11-059	患者便
							11-060	従業員検便
3	D弁当屋	7月10日	18	16	弁当	惣菜製造	11-084	患者便
							11-085	患者便
							11-091	患者便
4	家庭内1	7月30日	不明	2	不明	不明	11-097	患者便
5	D弁当屋	9月24日	102	66	弁当	惣菜製造	11-167	患者便
							11-168	患者便
							11-172	従業員検便
							11-177	弁当(菜の花)
6	保育園集団発生	10月11日	不明	66	不明	不明	11-179	患者便(3歳男児)
							11-181	患者便(4歳女児)
							11-185	患者便(2歳男児)
7	家庭内2	10月26日	不明	6	不明	不明	11-187	患者便(1歳女児)
							11-213	患者便
							11-219	患者血液(8歳男児)
8	8歳男児死亡事例	11月23日	3	3	1 (卵かけご飯疑い)	家庭	11-220	11-220の姉糞便
							11-221	11-220の弟糞便
							11-222	患者血液(7歳男児)
9	7歳男児重症事例	12月	不明	2	不明	不明	11-222	患者血液(7歳男児)
合計		8事例		219	1		合計	36株

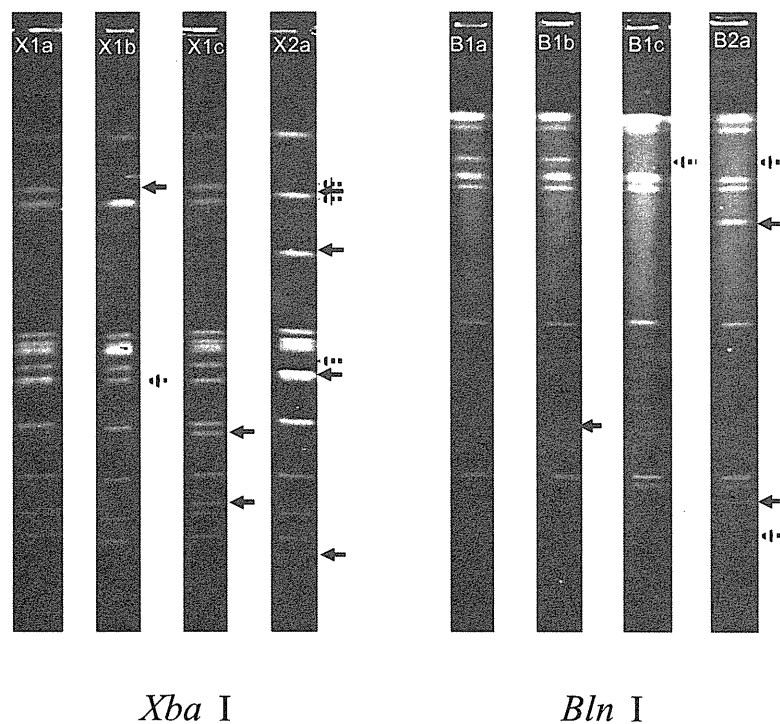


図 1 制限酵素 *Xba*I および *Bln*I で消化した *S. Enteritidis* の PFGE パターン

⇐ はバンドの消失、⇨ はバンドの挿入部位を示した

表 2 2011 年に発生した *Salmonella* Enteritidis 食中毒と分離株の解析結果

事件 No.	事例	S. Enteritidis 由来 (38株)					ファージ タイプ	PFGEタイプ	
		患者	食品	原材料	環境	従業員		Xba I	Bln I
1	J惣菜店	11-047、他9株	11-046	11-045、他2株	11-044		PT14c	X1b	B1c
2	Oレストラン	11-059			11-056	11-160	PT14c	X1a	B1a
3	D飲食店弁当(那覇店)	11-085、他2株					PT14c	X1a	B1a
4	家庭内1	11-097					PT14c	X1a	B1a
5	D飲食店弁当(浦添店)	11-167、他1株	11-177			11-172	PT13	X2a	B2a
6	保育園	11-179、他3株					PT14c	X1c	B1a
7	家庭内2	11-213					PT14c	X1a	B1a
8	8歳男児死亡	11-219、他2名					PT14c	X1a	B1b
9	7歳男児重症(食中毒疑)	11-222					PT14c	X1a	B1a

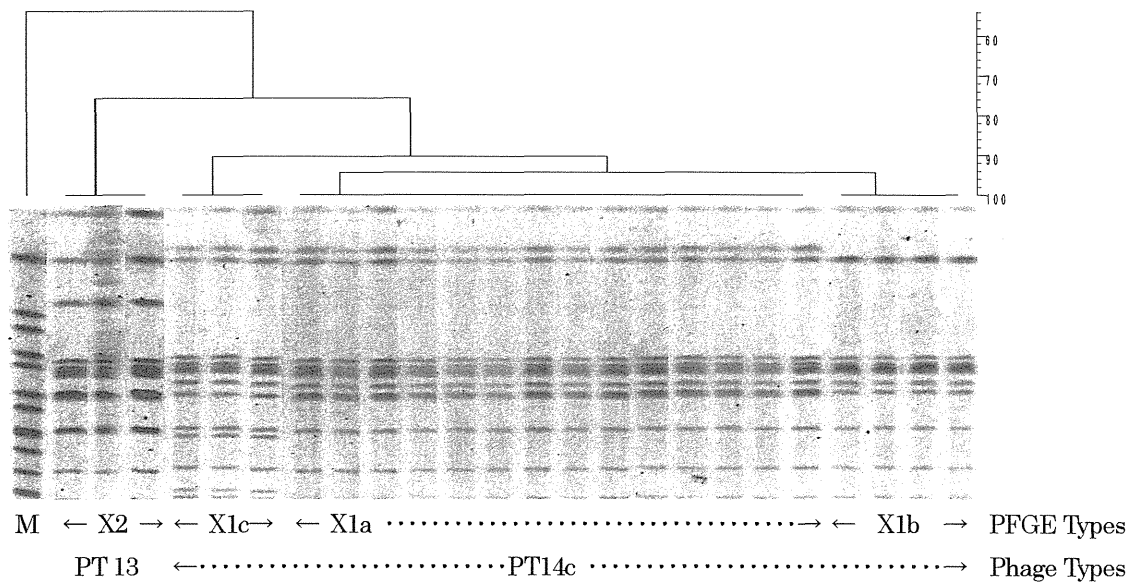


図 2 *Salmonella* Enteritidis の PFGE デンドログラムとファージ型

毒素原性大腸菌が複数検出された集団感染事例

宮崎県衛生環境研究所 微生物部

黒木真理子 吉野修司 大浦裕子

要旨

2011 年 11 月、宮崎県において東南アジアから帰国した同一グループの旅行者が集団下痢症を発生した。下痢原性大腸菌に関する PCR 検査を実施したところ、患者 3 名から計 5 種類の血清型の毒素原性大腸菌(ETEC)が確認された。患者から共通して分離された同じ血清型の ETEC についてパルスフィールドゲル電気泳動法(PFGE)を実施したところ、バンドパターンはほぼ一致しており、本事例は同一感染源を含む ETEC の集団感染と推測された。

A. はじめに

ETEC は海外旅行者下痢症の主要な起因菌である。また、2011 年 9 月には関東を中心に野菜(ネギ)による大規模な広域食中毒事例が発生しており、食中毒の起因菌としても注意する必要がある。

なお、ETEC は分離に特化した培地がなく、病原因子を特定する方法も限られていることから、一般の医療機関では見逃されている可能性も否定できない。さらに、ETEC は同一事例内でも複数の血清型や毒素型が検出される報告が多く、血清型等が異なれば疫学的な関連を否定される可能性があるため、広く菌検索を行う必要がある。

2011 年 11 月、宮崎県で同一グループによるタイ・カンボジア旅行帰国者の ETEC 集団感染事例が発生した。スクリーニング検査で ST、LT の両方が検出された患者と ST のみが検出された患者がいたこと、ETEC による感染症では一人の患者から複数の血清型や異なる毒素型が検出される報告があることから、供試菌数を増やして詳細に疫学的な関連性を調査したので報告する。

B. 研究目的

同一事例内の患者間において、同じ血清型・毒素型の ETEC 分離を試み、分離された菌株の関連性を PFGE により明らかにすることを目的とした。また、宮崎県で 2001 年に発生した海外旅行者下痢症の集団感染事例で分離された同じ血清型の ETEC を比較することにより、PFGE の有用性を検証した。

C. 研究方法

1. 材料及び検査法

有症者 6 名のうち保健所から提出された 3 名の患者便を用いた(表 1)。便は DHL 寒天培地および EMB 培地で画線塗抹し、36°C で一夜培養後、コロニースweepによる PCR 法でスクリーニングを実施した。なお、スクリーニングで複数の血清型が疑われたため釣菌数を増やし、患者一人当たり 40~60 コロニーについて検査を実施した。

ST、LT のいずれかもしくは両方が検出された場合は単一コロニーを PCR で確認した。また、

STが検出された場合はさらにSTpとSThを確認した。

病原因子が確認された分離株は、定法通り血清型別試験及び生化学性状試験を実施した。血清型が同一であった分離株はPFGEを実施した。

2. PFGE 法

PFGEは2003九州ブロック統一迅速法マニュアルを一部改変して行った。

制限酵素は*Xba*Iおよび*Not*I(各30U/ブロック、Roche)を使用し、*Xba*Iは37°Cで16hr、*Not*Iは37°Cで12hr消化した。泳動はCHEF DR III (Bio-Rad)で6.0V/cm、パルスタイム2.2-54.2sec、14°C、20hrの条件で行った。解析はFPQuest (Bio-Rad)を用い、*Xba*Iはトレランス1.2%で、*Not*Iはトレランス1.0%で解析した。

なお、PFGEパターンを比較するために、2001年に宮崎県で発生した集団感染事例で分離されたETECも併せて解析を行った。

D. 研究結果

3名から分離されたETECは、計5種類の血清型・毒素型が確認された。また、各血清型・毒素型におけるETECの検出率は、患者間で差が見られた(表2)。

3名の患者から共通して分離されたO169:H41(STp)についてPFGEを実施した。なお、同一血清型でも感染源が異なる場合を考慮し、患者A,Bについては8株を用いた。PFGEの結果、今回の事例におけるバンドパターンはほぼ一致したが、過去の事例とは異なるものだった(図1)。

E. 考察

3名全員から分離されたO169:H41(STp)は同じ由来のものと推測できたため、今回の事例は同一感染源を含むETECによる帰国者下痢症の集団感染と思われた。患者一人当たり少なくとも2種類のETECが分離されたこと、患者によって各血清型・毒素型の検出数に差が見られたことから、ETEC事例において菌数を増やすことは疫

学的な関連性の確認を行う上で注意すべき点であると考えられた。特に、今回PFGEを実施したO169:H41(STp)は、1名の患者からは1/60しか検出されておらず、供試菌数が少なければ見落としの可能性があった。

F. 結論

今回の事例はETECによる集団感染事例であった。供試菌数を増やすことで共通する血清型・毒素型を確認し、PFGEの実施に至ったことで、疫学的な関連性を推測できた。また、過去に分離された同一血清型・毒素型のETECと比較した結果、由来が異なると考えられ、PFGEの有用性を確認することができた。

謝辞

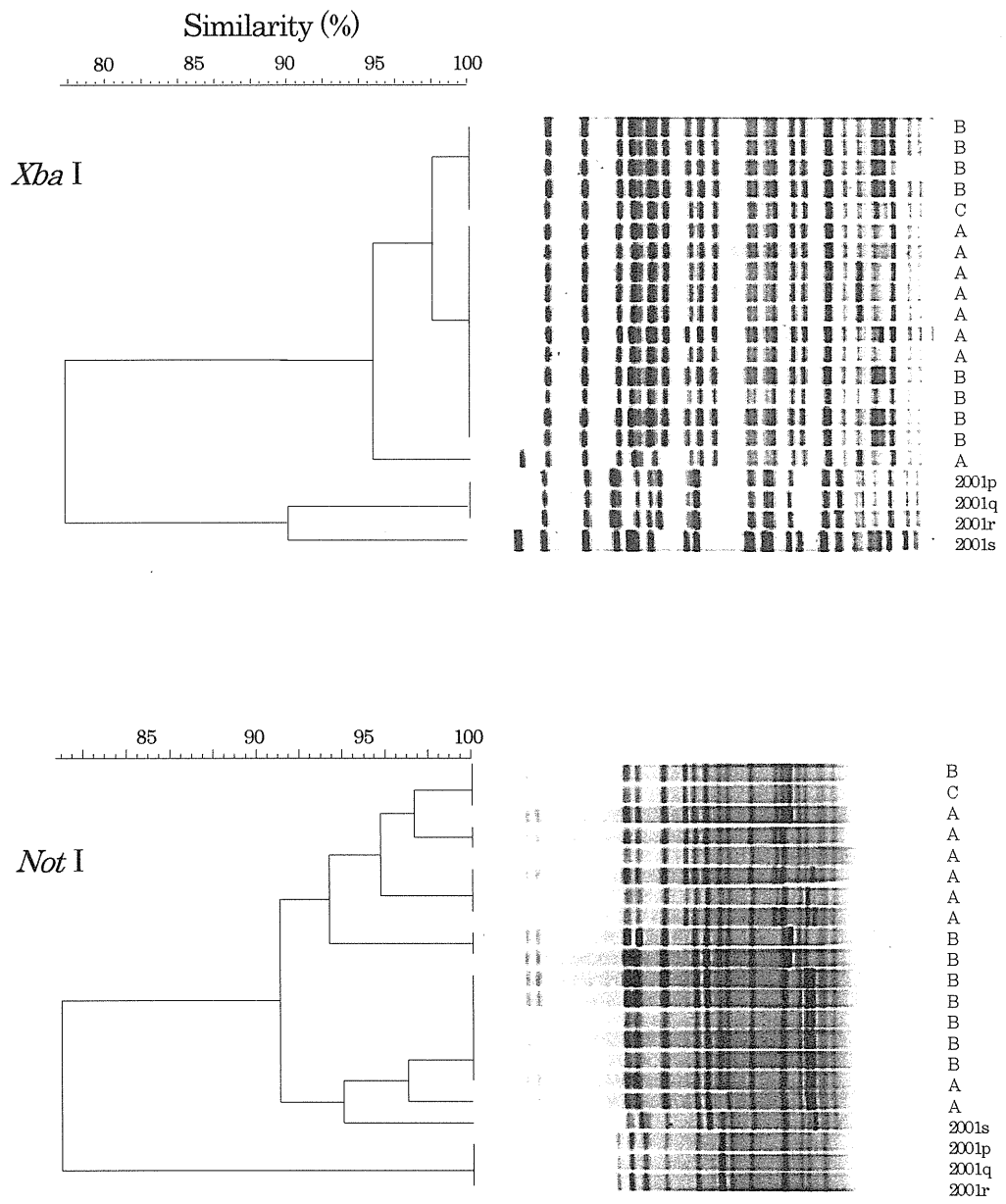
本研究にご協力いただいた延岡保健所広域指導検査課の皆様へ深謝いたします。

表 1 2011年に宮崎県で発生した旅行者下痢症事例の患者情報

患者	性別	年齢	症状	抗菌剤の投与
A	女	30代	下痢、腹痛、発熱、倦怠感	無
B	女	20代	下痢、腹痛	無
C	女	40代	軟便、腹痛	無

表 2 供試菌株情報と検出状況

患者	釣菌数	血清型	毒素型	検出数
A	40	O169:H41	STp	9
		O126:H12	STh	4
B	40	O169:H41	STp	9
		O6:H16	LT+STh	6
		O15:H41	STp	1
C	60	O169:H41	STp	1
		O27:H7	STp	10



(図1) PFGE 法による O169:H41 (STp)の解析結果

A~C : 今回分離された O169:H41 (STp)

2001p~s : 2001 年に宮崎県で発生した海外旅行者下痢症の集団感染事例で分離された O169:H41 (STp)

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

北九州市環境科学研究所 寺西 泰司、久保田 勉、藤田 景清
北九州市保健所西部生活衛生課 市川 睦、後川 賀津子
北九州市保健所東部生活衛生課 世戸 伸一、土井 史朗、安田 未知子

要旨

2012 年 6 月、市内競艇場イベントにて喫食した複数名の下痢、嘔吐等の症状の診断した届け出が市内の医療機関から本市保健所にあった。

保健所の疫学調査と本所での検査から黄色ブドウ球菌が原因の食中毒と判明した。

本報告書では様々な検体から原因菌を検出した事例を紹介する。

A. はじめに

2012 年 6 月、市内の医療機関から市内競艇場イベントで食事をした複数名が、「同日午後 4 時頃から下痢、嘔吐等の症状を呈し診療した」との届出があった。保健所の疫学調査の結果、22 グループ 34 名が下痢、嘔吐等の症状を呈しており、有症者らの共通点としてイベントに出店していた仮設店舗の「瓦そば」を摂食していたことが判明した。本所で検査したところ有症者便以外に、「瓦そば」の残品とその食材、従事者の手指からも黄色ブドウ球菌が検出された。

B. 検査

1. 検体と菌分離

有症便 6 検体、従事者便 1 検体は生理

食塩水にて浮遊させたものを、食品 9 検体はストマッカーにて 10%乳剤したものを、ふき取り 2 検体はふき取り液そのものを卵黄加マンニット食塩培地に各々 100 μ l 塗末し分離培養または 7.5%NaCl 加トリプトソイブローズにて増菌培養した。

周囲黄色で卵黄反応のあるコロニーを（グラム陽性球菌を確認後に）血液寒天培地とブレインハートブイヨンで培養し、確認試験（コアグララーゼ、RPLA、PCR）に供した。

2. 結果

患者便 2 検体、患者が喫食した同一ロットを含め未食食品 2 検体および食材 3 検体、並びに調理従事者の手指、ステンレスバット拭取り材料の各 1 検体の計 9

検体から黄色ブドウ球菌が検出された。分離株は、いずれも黄色ブドウ球菌エンテロトキシン A 遺伝子を保有し、コアグラーゼⅦ型であった（表 1）。

C. 考察

イベントは 6 月 9 日、10 日の二日間開催され、10 日に喫食した者のみが発症しており、嘔吐症状のある有症者 15 名の状況提供資料では 2 名を除いた 13 名が下痢症も認められたので、ウェルシュ菌、セレウス菌の検査も行ったがすべて陰性であった。

一方、黄色ブドウ球菌は表 1 にあるように多くの検体から分離された。6 月 9 日の未食残品からの分離は菌の汚染がイベント初日にすでに発生していることを示唆しており、調理から盛り付けまで担当した従事者の手指からの分離とあわせて汚染源が推察できると思われる。また、加工度の低いトッピング用の「きざみの

り」や「ねぎ」からも分離されており、これらの情報は保健所における今後の食中毒予防事業に活かされることと思われる。

E. 結論

保健所による食中毒（疑）の調査では検食の義務がある施設以外では、食材の入手が不十分である場合が多い。また、ふき取り検体からの菌検出は非常に稀なために、保健所へ提供できる有意な情報は有症者便や従事者便からのものがほとんどであり、また、その情報の種類が少ない場合が多い。

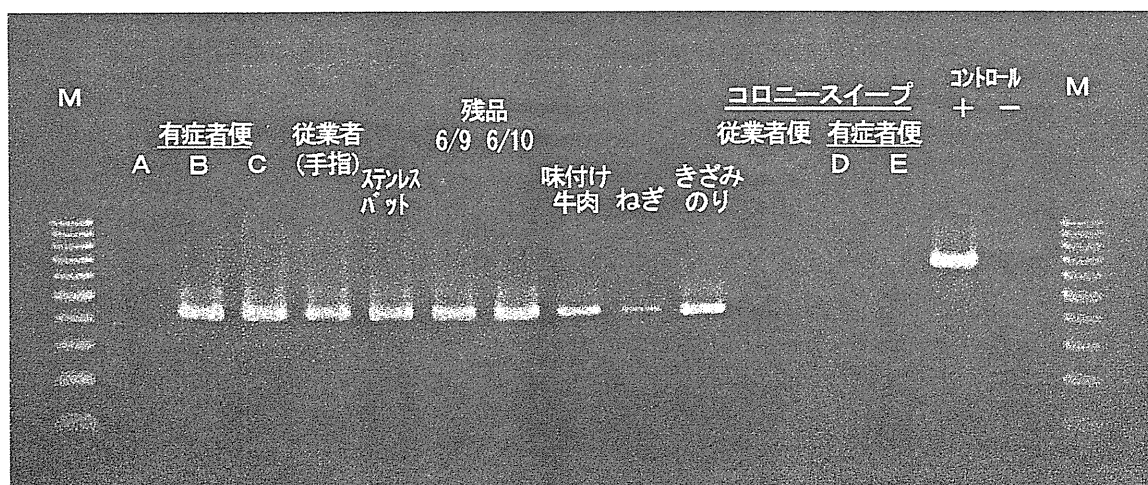
今回の事例では、多種の検体から原因菌を検出し、有意の疫学情報となる結果を保健所へ報告することができた。これからも保健衛生に役立つ情報を関連機関に提供できるように検査をしていきたい。

表1 検体と検査結果

検体 No.	検体		黄色ブドウ球菌			ウェルシュ菌	セレウス菌
			コアグラーゼ	エンテロキシン (RPLA)			
1	便	有症者 A	疑いコロニー無		-*	-	-
2		有症者 B	VII型	A型	+	-	-
3		有症者 C	VII型	A型	+	-	-
4		有症者 D	疑いコロニー無		-*	-	-
5		有症者 E	疑いコロニー無		-*	-	-
6		有症者 F	疑いコロニー無			-	-
7		従事者	疑いコロニー無		-*	-	-
8	ふき取り	従事者 (手指)	VII型	A型	+	-	-
9		ステンレスパット	VII型	A型	+	-	-
10	食品・食材	残品 (6/9)	VII型	A型	+	-	-
11		残品 (6/10)	VII型	A型	+	-	-
12		味付け牛肉	VII型	A型	+	-	-
13		金糸卵 (未開封)	疑いコロニー無			-	-
14		紅しょうが	疑いコロニー無			-	-
15		ねぎ	VII型	A型	+	-	-
16	きざみのり	VII型	A型	+	-	-	

- : 陰性または不検出 -* : 血液寒天発育コロニースリーブ

写真 エンテロキシンA型遺伝子保有状況 (目的遺伝子 423bp、コントロール (+) 695bp)



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）

「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」

平成 24 年度研究分担報告書

下痢症ウイルスの総合データベース構築総括

研究分担者 片山 和彦

国立感染症研究所ウイルス第二部第一室 室長

研究要旨

CaliciWeb では、NoV、SaV などヒト腸管感性カリシウイルスを対象とした、ゲノム情報を疫学情報と共に蓄積し、構造タンパク質領域を標的としたバイオインフォマティクスによる解析を行った。また、グローバル NoV network の NoroNet とのコラボレーションも実現しつつある。CaliciWeb の活動により提案された NoV の病原性変化を対象とした非構造タンパク質領域をターゲットとした、NoV の新規分類方法が提案された。本研究で構築を目指す GutVirusWeb は、構造生物学的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、から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の構築を目指す。またリコンビネーション、リアソートによる加速度的分子進化を反映可能な分子疫学ツールの開発と、それらを搭載した CaliciWeb の進化型下痢症ウイルス遺伝子の網羅的分子疫学用データベース、GutVirusWeb 構築により、下痢症ウイルスの効果的な感染防御に貢献する。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。

A. 研究目的

下痢症を引き起こすウイルス感染症は、毎年、世界的規模で数十～数百万人規模の流行を引き起こす。特にノーウォークウイルス（ノロウイルス、NoV）感染症は、我が国においても、大規模なウイルス性食中毒を引き起こすことが知られている。また、ロタウイルス（RV）は乳幼児の深刻な下痢症の原因ウイルスとして知られていたが、近年、脳炎の遠因となることも疑われている。さらに、成人に感染し、重篤な嘔吐下痢症を引き起こすなどの新たな問題点も報告されている。

我が国において、これらのウイルス感染症は、平成 18 年度から平成 23 年度まで、申請者の継続した NoV 等のヒトに感染するカリシウイルスの構造タンパク質領域（ウイルス粒子を形成するタンパク質）の遺伝子配列の解析と蓄積、それを利用した分子疫学の推進によって、流行のメカニズムの研究、感染予防法の開発が行われてきた。特に、NoV 等のヒトに感染するカリシウイルス遺伝子データ蓄積に特化した CaliciWeb は、我が国のみならず、国外からも広く利用され、感染経路の特定やワクチン開発等に活用されてきた。しかし、CaoliciWeb では、近年爆発的に流行した NoV GII.4 や、脳炎を起こす RV など、ウイルスの病原性の変化に対応することが困難である。これらウイルスの病原性に関わるタンパク質を特定し、さらに高度な分子疫学的手法を構築するためには、臨床データとリンクした網羅的な遺伝子配列解析に加え、ウイルスタンパク質の機能を構造生物学的に解析し、これらの研究成果を反映させることのできる新たな分子進化遺伝学的分子疫学を構築する必要がある。さらにこれらのウイルスでは、遺伝子の組み換えや（リコンビネーション）、入れ替え（リ

アソート）が高頻度で起きる。本研究班ウイルス分野においては、上記要素を加味したウイルスの病原性変化が予測可能な分子疫学解析ツールの開発と、それを搭載した下痢症ウイルス遺伝子の網羅的分子疫学用データベース、GutVirusWeb の構築を目指す。

B. 研究方法、結果及び考察

・ノロウイルスタンパク質の構造解析

本研究で構築を目指す GutVirusWeb は、構造生物学的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、から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の構築を目指す。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。本分担研究では、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。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 のコドンで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しコーール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。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

ロタウイルスは、主に乳幼児が罹患する急性胃腸炎の原因ウイルスのひとつで、幼稚園や小中学校だけでなく病院、老人介護施設などの施設でも集団感染を引き起こす。また、ロタウイルスで汚染された食品の摂取による食中毒事例も散見される。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。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。

・ロタウイルスRNA-PAGEの分子疫学への応用

ロタウイルス(RV)は二本鎖RNAで構成される11本の遺伝子分節をゲノムとして有する。RV感染患者の便検体から抽出したRNAをポリアクリルアミドゲルで電気泳動

(RNA-PAGE)すると、その分子量や二次構造の違いにより各分節を分離・検出することが可能である。この泳動パターンは遺伝子型や株によって異なるため、検体間のウイルスの類似性を推定する事も可能である。我々の保有する検体を用いて、RNA-PAGEのバンドパターンとそれらの遺伝子型との関連性について検討を行ったところ、VP2、VP3、VP6、VP7、NSP1、NSP2、NSP3、NSP5の各遺伝子分節において遺伝子型とバンドパターンに明確な関連性が認められた。この結果から、RNA-PAGEによるパターン分類法を利用して、RV流行株を広範かつ簡便に調査するシステムを構築できる可能性が示唆された。しかし、RNA-PAGEは、ポリアクリルアミドの濃度、泳動に用いるバッファー、泳動条件、サンプルに含まれる夾雑物などによって異なるゲル間、アッセイ間、

ラボ間変動が大きく異なる RNA-PAGE のパターンを比較するためには、インターナルスタンダードによる相対移動度算出などの工夫が必要である。

・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

ロタウイルスのゲノムは 11 本の分節に分かれているため進化の過程で遺伝子再集合により新たな流行株が産生されることがあり、遺伝子再集合による進化を予測・制御することは医学的に重要と考えられる。そこで本研究課題においては、ロタウイルスの遺伝子再集合による進化機構を解明することを目的とする。本研究課題を遂行するにあたり、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。本年度においては、インフルエンザウイルスのゲノム分節において 5'末端と 3'末端が塩基対を形成しているのか、またどのように塩基対を形成しているのかを検討することを目的として解析を行った。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。また、それぞれのゲノム分節において両末端の相補的な塩基対は高度に保存されているが、6 番目のゲノム分節についてのみ相補

性は保存されているものの塩基対の保存性は比較的 low、共進化していることが明らかになった。6 番目のゲノム分節の系統樹解析により、末端の配列は系統的に離れた株間で共有されている場合が多く観察された。以上の結果から、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。来年度は、ロタウイルスのリアソータント解析に本方法を応用する予定である。

・GutVirus Web の構築

前研究班で構築された CaliciWeb は、ノロウイルス (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 は、本年度観察された NoV GII.4 2012 変異株の大流行を捕らえ、注意喚起を行うなど、NoV の流行制御、予防衛生に多大な貢献を果たした。本ウェブサイトには構築された NoV, SaV 等の Calici virus に特化したサブデータベースは、国内外を問わず、利用者数も多く、研究者の間で重要な位置を占めている。本研究班では、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。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。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。

C. 健康危険情報

なし

D. 研究発表

1. 論文発表

1. 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.
2. 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
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. Seiya Harada, Tomoichiro Oka , Eisuke Tokuoka, Naoko Kiyota, Koichi Nishimura, Yasushi Shimada, Takehiko Ueno, Shigeru Ikezawa, Takaji Wakita, QiuHong 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.
7. 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.
8. 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.*, vol.157, 349-52, 2012.
 9. 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)
 10. Yoshiki Fujii, Takashi Shimoike, Hirotaka Takagi, Kosuke Murakami, Reiko Todaka-Takai, YoungBin Park and Kazuhiko Katayama. Amplification of all 11 RNA segments of group A rotaviruses based on reverse transcription polymerase chain reaction. *Microbiol Immunol.* 56: 630-638, 2012.
 11. 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.
 12. 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
 13. 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.
2. 学会発表
- 1) 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
 - 2) 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
 - 3) 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細胞への結合に関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

4) 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シ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

5) 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

6) 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

7) 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

8) 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

9) 藤井克樹：ロタウイルスの新知見 ウイルス性下痢症研究会第 24 回学術集会（大阪）2012 年 11 月 12 日

10) 藤井克樹：ロタウイルスゲノム解析と分

子疫学 衛生微生物技術協議会第 33 回研究会（横浜）2012 年 6 月 28-29 日

11) Yoshiyuki Suzuki and Yuki Kobayashi: Positive selection for gains of N-linked glycosylation sites in hemagglutinin during evolution of H3N2 human influenza A virus. SMBE 2012, Dublin, Ireland, June, 2012.

12) Yoshiyuki Suzuki and Yuki Kobayashi: Positive selection for gains of N-linked glycosylation sites in hemagglutinin during evolution of H3N2 human influenza A virus. Influenza2012: One Influenza, One World, Oxford, UK, September, 2012.

13) Yoshiyuki Suzuki : Roles of N-linked glycosylation and net-charge of hemagglutinin in influenza virus evolution. The 1628th Biological Symposium, National Institute of Genetics, Mishima, Japan, November, 2012.

14) 鈴木 善幸：ウイルスの進化的研究。名古屋大学、名古屋、2012.5.

15) 鈴木 善幸：Evolution of endogenous Borna-like nucleoprotein elements. 日本進化学会第 14 回大会ワークショップ「ゲノム構造進化の分子機構」、南大沢、2012.8.

16) 鈴木 善幸：Reassortment in evolution of viruses with segmented genomes. ウイルス性下痢症研究会第 24 回学術集会、中之島、2012.11.

17) 鈴木 善幸：Roles of N-linked glycosylation and net-charge of hemagglutinin in influenza virus evolution.

京都懇談会、京都大学、2012. 11.

18) 鈴木 善幸 : Roles of N-linked glycosylation and net-charge of hemagglutinin in influenza virus evolution. 第 35 回日本分子生物学会年会ワークショップ「ウイルス進化の統合生物学的研究」、福岡国際会議場・マリンメッセ福岡、福岡、2012. 12.

19) 鈴木 善幸 : Roles of N-linked glycosylation and net-charge of hemagglutinin in influenza virus evolution. 第 22 回生物多様性研究センターセミナー、名古屋市立大学、名古屋、2013. 1.

3. その他

(新聞) 指導、監修

1. 日経メディカル 2013 年 1 月号 p33「ノロウイルス変異株が猛威」
2. HOTERES2013 年 2 月 8 日号 p57-60 「猛威をふるったノロウイルスを検証」
3. 徳洲新聞 2013 年 1 月 14 日号 緊急特別企画 「ノロウイルス感染対策；今冬は過去 10 年で 2 番目の高水準 感染ピークは 12-1 月で警戒厳重に」
4. 日本経済新聞 2013 年 1 月 13 日号夕刊 7 面 「遺伝子変異、感染しやすく ノロウイルスなお警戒」
5. 朝日新聞 2012 年 11 月 27 日号夕刊 14 面 「ノロウイルス流行の兆し」
6. 毎日新聞 2012 年 12 月 8 日号夕刊 1 面 「ノロウイルス 06 年に次ぐ流行変異型猛威」
7. 読売新聞 2012 年 12 月 15 日号夕刊 14 面 「ノロウイルス患者急増 感染研 遺伝子変異流行の恐れ」
8. 朝日新聞 2012 年 12 月 24 日 37 面 「ノロウイルス 院内 6 人死亡」
9. 朝日新聞 2013 年 1 月 12 日号夕刊 14 面 ノロウイルス流行ピーク過ぎる インフルは患者数急増
(テレビ放送) 出演、指導、監修
1. 2012 年 12 月 2 日 18 時 日本テレビ；バンキシャ！
2. 2012 年 12 月 4 日 11 時 TBS；ひるおび！
3. 2012 年 2 月 19 日 8 時 フジテレビ とくダネ！
4. 2012 年 2 月 19 日 14 時 フジテレビ 知りたがり！
5. 2012 年 12 月 21 日 8 時 テレビ朝日 モーニングバード！
6. 2012 年 12 月 21 日 22 時 NHK 情報 LIVE ただいま！
7. 2012 年 12 月 24 日 23 時 日本テレビ NEWS ZERO
8. 2012 年 12 月 25 日 4 時 日本テレビ Oha!4NEWS LIVE
9. 2012 年 12 月 14 日 4 時 日本テレビ Oha!4NEWS LIVE
10. 2012 年 12 月 13 日 16 時 53 分 日本テレビ news every
(ラジオ番組) 出演
- 2013 年 2 月 1 日 17 時 NHK ラジオ 私も一言 「ここに注目 感染性胃腸炎を起こすノロウイルスの正体」 片山和彦

E. 知的財産権の出願・登録状況

なし

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）
「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」
平成 24 年度研究分担報告書

PAGE によるロタウイルスゲノムのバンドパターン解析

研究分担者 村上 耕介

国立感染症研究所ウイルス第二部第一室

研究要旨

ロタウイルスは、主に乳幼児が罹患する急性胃腸炎の原因ウイルスのひとつで、幼稚園や小中学校だけでなく病院、老人介護施設などの施設でも集団感染を引き起こす。また、ロタウイルスで汚染された食品の摂取による食中毒事例も散見される。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。